

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0143-04

• 实验研究 •

健脾祛痰化痰方对氧化型低密度脂蛋白诱导血管细胞信号分子钙离子和蛋白激酶 C 表达的影响

陈 冰, 宋剑南, 牛晓红, 金 红, 李玉梅

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京市 100700)

[关键词] 细胞生物学; 中药调节钙离子和蛋白激酶 C 的表达; 免疫荧光检测; 健脾祛痰化痰方; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 蛋白激酶 C

[摘 要] 为了探讨健脾祛痰化痰方在抗氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化中对信号转导分子钙离子和蛋白激酶 C 的影响, 分别以健脾祛痰化痰方—沥水调脂胶囊含药血清(浓度分别为 5%、10% 和 20%)、氧化型低密度脂蛋白(100mg/L)处理人脐静脉内皮细胞和人脐动脉平滑肌细胞, 以流式细胞仪检测两种细胞胞质游离钙离子浓度, 以液体闪烁仪检测平滑肌细胞胞膜蛋白激酶 C 活性。结果发现, 沥水调脂胶囊含药血清对氧化型低密度脂蛋白引起的内皮细胞、平滑肌细胞胞质游离钙离子浓度升高及平滑肌细胞胞膜蛋白激酶 C 活性升高有明显的抑制作用, 其中 20% 含药血清作用最为明显。结果提示, 健脾祛痰化痰方可能通过调节钙离子、蛋白激酶 C 两种信号传递分子的变化起抗氧化作用, 进而抑制内皮细胞凋亡及平滑肌细胞增殖, 达到阻止动脉粥样硬化发生的作用。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Jianpi Qutan Huayu Recipe on the Expression of $[Ca^{2+}]_i$ and Protein Kinase C of Blood Vessel Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

CHEN Bing, SONG Jian-Nan, NIU Xiao-Hong, JIN Hong, and LI Yu-Mei

(Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Jianpi Qutan Huayu Recipe; Atherosclerosis; Oxidized Low Density Lipoprotein; Protein Kinase C; Vascular Smooth Muscle Cell; Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Jianpi Qutan Huayu Recipe on variations of signal transduction molecules $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinase C (PKC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in atherosclerosis (As). **Methods**

Endothelial cells and vascular smooth muscle cells were cultured in vitro, and the cells were treated with serum containing medicine (5%, 10% and 20%) and ox-LDL (100 mg/L). The variations of $[Ca^{2+}]_i$ were detected by flow cytometry. The activation of member PKC of smooth muscle cells were determined by liquid scintillation spectrometer. **Results** The results revealed that $[Ca^{2+}]_i$ of endothelial cells and smooth muscle cells were increasing induced by ox-LDL. It also showed that the activation of member PKC of smooth muscle cells was higher in ox-LDL group than in control group. Jianpi Qutan Huayu Recipe could inhibit these changes significantly, and the effect of 20% concentration was most obviously. **Conclusions** The results indicated that Jianpi Qutan Huayu Recipe may inhibit the apoptosis of endothelial cells and the proliferation of smooth muscle cells by regulating signal transduction molecules Ca^{2+} and PKC, and it can retard the processes of As.

沥水调脂胶囊(前称脂泰胶囊)系根据健脾祛痰化痰组方开发, 由半夏、陈皮、水蛭、川芎等中药组成。以往的研究发现, 该药可显著降低内皮细胞通透性, 保护内皮细胞^[1], 升高一氧化氮合酶及其 mRNA 的表达^[2], 具有明显抗氧化^[3]、抑制内皮细胞凋亡的作用^[4]。内皮细胞凋亡和平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要病理改变。本

实验针对致 As 的强危险因素氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对内皮细胞、血管平滑肌细胞的损害作用, 采用血清药, 探讨健脾祛痰化痰方在抗 ox-LDL 致 As 过程中对信号转导分子的影响。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

健脾祛痰化痰方—沥水调脂胶囊, 由江苏常州健民制药厂提供, M199、DMEM/F12 干粉培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司, 内皮细胞生长因子、 α -型胶原酶、维生素 E 购自 Sigma 公司, 胰蛋白酶购自

[收稿日期] 2003-07-26 [修回日期] 2004-01-31

[基金项目] 国家自然科学基金(39970883)资助

[作者简介] 陈冰, 硕士, 从事中西医结合抗动脉粥样硬化机理的研究, E-mail 为 chenbing1205@hotmail.com。宋剑南, 研究员, 博士生导师, 从事脂蛋白代谢与动脉粥样硬化关系的研究, 本文通讯作者, E-mail 为 sjn2003@sina.com.cn。牛晓红, 副主任技师, 从事中西医结合抗动脉粥样硬化机理的研究。

Gibco 公司, (11)因子抗体购自博士德公司, α -肌动蛋白鼠抗人抗体购自中山生物技术有限公司, Fluor-3/AM 购自 BIO-RAD 公司, 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性检测试剂盒购自 Promega 公司, [γ - 32 P]-ATP 购自北京福瑞生物技术有限公司, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 购自中国医学科学院基础理论研究所生物化学室, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

取新鲜健康人脐带, 以 PBS 反复冲洗脐静脉, 注入 0.1% Ⅲ型胶原酶, 两端以止血钳夹住, 37℃消化 20 min, 收集消化液, 离心。以 M199 完全培养基 (含 20% 胎牛血清和 20 mg/L 内皮细胞生长因子) 吹散细胞, 接种于培养瓶中。倒置显微镜下观察, 内皮细胞呈鹅卵石样镶嵌排列, (11)因子相关抗原染色可见细胞膜有棕黄色颗粒分布。实验使用第 3~5 代细胞。

1.3 人脐动脉平滑肌细胞的培养

取新鲜健康人脐带, 分离脐动脉, 剪成 2 mm³ 大小的组织块, 洗掉血块。以 0.2% Ⅲ型胶原酶 37℃消化 40~60 min, 然后在含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养 24 h, 再放入 0.2% Ⅲ型胶原酶和 0.1% 胰蛋白酶的复合消化液中, 37℃消化至组织块完全溶解, 离心后以含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基接种。相差显微镜下观察, 平滑肌细胞呈梭形或长梭形, 呈典型的“峰与谷”样生长。 α -肌动蛋白抗体染色可见平滑肌细胞胞质内有条丝状发光物, 胞核无荧光。实验使用第 3~5 代细胞。

1.4 含药血清的制备

Wistar 大鼠, 体重 200 $\pm$ 20 g, 雌雄各半, 由本所实验动物中心提供。将沥水调脂胶囊按成人临床日用量等效剂量的 8 倍 (按照体表面积计算) 给大鼠 (空腹 12 h 以上) 灌胃, 每天 2 次, 连续 3 天, 正常组以水代替。第 3 天将 1 日量 1 次给药, 1.5 h 后, 从腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 无菌分装, 56℃灭活 30 min, -20℃保存备用。

1.5 氧化型低密度脂蛋白的制备^[5]

天然 LDL 在 0.1 mol/L 无乙二胺四乙酸的 PBS 缓冲液中 4℃充氮透析 24 h, 测定蛋白含量并调节至 0.3 g/L, 然后在 pH 7.4、0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液中 (含 10 μ mol/L CuSO₄) 4℃反应 24 h, 制得 ox-LDL。测定硫代巴比妥酸反应物值, 天然 LDL 为 2.65 $\pm$ 0.43 μ mol/g, ox-LDL 为 41.29 $\pm$ 1.95 μ mol/g; 琼脂糖凝胶电泳可见 ox-LDL 电泳速度快于天然 LDL。

1.6 细胞内钙离子浓度的测定

实验分 7 组: 空白组 (正常鼠血清); ④天然 LDL 组为正常鼠血清加天然 LDL (50 mg/L); ④ox-LDL 组为正常鼠血清加 ox-LDL (50 mg/L, 下同); 5% 含药血清组为 5% 含药血清加 ox-LDL; 10% 含药血清组为 10% 含药血清加 ox-LDL; 20% 含药血清组为 20% 含药血清加 ox-LDL; ⑧维生素 E 组为维生素 E (100 mg/L) 加 ox-LDL。将细胞接种于 6 孔板中, 每组 3 孔, 待生长至 80% 左右汇合时, 加入不含血清的培养基培养 24 h (以正常鼠血清将各组血清浓度补至 20%) 后加入脂蛋白, 内皮细胞、平滑肌细胞分别培养 12 h 和 18 h。消化并收集细胞, 加入终浓度为 5 μ mol/L 的 Fluor-3/AM, 37℃孵育 45 min, 0.1 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 过 300 目筛网, 流式细胞仪测定, 以平均荧光强度表示。

1.7 平滑肌细胞胞膜蛋白激酶 C 活性测定

细胞接种于培养瓶中, 分 4 组: 空白组 (正常鼠血清); ④ox-LDL 组为正常鼠血清加 ox-LDL (50 mg/L, 下同); ④维生素 E 对照组为维生素 E (100 mg/L) 加 ox-LDL; 20% 含药血清组为 20% 含药血清加 ox-LDL。收集细胞前处理同 1.6, 参照 PKC 活性检测试剂盒步骤操作, 液体闪烁仪测定后按照公式计算酶活性, 以 μ mol/(min·g 蛋白) 表示。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞钙离子浓度

与空白组比较, 天然 LDL 使内皮细胞内 Ca²⁺ 无明显增加, ox-LDL 使细胞内 Ca²⁺ 浓度显著增加 ($P < 0.01$)。含药血清和维生素 E 均能不同程度地明显抑制 ox-LDL 致细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中以 20% 含药血清作用最强, 且优于维生素 E 组 ($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

2.2 平滑肌细胞钙离子浓度

天然 LDL 作用于平滑肌细胞, 细胞内 Ca²⁺ 浓度相对于空白组有所增加, 但无统计学意义。ox-LDL 刺激后细胞内 Ca²⁺ 浓度显著增加 ($P < 0.01$), 沥水调脂胶囊对其具有明显的抑制作用, 其中以 20% 含药血清作用最强 ($P < 0.01$), 维生素 E 与 5% 和 10% 含药血清作用相当 (表 2, Table 2)。

2.3 平滑肌细胞胞膜蛋白激酶 C 活性

氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 作用后, 平滑肌细胞胞膜 PKC 活性显著增加, 与空白组比较有显著

性差异 ($P < 0.01$), 20% 含药血清可降低 ox-LDL 引起的 PKC 活性升高 ($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。

表 1. 沥水调脂胶囊对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞胞质内游离钙离子浓度的影响

Table 1. Effect of Li Shui Tiao Zhi capsule on Ca^{2+} concentration of endothelial cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	荧光强度
空白组	6.82 ± 1.03^b
天然低密度脂蛋白组	7.84 ± 1.90^b
氧化型低密度脂蛋白组	16.00 ± 1.99
维生素 E 组	10.70 ± 2.60^a
20% 含药血清组	7.44 ± 0.67^b
10% 含药血清组	10.19 ± 2.18^a
5% 含药血清组	9.36 ± 1.57^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与氧化型低密度脂蛋白组比较。

表 2. 沥水调脂胶囊对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞胞质内游离钙离子浓度的影响

Table 2. Effect of Li Shui Tiao Zhi capsule on Ca^{2+} concentration of smooth muscle cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	荧光强度
空白组	4.69 ± 1.55^b
天然低密度脂蛋白组	7.47 ± 2.36^a
氧化型低密度脂蛋白组	9.60 ± 0.08
维生素 E 组	7.05 ± 0.87^a
5% 含药血清组	6.68 ± 1.82^a
10% 含药血清组	7.85 ± 0.99^a
20% 含药血清组	5.39 ± 0.46^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与氧化型低密度脂蛋白组比较。

表 3. 沥水调脂胶囊对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞膜蛋白激酶 C 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3. Effect of Li Shui Tiao Zhi capsule on the activation of member PKC of smooth muscle cells induced by ox-LDL

分 组	蛋白激酶 C
空白组	0.0214 ± 0.0033^b
氧化型低密度脂蛋白组	0.2278 ± 0.0487
维生素 E 组	0.0488 ± 0.0088^b
20% 含药血清组	0.1175 ± 0.0368^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与氧化型低密度脂蛋白组比较。

3 讨论

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)可引起细胞内游离钙浓度升高,同时造成内皮细胞损伤,因此认为 Ca^{2+} 信号转导通路的激活是 ox-LDL 致内皮损伤的机制之一^[6,7]。本实验结果发现,沥水调脂胶囊可抑制 ox-LDL 引起的内皮细胞、平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高。 Ca^{2+} 是重要的第二信使,与其它许多通路密切相关,并可诱导某些基因的表达。bcl-2 家族蛋白

是调节细胞凋亡的关键元件,是在细胞凋亡过程中起重要作用的一类蛋白质。bcl-2 可抑制细胞凋亡过程中 Ca^{2+} 的重新分布,抑制内质网释放 Ca^{2+} ,增强线粒体摄取 Ca^{2+} 的能力,并抑制胞浆内 Ca^{2+} 流入胞核内。在以往对沥水调脂胶囊的研究中发现^[8],该药可以上调 ox-LDL 作用下 bcl-2 蛋白的表达。因此我们认为,沥水调脂胶囊降低 ox-LDL 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高可能与其调节 bcl-2 的表达有关。实验中发现,沥水调脂胶囊可显著降低 ox-LDL 引起的平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高,20% 含药血清对胞质内钙离子浓度的降低最为有效,而 PKC 又大多为 Ca^{2+} 依赖性,因此在对 PKC 活性的测定中,选择了 20% 浓度进行观察。而 PKC 从胞浆转位至胞膜是其激活的标志,静息状态下 80% PKC 在胞浆中,PKC 活化主要通过浆-膜转移方式而实现,胞浆内轻度改变可以引起胞膜明显改变。因此实验中选择测定胞膜的活性。结果发现沥水调脂胶囊可降低 ox-LDL 诱导的 PKC 活性的升高。我们已发现,沥水调脂胶囊可明显下调高脂组动物主动脉 c-myc mRNA 的表达,上调 p53 mRNA 的表达^[9]。 c-myc 基因属早期应答基因,受血小板源生长因子等多种有丝分裂原刺激后,呈快速诱导方式表达,其产物作为转录因子可调节其它基因的表达,以介导细胞外信号在细胞水平的应答效应,参与细胞增殖。而 p53 是一种重要的抑癌基因,野生型 p53 蛋白可激活 WAF1/CIP1 基因,该基因产物 p21 具有 G_1 期阻滞作用。因此我们认为,沥水调脂胶囊可能通过降低 Ca^{2+} 浓度的升高从而抑制 PKC 活性并影响上述基因的表达,达到抑制血管平滑肌细胞增殖的作用。

中医认为 As 是痰瘀同病之症,以痰瘀互阻证为多。有“痰瘀同源”、“痰瘀相关”之说。我们曾报导血中总胆固醇、甘油三酯和 LDL 升高是高脂血症痰浊的主要特征和生物化学物质基础,并认为血清过氧化脂质是中医冠心病血瘀和痰浊两证的中心环节及“痰瘀相关”的生物化学物质基础,细胞的损伤是由痰致瘀的主要病理特征,而脂质代谢紊乱及引起脂质代谢紊乱的内外因素是其病因所在^[10,11]。LDL 的氧化修饰产物 ox-LDL 可以引起与细胞凋亡、增殖密切相关的细胞信号传递分子 Ca^{2+} 、PKC 活性的显著升高,可以认为是由痰致瘀的重要途径之一,为“病理产物的痰在某些物理、化学因素激发下发生了某些化学反应或物理变化后改变了本身的化学结构和性质,转变为新的致病因子”理论提供了较好的证据^[12]。由痰致瘀的关键是“气”的转枢作用。具有健脾理气功效的沥水调脂胶囊可以减弱或抑制 ox-

LDL 引起的细胞内 Ca^{2+} 和 PKC 活性的显著升高,表明健脾理气在抗氧化应激调节细胞的早期信号传递通路方面具有重要功能,为“气可能和体内氧化作用有某种关联”^[13] 提供了初步的证据。

[参考文献]

- [1] 周瑕菁, 宋剑南, 王宇辉, 滕静茹, 牛晓红, 金红, 李爱华, 等. 痰瘀同治对实验性高脂血症大鼠血管内皮的保护作用. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3 (4): 26-28
- [2] 李亚俊, 宋剑南, 周瑕菁, 牛晓红, 金红, 王宇辉, 等. 脂泰胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔内皮素及一氧化氮合酶基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 4-8
- [3] 牛晓红, 金红, 宋剑南. 健脾祛痰化痰方药-沥水调脂胶囊抗低密度脂蛋白氧化修饰作用的研究. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8 (10): 12-14
- [4] 刘卫红, 宋剑南, 陈杲, 李玉梅, 迟旭生. 沥水调脂胶囊对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡的影响. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9 (1): 24-26
- [5] 吴捷莉, 冯友梅, 从容, 宗义强, 王淳本, 冯宗忱. 甲基莲心碱在体外对抗脂蛋白的氧化. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 40-43
- [6] Mabile L, Fitoussi G, Periquet B, et al. α -Tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. *Free Radical Biology Medicine*, 1995, 19 (2): 177-187
- [7] Nègre-Salvayre A, Fitoussi G, Reaud V, et al. A delayed and sustained rise of cytosolic calcium is elicited by oxidized LDL in cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett*, 1992, 299: 60-65
- [8] 刘卫红, 宋剑南, 李玉梅, 庞大本, 迟旭生, 陈杲. 沥水调脂胶囊对氧化型低密度脂蛋白影响人脐静脉内皮细胞 bcl-2、bax、p53 和 caspase-3 蛋白表达的调节. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9 (8): 13-19
- [9] 薛士滨, 宋剑南, 周瑕菁, 何丽, 牛晓红, 金红, 王宇辉, 等. 痰瘀同治方药脂泰胶囊抗动脉粥样硬化的机理. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4 (12): 29-31
- [10] 宋剑南, 刘东远, 牛晓红, 金红, 李爱华. 高脂血症与中医痰浊关系的实验研究. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1 (1): 49-51
- [11] 宋剑南, 刘东远, 李爱华, 牛晓红, 金红. 脑血康的化痰祛痰功能与抗脂质过氧化作用的关系. 中国医药学报, 1993, 8 (增刊): 47-49
- [12] 宋剑南. 从生化角度看痰及痰瘀相关. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6 (3): 40-43
- [13] 宋剑南. “气”在痰瘀相关过程中的物质基础. 中医杂志, 2001, 42 (4): 242-243

(此文编辑 文玉珊)