血脉宁对血管内皮细胞的保护及 E-选择素的影响※

□ 陈 民*

（辽宁中医药大学附属医院 辽宁 沈阳 110032）

摘 要 目的：研究血脉宁颗粒对血管内皮细胞（ECV）的保护及 E-选择素（E-selectin）表达的影响，以探讨血脉宁保护血管内皮细胞的机理。方法：以高脂血清、高脂血清加含药血清培养内皮细胞；ELISA 法检测培养上清液 vWF、TXB_2、PGI_2 含量，RT-PCR 检测 E-Selectin mRNA 表达，Western-Bloting 检测 E-Selectin 蛋白。结果：造模组 ECV vWF、TXB2 增加、PGI_2 下降、E-选择素表达明显增高；血脉宁组 vWF、TXB_2 低于造模组、PGI_2 高于造模组、E-选择素表达明显低于造模组。结论：血脉宁含药血清可以使高脂血清损伤的 ECV vWF、TXB_2 含量下降、PGI_2 含量升高、E-选择素表达下降；血脉宁具有保护损伤 ECV 的作用，其机理与其降低 vWF、调整 TXB_2、PGI_2 含量、降低 ECV E-选择素表达有关。

关键词 血脉宁颗粒 血管内皮细胞 E-选择素

1 材料与方法

1.1 高脂血清与含药血清的制备 高脂饲料加地塞米松注射方法造成高脂血证大鼠模型，制作高脂血清；雄性 Wistar 大鼠灌服血脉宁高剂量、常规剂量，制作血脉宁含药血清[1]。

1.2 细胞培养及分组 生长良好的内皮细胞，吸去培养液，加 1ml 0.25% 胰蛋白酶，轻轻晃动培养瓶，使胰蛋白酶覆盖整个瓶底。室温（25℃以上）消化 3～5 分钟，镜下见细胞质回缩，细胞间隙增大时，加 2ml 含血清培养液，终止消化。弯头吸管吸取瓶内培养液，反复吹打瓶壁细胞，制成单个细胞悬液，计数细胞数量，调整细胞数至 5×10^6，根据不同实验方法，分别装入培养瓶及培养版中，补足培养液，37℃、5% CO_2 孵育 24 小时，倒置相差显微镜下观察细胞贴壁生长良好，按分组以不同比例、不同成分血清培养液，37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下分别培养 24 小时、48 小时。

24 小时：

正常组：ECV + 小牛血清 10%——24H

※**基金项目** 辽宁省科技厅博士科研启动基金资助项目（项目编号：20051030）。

*作者简介 陈民，女，医学博士，主任医师，教授。辽宁中医药大学干诊科主任，研究方向：中医药防治动脉粥样硬化性疾病。

空白组：ECV + 正常鼠血清 20%——24H

对照组：ECV + 高脂血清 10% + 正常鼠血清 10%——24H

造模组：ECV + 高脂血清 20%——24H

中药组（常）：ECV + 高脂血清 10% + 中药血清（高）10%——24H

中药组（高）：ECV + 高脂血清 10% + 中药血清（常）10%——24H

西药组：ECV + 高脂血清 10% + 西药血清 10%——24H

48 小时：

正常组：ECV + 小牛血清 10%——48H

空白组：ECV + 正常鼠血清 20%——24H 去上清 + 正常鼠血清 20%——24H

对照组：ECV + 高脂血清 20%——24H 去上清 + 正常鼠血清 20%——24H

造模组：ECV + 高脂血清 20%——24H 去上清 + 高脂血清 20%——24H

中药组（常）：ECV + 高脂血清 20%——24H 去上清 + 中药血清（常）20%——24H

中药组（高）：ECV + 高脂血清 20%——24H 去上清 + 中药血清（高）20%——24H

西药组：ECV + 高脂血清 20%——24H 去上清 + 西药血清 20%——24H

1.3 酶联免疫法（ELISA）检测培养上清液 vWF、TXB_2、PGI_2 含量生长良好的内皮细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，以 5×10^6 个细胞/孔接种于 96 孔板的细胞培养板，待细胞融合生长，加培养液及施加因素（分组方法同上），37℃ 5% CO_2 孵育 24 小时，酶标仪分别检测培养液上清中 vWF、TXB_2、PGI_2 含量。

1.4 RT-PCR 方法检测 ECV E-s mRNA 取培养好的细胞，浓度约 5×10^6。用 Trizol 抽提总 RNA，紫外分光光度计测定浓度。按以下条件配制反转录反应液：$MgCl_2$ 4μl、10 × RNA PCR Buffer 4μl、RNase Free dH_2O 8.5μl、dNTP Mixture（各 10mM）2μl、RNase Inhibitor 0.5μl、AMV Reverse Transcriptase × 1 1μl、Random 9 mers 1μl、实验样品 RNA 1μg。按以下条件进行反转录反应：30℃ 10 分钟，45℃ 30 分钟，99℃ 5 分钟，5℃ 5 分钟，以生成 cDNA。PCR 扩增 E-Selectin 片断（186bp），以 β-actin（532bp）做内参。引物序列：E-Selectin 上游：5'- AGT AAT AGT CCT CCT CAT CAT G-3,；下游：5'- ACC ATC TCA AGT GAA GAA AGA G-3，[2]。β-actin 上游：5'-AAG GAT TCC TAT GTG GGC-3,；下游：5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3,。（由宝生物大连有限公司合成）。PCR 反应体系：$MgCl_2$ 6μl、10 × RNA PCR Buffer 8μl、灭菌蒸馏水 63.5μl、TaKaRa Taq0.5μl、上游特异性 PCR 引物 10μl、下游特异性 PCR 引物 10μl。反应条件：94℃预变性 2 分钟开始循环，94℃ 30 秒→52℃ 30 秒→72℃ 1 分钟，共 30 Cycles。最后 72℃充分延伸 10 分钟。2% 琼脂糖电泳（150v 30min），溴已锭浸泡 10 分钟，凝胶仪成像，Alpha Innotech 凝胶图像采集系统分析。以上反应重复三次，均取得一致结果。

1.5 Western-Bloting 检测内皮细胞 E-Selectin 蛋白的表达 经裂解膜蛋白，酚试剂法定蛋白浓度，调定蛋白浓度后，以聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离蛋白。以湿式电泳槽，遵循膜在正极，胶在负极原则，50V 100mA 2 小时转印至将硝酸纤维素膜上。封闭液封闭硝酸纤维素膜。山羊抗人 E-Selectin 多克隆抗体以 1：300 稀释（用含 1% BSA 的 TTBS（T-Tween-20）），4℃孵育过夜，TTBS 洗涤 5 分钟 ×2 次。辣根过氧化物标记兔抗山羊 IgG 稀释成 1∶5000），室温孵育 2 小时，取出后 TTBS 洗涤 5 分钟 ×2，再以 TBS 洗涤 5 分钟。加入发光试剂 1 分钟，暗盒内曝光 1 分钟，显影 5 分钟，定影 5 分钟。凝胶图像采集系统（Alpha Innotech）分析结果。

1.6 统计方法 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用方差分析，应用 SPSS10.0 软件处理。

2 结果

2.1 培养液 vWF 含量测定结果 见表 1。

表 1 vWF 含量结果（$\bar{x}\pm s$）

分组	24 小时	48 小时
空白组	0.057 ± 0.000 *#	0.064 ± 0.000 *#
对照组	0.456 ± 0.003 *	0.477 ± 0.010 *
造模组	0.639 ± 0.002 #△	0.809 ± 0.003 #△
中药组（常）	0.301 ± 0.003 *#	0.350 ± 0.004 *#
中药组（高）	0.123 ± 0.000 *#	0.232 ± 0.001 *#
西药组	0.327 ± 0.003 *#	0.436 ± 0.025 *#

注：与造模组比较，$*P<0.05$；与对照组比较，$\#P<0.05$；造模组 24 小时与 48 小时比较，$\triangle P<0.05$。

2.2 培养液 TXB2、PGI2 含量测定结果 见表 2。

表 2 TXB_2、PGI_2 含量结果（$\bar{x} \pm s$）

分组	TXB_2		PGI_2	
	24 小时	48 小时	24 小时	48 小时
空白组	0.946 ± 0.027 ＊#	13.375 ± 1.097 ＊#	59.935 ± 0.645 ＊#	46.873 ± 0.089 ＊#
对照组	64.583 ± 3.040 ＊	108.833 ± 5.317 ＊	8.222 ± 0.124 ＊	6.973 ± 0.134 ＊
造模组	125.167 ± 6.014#△	147.167 ± 12.875#	4.670 ± 0.047#△	3.847 ± 0.079#
中药组（常）	32.000 ± 3.886 ＊#	53.717 ± 1.030 ＊#	31.523 ± 0.285 ＊#	29.012 ± 0.135 ＊#
中药组（高）	22.792 ± 1.491 ＊#	41.133 ± 3.204 ＊#	40.295 ± 0.409 ＊#	35.495 ± 0.202 ＊#
西药组	62.183 ± 5.608 ＊#	74.733 ± 3.496 ＊#	13.643 ± 0.121 ＊#	10.342 ± 0.161 ＊#

注：与造模组比较，＊$P < 0.05$；与对照组比较，#$P < 0.05$；造模组 24 小时与 48 小时比较；△$P < 0.05$。

2.3 血脉宁对 EC E -Selectin mRNA 影响（RT-PCR） 见图 1、2。

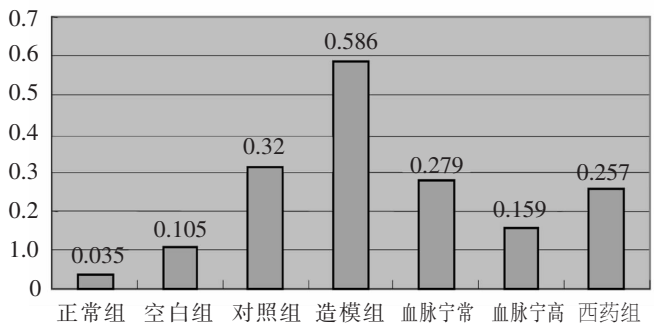

图 1 血脉宁对 EVC EsRNA 影响 48h

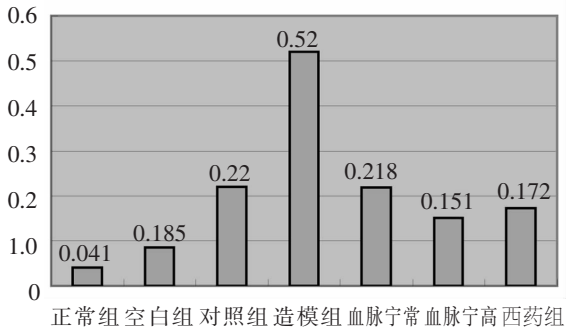

图 2 血脉宁对 EVC EsRNA 影响 24h

2.4 血脉宁对 ECV E-Selectin 蛋白影响（Western-Bloting） 见图 3、4。

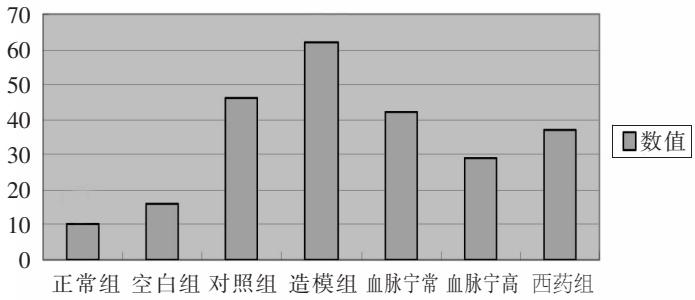

图 3 血脉宁对 EVC E-Selectin 蛋白影响 24h

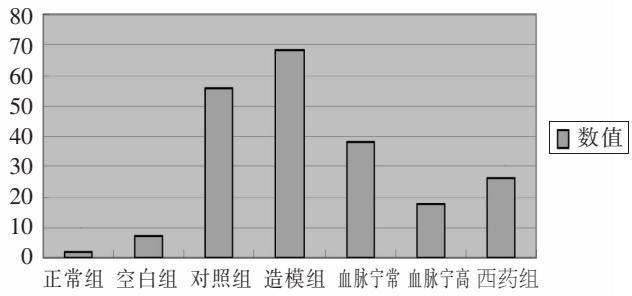

图 4 血脉宁对 EVC E-Selectin 蛋白影响 48h

3 讨论

血管内皮细胞在血液和组织之间提供了一个选择性透过屏障和非血栓形成表面。近年来细胞培养等离体组织培养方法的不断进展，使血管内皮细胞损伤的离体研究不断深入，因此对于血管内皮细胞损伤的模型的研究也随之不断深入，尤其是应用中药单方、复方对内皮细胞损伤的研究方面[3,4]，更进一步从离体实验中观察了中医的证型与现代研究的内皮损伤有机结合，对于阐明中药防治动脉硬化的机理具有

重要意义。

vWF 由血管内皮细胞及巨核细胞合成和分泌，是一种存在于血浆、内皮细胞表面和血小板 α 颗粒的糖蛋白。当内皮细胞损伤、变性、脱落等时，内皮细胞产生 vWF 增多。在各种血管性疾病中得到广泛证实，vWF 水平的增加是血管内皮细胞损伤的标志物之一[5]。（TXA_2）是由血小板微粒体合成并释放的一种具有强烈促进血管收缩和血小板聚集的生物活性物质，除血小板外，内皮细胞也能合成和释放 TXA_2；前列环素$_2$（PGI_2）是由血管壁内皮细胞合成和释放的一种抗血小板聚集和舒张血管的生物活性物质[6,7]。TXA_2 和 PGI_2 在正常情况下处于动态平衡，对血管状态和血小板功能具有强烈的相反的生物学作用，参与机体生理调节和多种病理过程。但两者极不稳定，迅速转变为稳定但无生物活性的 TXB_2 和 6-酮-$PGF_{1\alpha}$，因此，测定 TXB_2 和 6-酮-$PGF_{1\alpha}$可以反应血中或培养上清中 TXA_2、PGI_2 的浓度[8]。E 选择素又称内皮白细胞粘附分子－1，为表达于炎症部位内皮细胞上的粘附分子，其功能主要是介导白细胞在内皮细胞表面的滞留和滚动，以及随后迁移到炎症部位[9]，在活化后的内皮细胞上表达，是内皮细胞受损的标志[10]。

本实验以高脂血清培养血管内皮细胞，可见造模组与对照组比较其培养液中 vWF、TXB_2 升高，PGI_2 降低，E-Selectin mRNA 表达、E-Selectin 蛋白表达增加，透射电镜下见线粒体肿胀，嵴消失，内质网扩张，细胞核切迹等损伤改变，表明高脂血清引起血管内皮细胞损伤。

血脉宁药物组成有黄芪、党参、绞股兰、丹参、赤芍、茯苓、半夏、菖蒲、川芎等，具有祛痰化瘀的功效。实验结果表明，血脉宁与阿托伐他汀药物血清组与造模组比较，其培养液中 vWF、TXB_2 降低，PGI_2 升高，EC 表面 E-Selectin mRNA 表达、E-Selectin 蛋白表达下降，透射电镜下可见 EC 损伤性改变好转；血脉宁组优于阿托伐他汀，且其高剂量组优于常剂量组。从实验结果可见，血脉宁具有防治高脂血清对 EC 的损伤，改善 EC 形态，保护 EC 功能的作用。其作用机理与其降低 EC vWF、TXB_2 含量，提高 PGI_2 含量，调整 TXB_2、PGI_2 平衡，降低 E-选择素表达的作用有关。血脉宁保护 EC 为其防治 AS 的主要作用机理之一。

参考文献

[1] 陈　民. 血脉宁颗粒对血管内皮细胞表面 P-选择素表达的影响[J]. 中医药学刊，2004，(5)：151－152.

[2] Katrin Wenzel . Rita Hanke . Astrid Speer. Polymorphism in the human E－selectin gene detected by PCR－SSCP [J]. Hum Genet，1994，94：452－453.

[3] 陈云波，王　奇，王培训，等. 血瘀证兔模型血管内皮细胞培养的形态结构改变初探[J]. 中国中医基础医学杂志，1999，5 (5)：12－16.

[4] 李凤文，血管内皮细胞损伤模型的复制及其在血瘀与活血化淤研究中的应用[J]. 北京实验动物科学与管理，1994，11 (3)：39－44.

[5] Lip Gregery Y H，Alann A，von Willebrand Factor：a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders [J]. Cardiovascular Research，1997，34：255－265.

[6] Johnson B F，Wiley K N，Greaves M，et al. Vrinary thromboxane and 6－keto－prostaglandin F 1 alpha are early markers of acute rejection in experimental pancereas transplantation [J]. Transplantation.，1994，58 (1)：18－23.

[7] Delacxue JP，M A，Blanco E，et al Effect of erythrocytes and prostacyclin activation in human whole blood in vitro [J]. Thromb Res，1997，86 (6)：515－524.

[8] 王喜山，旺兆铖，体内血栓烷与前列环素的酶代谢产物及其临床意义[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册，1996，17 (2)：78－80.

[9] Pressner KT，May AE，Wohn KD，et al. Molecular adhesion receptors and proteolytic cascade in vascular remodelling [J]. Thromb Hemost，1997，78 (1)：88.

[10] Caulin GT，FarrellWJ，Pfau SE，et al. Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausalwomen with coronary artery disease [J]. J Am Coll Cardiol，1998，31 (7)：560.