

- [6] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002
- [7] Comellas A P, Dada L A, Lecuona E, *et al*. Hypoxia-mediated degradation of Na, K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system [J].

Circ Res, 2006, 98(10): 1314

- [8] Fuller W, Parmar V, Eaton P, *et al*. Cardiac ischemia causes inhibition of the Na, K-ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(4): 1044

木贼大孔树脂提取物对单个核细胞-内皮细胞黏附的影响

李丽玮, 黄伟, 李云峰, 甄艳军, 张莉, 侯建明*

(河北医科大学基础课教学部, 河北石家庄 050091)

摘要:目的 探讨木贼大孔树脂提取物对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的单个核细胞-内皮细胞黏附的作用及其可能的机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 大孔吸附树脂分离法获取木贼提取物, 用不同质量浓度的木贼大孔树脂提取物作用于 ox-LDL 诱导的 ECV304 细胞 12 h, 观察人单个核细胞与内皮细胞的黏附及 ECV304 细胞的 IL-8 和 VCAM-1 蛋白表达, 并通过 RT-PCR 观察 IL-8 和 VCAM-1 的基因表达。结果 高、中、低剂量(100、50、25 $\mu\text{g/mL}$)的木贼大孔树脂提取物均显著抑制 ox-LDL 诱导的单个核-内皮细胞的黏附, 下调 ox-LDL 诱导的 ECV304 细胞 IL-8 和 VCAM-1 蛋白和基因的表达, 以中剂量(50 $\mu\text{g/mL}$)效果最明显。结论 木贼中总黄酮和总酚酸是木贼抗动脉粥样硬化(AS)的有效部位之一, 两者抑制 IL-8 和 VCAM-1 的基因及蛋白表达可能是其抑制单个核-内皮细胞黏附及抗 AS 的机制之一。

关键词: 木贼; 内皮细胞; 血管细胞黏附分子; 氧化低密度脂蛋白; 白细胞介素-8; 动脉粥样硬化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0265-04

单核细胞及淋巴细胞向动脉内膜黏附、迁移是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)早期炎症反应的特征事件, 抑制单个核细胞与内皮细胞间黏附是抗 AS 的重要机制。研究表明木贼 *Equisetum hiemale* L. 具有包括抗 AS 等多方面的药理活性, 但对其抗 AS 有效部位的研究少有报道。本实验采用乙醇回流提取, 大孔吸附树脂分离法初步提取木贼中的有效部位总黄酮和总酚酸, 作用于氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 观察有效部位对单个核细胞-HUVEC 黏附及白细胞介素-8(IL-8)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)表达的影响, 为研究木贼抗 AS 的有效部位及作用机制提供依据。

1 材料

木贼药材(购于石家庄市乐仁堂大药房, 经河北医科大学中医学院中药系鉴定), 槲皮素和阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0080-9705、0773-9910), D101 型大孔树脂(天津大均科技开发有限公司), 人脐静脉内皮细胞株 ECV304(武汉大学中国动植物细胞保藏中心), 新生小牛血

清(杭州四季青公司), DMEM 培养液和胰酶(Gibco 公司), 淋巴细胞分离液(北京鼎国生物技术公司), 白细胞介素-8(IL-8)放射免疫分析药盒(北京普尔伟业生物科技有限公司), VCAM-1 鼠抗人单克隆抗体、羊抗鼠 FITV-IgG 二抗工作液(美国 Santa Cruz 公司), TRIzol 试剂和 PCR 试剂盒(北京天根公司), 其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 木贼大孔树脂提取物的制备: 称取适量木贼于圆底烧瓶中, 加 12 倍量 70% 乙醇浸泡 2 h, 回流提取 3 次, 滤过, 合并滤液。大孔树脂 40 g 经适当处理后湿法装柱, 将滤液上树脂柱, 先以水冲至洗脱液近无色后(Molish 反应阴性)分别用蒸馏水、30% 乙醇、70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 分别以槲皮素、阿魏酸作为对照品测定总黄酮和总酚酸, 结果木贼大孔树脂提取物中含黄酮 36.62%、酚酸 26.66%。将 70% 乙醇洗脱液减压浓缩后, 用无血清培养基 DMEM 配制, 加入二甲基亚砜(DMSO, 终体积分数为 5%)使其充分溶解, 此为用于本实验的木贼大孔树脂提取物(以下简称木贼提取物)。

* 收稿日期: 2008-04-07

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(06276102D-28)

作者简介: 李丽玮(1980-), 女, 河北省邢台市人, 硕士, 研究方向为中药防治动脉粥样硬化的基础研究

Tel: (0311) 86265219 E-mail: losingangle567@163.com

* 通讯作者 侯建明 E-mail: houjianming@mail.china.com

2.2 ox-LDL 的制备和鉴定: 采用化学沉淀法^[1], 由人静脉外周血制备低密度脂蛋白 (LDL), 考马斯亮蓝法测定蛋白的量, 在终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 CuSO_4 中透析 24 h (37°C), 然后在 4°C 生理盐水中透析 24 h 去除 CuSO_4 , 琼脂糖凝胶电泳和氧化曲线法鉴定 LDL 的氧化修饰结果。 4°C 保存制备好的 ox-LDL, 2 周内用完。

2.3 单个核细胞悬液的制备: 取人外周静脉血 1 mL 与 3.8% 枸橼酸钠以 9:1 比例混合, 与等体积 Hank's 液混匀后加于盛有 2 mL 淋巴细胞分离液的试管内, 2000 r/min 离心 15 min 使血细胞分层。用毛细管将单个核细胞吸出, 以 5 倍 Hank's 液洗涤后离心 (1500 r/min , 15 min), 所得细胞以 DMEM (高糖) 培养液配成 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 备用。

2.4 木贼提取物对单个核细胞-内皮细胞黏附的影响: 调整 ECV304 细胞数至 $3 \times 10^5/\text{mL}$, 按每孔 $100 \mu\text{L}$ 加入 96 孔培养板中, 置于培养箱中培养。待长成单层后换成无血清培养液 (0.5 mL) 培养 6 h, 加无血清培养液 0.5 mL (对照组)、含 ox-LDL ($80 \mu\text{g/mL}$) 的无血清培养液 0.5 mL (模型组)、含不同质量浓度 (100 、 50 、 $25 \mu\text{g/mL}$) 木贼提取物 + ox-LDL ($80 \mu\text{g/mL}$) 的无血清培养液 0.5 mL (药物干预组), 每个浓度加 5 个孔, 37°C 孵育 12 h。每孔去上清液后, 用 PBS 洗 1 次, 加入 $100 \mu\text{L}$ 人外周血单个核细胞 ($1.5 \times 10^6/\text{mL}$), 孵育 30 min, 每 15 min 摇动 1 次。用 $100 \mu\text{L}$ PBS 轻轻洗孔 3 次, 以洗去未黏附的单个核细胞。于倒置显微镜下计数每个视野黏附的单个核细胞数, 每个孔计数上、中、下、左、右 5 个视野, 观察各个孔每个视野黏附的单个核细胞数。

2.5 木贼提取物对 ECV304 细胞的影响

2.5.1 细胞培养与分组: 采用含 15% 新生小牛血清的 DMEM 作为培养液, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 ECV304 细胞。将对数生长期细胞的培养液换成无血清 DMEM 培养液, 6 h 后分成 5 组: 对照组以无血清 DMEM 培养液培养, 模型组以无血清 DMEM 培养液继续培养 1 h 后加入 ox-LDL (终质量浓度为 $80 \mu\text{g/mL}$), 木贼提取物高、中、低剂量组: 无血清 DMEM 培养液中加入木贼提取物使其终质量浓度分别为 100 、 50 、 $25 \mu\text{g/mL}$, 培养 1 h 后加入 ox-LDL, 使其终质量浓度为 $80 \mu\text{g/mL}$ 。加药培养 12 h 后收集细胞和培养液, 进行检测 (VCAM-1 和 RT-PCR 药物干预组只检测木贼提取

物中剂量组)。为观察木贼提取物对细胞生长状态的影响, 在培养液中加入木贼提取物使其终质量浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$, 培养 12 h 后倒置显微镜下观察细胞形态良好, 台盼蓝染色其细胞存活率近似对照组细胞, 均在 95% 以上, 说明木贼提取液可直接用于细胞培养。

2.5.2 ECV304 细胞培养上清液中 IL-8 水平检测: 收集各组细胞培养液, 按试剂盒说明操作, 放射免疫分析法测定。

2.5.3 流式细胞仪检测细胞 VCAM-1 蛋白表达: 用胰酶消化收获细胞, 并用 PBS 冲洗 2 次, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清用 2% 甲醛固定。碘化丙啶染色, 流式细胞仪检测细胞 VCAM-1 蛋白表达。

2.5.4 RT-PCR 检测 IL-8 和 VCAM-1 的 mRNA 表达: 按 Trizol 试剂盒说明书提取各组细胞总 mRNA, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 每一样品均出现清晰的 28 S 和 18 S 条带, 且 28 S 条带的亮度和宽度约为 18 S 条带的 2 倍, 纯度鉴定 A_{260}/A_{280} 值为 $1.8 \sim 2.0$ 。

RNA 的反转录过程及扩增过程分别按试剂盒说明书进行。IL-8 的引物序列为: 正向引物 $5'-\text{ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAA}-3'$, 反向引物 $5'-\text{TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA}-3'$, 扩增产物全长 255 bp。VCAM-1 引物序列为: 正向引物 $5'-\text{ATGACATGCTTGAGCCAGG}-3'$, 反向引物 $5'-\text{GTGTCTCCTTCTTTGACACT}-3'$, 扩增产物全长 260 bp。内参 GAPDH 引物序列为: 上游 $5'-\text{GTGAAGGTCGGAGTCAACG}-3'$, 下游 $5'-\text{GGTGAAGACGCCAGTGGACTC}-3'$, 扩增产物全长 300 bp (均由北京三博远志生物技术合成)。IL-8 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 35 s, 53°C 退火 60 s, 72°C 延伸 60 s; 30 个循环后 72°C 延伸 5 min。VCAM-1 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 53°C 退火 60 s, 72°C 延伸 40 s; 30 个循环后 72°C 延伸 5 min。内参 GAPDH 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 10 s, 57°C 退火 40 s, 72°C 延伸 40 s; 30 个循环后 72°C 延伸 5 min。取 $10 \mu\text{L}$ 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, FR-980 生物电泳图像分析系统检测各组目的基因及 GAPDH 基因的灰度值, 以两者的比值代表 IL-8 和 VCAM-1 mRNA 的相对表达水平。

2.6 统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 进行统计处理, 样本间比较的统计学差异用单因素方差分析, S-N-K q 检验。

3 结果

3.1 木贼提取物对 ox-LDL 诱导单个核细胞-内皮细胞黏附的影响: 由表 1 可见, 经 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 作用后, 单个核细胞与内皮细胞的黏附显著增强 ($P < 0.01$)。高、中、低剂量木贼提取物均抑制 ox-LDL 引起的单个核细胞与内皮细胞的黏附 ($P < 0.01$), 以中剂量组作用最为显著。

3.2 培养液中 IL-8 水平变化: 模型组 IL-8 较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 木贼提取物高、中、低剂量组 IL-8 较模型组均降低, 以中剂量组最为显著 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 木贼提取物对 ox-LDL 诱导单个核细胞-内皮细胞黏附及 ECV304 细胞培养上清液中 IL-8 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1 Effect of extract from *E. hiemale* on ox-LDL induced mononuclear cell-EC adherence and IL-8 level in cultured supernatant of ECV304 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	黏附细胞/(个·视野 $^{-1}$)	IL-8/(ng·mL $^{-1}$)
对照	—	52.6 $\pm$ 3.4	0.922 $\pm$ 0.171
模型	80	106.2 $\pm$ 5.8 **	8.979 $\pm$ 0.795 **
木贼提取物	100	74.8 $\pm$ 3.7 $\triangle\triangle$	3.056 $\pm$ 0.541 $\triangle\triangle$
	50	54.2 $\pm$ 3.0 $\triangle\triangle$	2.052 $\pm$ 1.018 $\triangle\triangle$
	25	80.6 $\pm$ 3.4 $\triangle\triangle$	6.026 $\pm$ 0.549 $\triangle\triangle$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs model group

3.3 内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达量的变化: 模型组 VCAM-1 蛋白表达较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 木贼提取物中剂量组 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) VCAM-1 蛋白表达较模型组显著降低 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 木贼提取物对 ox-LDL 诱导 ECV304 细胞 VCAM-1 蛋白、IL-8 及 VCAM-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of extract from *E. hiemale* on protein expression of VCAM-1 and mRNA expression of IL-8 and VCAM-1 of ECV304 cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	VCAM-1 蛋白 表达量(FI)	mRNA 表达水平	
			VCAM-1/GAPDH	IL-8/GAPDH
对照	—	1.000 $\pm$ 0.028	0.223 $\pm$ 0.008	1.155 $\pm$ 0.059
模型	—	1.204 $\pm$ 0.011 **	1.071 $\pm$ 0.054 **	2.602 $\pm$ 0.169 **
木贼提取物	50	1.070 $\pm$ 0.017 $\triangle\triangle$	0.396 $\pm$ 0.014 $\triangle\triangle$	1.446 $\pm$ 0.021 $\triangle\triangle$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs model group

3.4 ECV304 细胞 VCAM-1 和 IL-8 mRNA 表达的变化: 见表 2 及图 1。模型组的 VCAM-1 和 IL-8 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.01$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 木贼提取物组的 VCAM-1 和 IL-8 mRNA 表达

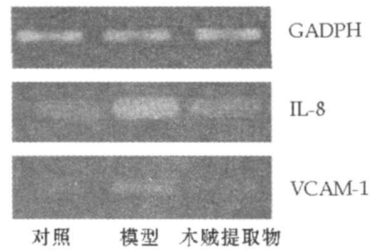


图 1 木贼提取物对 ECV304 细胞 IL-8 和 VCAM-1 mRNA 的影响

Fig. 1 Effect of extract from *E. hiemale* on mRNA expression of IL-8 and VCAM-1 of ECV304 cells

量显著低于模型组 ($P < 0.01$)。

4 讨论

木贼中含黄酮类和酚酸类化合物^[2], 这两类物质具有抗氧化、抗炎、保护血管内皮细胞、抑制 AS 形成的作用。本课题组曾以动物实验证实木贼水煎剂及正丁醇萃取物有保护血管内皮、降低细胞黏附分子表达、降低血清 IL-8 等作用, 显著抑制动脉粥样斑块形成^[3~5]。本实验则是在前期实验基础上将提取有效部位的方法加以改进得到含黄酮及酚酸质量分数较高的提取物, 经离体细胞实验, 得到与整体动物实验类似结果, 证实黄酮及酚酸是木贼抗 AS 的有效部位之一。值得注意的是, 在本实验所应用的木贼提取物质量浓度范围内, 中剂量组的检测指标效果比低剂量组效果好, 高剂量组反而不如中剂量组, 这种现象可能的原因是中剂量黄酮和酚酸对损伤细胞的保护作用已达到最佳, 或者高剂量木贼提取物中其他成分对细胞有一定的损伤作用, 因此进一步改进提取工艺、得到纯度更高的木贼提取物用于实验是本课题组下一步的研究内容。

VCAM-1 主要存在于血管内皮细胞, 它介导多种白细胞与内皮细胞间的黏附。ox-LDL 通过上调内皮细胞表达 VCAM-1 促进淋巴细胞、单核细胞与内皮细胞黏附、并向内皮下迁移, 这是 AS 发生、发展过程中的重要事件^[6]。除了黏附分子, 许多趋化因子, 如单核细胞趋化蛋白 (MCP-1) 和 IL-8, 也在细胞黏附中起重要作用。内皮细胞受 ox-LDL 刺激后高表达 IL-8, IL-8 不仅对中性粒细胞有强烈趋化作用, 还是重要的单核细胞和淋巴细胞向血管壁游走的趋化因子^[7]; IL-8 还直接促进单核细胞与内皮细胞间的牢固黏附, Gerszten^[8] 证实了在离体实验条件下 2 nmol/L 的 IL-8 即可大幅度增加单核-内皮细胞黏附。本实验结果表明木贼提取物显著下调 ox-LDL 诱导的 VCAM-1 和 IL-8 表达, 且 mRNA

和蛋白表达的变化有较好一致性,提示木贼提取物对细胞黏附相关基因的表达有调控作用,是其降低单个核-内皮细胞黏附作用进而抑制 AS 发生、发展的机制之一,其进一步的分子机制和该效应的有效成分值得深入探讨和研究。

参考文献:

- [1] Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation [J]. *Lipid Res*, 1983, 24(3): 904
- [2] 李淑惠, 靳丹虹. 木贼科植物研究概况 I. 化学成分研究 [J]. *中草药*, 2000, 31(7): 附 11-附 14
- [3] 甄艳军, 安杰. 木贼对动脉粥样硬化早期大鼠血清 IL-1、IL-8 及 TNF- α 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2003, 23(8): 538-539

- [4] 甄艳军, 侯建明. 木贼对大鼠高脂血症及主动脉内膜早期粥样硬化病变的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(7): 643-645
- [5] 侯建明, 甄彦君. 木贼对动脉粥样硬化大鼠血清 NO 和 NOS 的影响 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2003, 3(16): 1008-1009
- [6] Li H, Cybulsky M I, Gimbrone M A J, *et al*. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma [J]. *Am J Physiol*, 1993, 143: 1551-1559
- [7] Guar T. Chemokines take center stage inflammatory illness [J]. *Science*, 1996, 272(5264): 954
- [8] Gerszten R E, Garcia-Zepeda E A, Lim Y C, *et al*. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions [J]. *Nature*, 1999, 398(6729): 718

茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究

王爱云^{1,2}, 陈群¹, 李成付¹, 焦庆才^{1*}

(1 南京大学生命科学院, 江苏 南京 210093; 2 南京中医药大学中医药研究院, 江苏省方剂重点实验室, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 通过对免疫功能的影响考察硫酸化茯苓多糖 (PS) 抗肿瘤的作用及其机制。方法 以 S₁₈₀ 肿瘤模型小鼠和 Yac-1 肿瘤细胞株分别为体内和体外实验对象, 研究 PS 的抗肿瘤活性和免疫调节功能。结果 PS 体内显著抑制移植性 S₁₈₀ 荷瘤小鼠肿瘤生长, 最大抑瘤率达 32.22% ($P < 0.01$); 促进荷瘤小鼠脾脏和胸腺淋巴器官的发育生长 ($P < 0.05$)。体外对小鼠淋巴细胞尤其是 B 淋巴细胞的增殖有显著促进作用 ($P < 0.05$)。PS 体外可显著提高 NK 细胞杀伤活性 ($P < 0.001$)。结论 PS 可以通过增强 NK 细胞杀伤活力, 促进淋巴细胞增殖, 增强机体特异性免疫功能而发挥抗肿瘤作用。PS 还可以拮抗免疫抑制药所致的免疫抑制。

关键词: 茯苓; 茯苓多糖硫酸酯; 抗肿瘤; 免疫

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0268-04

茯苓系多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 是我国传统的利尿安神药。茯苓多糖是茯苓的主要有效成分之一, 将天然多糖进行硫酸酯化修饰是多糖结构改造的一个研究热点, 多糖硫酸化后可以增强原有的生物活性或产生新的功能, 人工合成的硫酸化多糖除抗血栓、抗凝血^[1]和抗病毒^[2]功能外, 近年来不断发现还具有其他生物活性, 如抗氧化^[3]、抗肿瘤, 抗细胞黏附与转移^[4]。由于茯苓多糖不溶于水, 对其进行结构改造以发挥其生物活性势在必行。本课题组在已有工作的基础上, 利用碱提酸沉法提取了茯苓菌核多糖, 分别以氯磺酸 (Wolfson 法) 和氨基磺酸为磺化试剂制备茯苓多糖硫酸酯 (PS)^[5]。通过单因子和正交实验, 研究茯苓多糖硫酸化的反应工艺, 通过研究茯苓多糖硫酸化反应的热动力学过程和产品的波谱学

特征, 探索茯苓多糖硫酸化的反应机制和产物的分子结构信息^[6]。结果显示, Wolfson 法制备的 PS 具有取代高、相对分子质量小、制备工艺不同等特点, 故本实验以 PS 为实验药物, 系统研究其体内外抗肿瘤、免疫调节等活性及其机制, 为其临床应用提供依据。

1 材料

- 1.1 实验动物: ICR 小鼠, 雄性, (20 $\pm$ 2) g, 南京医科大学实验动物中心提供。
- 1.2 细胞株: 小鼠肉瘤 S₁₈₀、小鼠淋巴瘤细胞 Yac-1, 南京中医药大学药理毒理研究室保存。
- 1.3 实验仪器: 倒置显微镜系统, 德国 Leica; NU-6511 超低温冰箱, 美国 Nuair; PL511402 纯水系统, 美国 USF; 二氧化碳培养箱, 美国 Forma; 台式冷冻离心机, 美国 Beckman; P2-1000 微量移液器,

* 收稿日期: 2008-05-05

作者简介: 王爱云 (1974—), 女, 助理研究员, 博士生, 研究方向为中药学。Tel: (025) 86798154 E-mail: way9815@163.com

* 通讯作者 焦庆才 Tel: (025) 83594376 E-mail: jiaoqc@yahoo.com