

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01211

白花丹参上调 Bcl-2 抑制内皮细胞凋亡

于长凯^{1,2}, 张晓艳², 高允生^{1*}

1. 泰山医学院药学院药理学教研室, 泰安 271016

2. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 连云港 222006

[摘要] **目的** 研究白花丹参对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)凋亡的抑制作用及对凋亡相关基因 Bcl-2 表达的调节。**方法** 应用酶消化灌注法分离人脐静脉血管内皮细胞, 采用形态学观察和Ⅷ因子抗体免疫荧光检测法进行鉴定。取对数生长期的细胞分组进行干预(白花丹参高剂量组 0.10 g/ml, 白花丹参低剂量组 0.01 g/ml), 应用流式细胞技术观察细胞凋亡情况, 应用免疫细胞荧光技术检测凋亡相关基因 Bcl-2 的表达。**结果** 在白花丹参干预下, H₂O₂ 诱导的 HUVEC 凋亡率降低(高剂量组 $P < 0.01$, 低剂量组 $P < 0.05$), 高剂量组 Bcl-2 的表达增加($P < 0.01$)。**结论** 白花丹参对 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 凋亡具有抑制作用, 这种作用与 Bcl-2 表达上调有关。

[关键词] 白花丹参; 脐静脉; 内皮细胞; 细胞凋亡; bcl-2 基因

[中图分类号] R 972.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1211-04

Salvia miltiorrhiza bge. f. *alba* up-regulates Bcl-2 and inhibits apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

YU Chang-kai^{1,2}, ZHANG Xiao-yan², GAO Yun-sheng^{1*}

1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Taishan Medical University, Taian 271016, Shandong, China

2. Lianyungang Branch of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222006, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To study the influence of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. *alba*(SMA) on apoptosis and Bcl-2 expression in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) *in vitro*. **Methods** HUVECs were isolated using perfusion and enzyme digestion methods, and the obtained cells were identified by morphological observation and Ⅷ: Ag immunoreactivity examination. The cells in the exponential phase of growth were treated with H₂O₂ and different concentrations of SMA (high dose: 0.10 g/ml, low dose: 0.01 g/ml). The cell apoptosis was determined by flow cytometric analysis and Bcl-2 expression was examined by immunofluorescence method. **Results** SMA significantly decreased the H₂O₂-induced apoptosis of HUVECs ($P < 0.01$ in high dose group and $P < 0.05$ in low dose group), and significantly increased the expression of Bcl-2 in high dose group ($P < 0.01$). **Conclusion** SMA can inhibit H₂O₂-induced apoptosis of HUVEC, which might be associated with the increase of Bcl-2 expression.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza* bge. f. *alba*; umbilical veins; endothelial cell; apoptosis; bcl-2 genes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(11):1211-1214]

白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* bge. f. *alba*)为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* bge.)的白花变型, 主要分布于泰山及其周边地区, 属珍稀濒危药用植物^[1]。文献^[2]报道白花丹参有较强的血管扩张作用, 对高血脂症和动脉粥样硬化具有显著疗效, 对血栓闭塞性脉管炎具有独特疗效, 而血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)损伤是以动脉粥样硬化为基础的众多心脑血管疾病的始动环节或关键

因素^[3]。前期实验显示, 白花丹参对过氧化氢所致人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)损伤具有保护作用^[4], 本实验旨在对这种保护作用的机制加以探讨。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器 白花丹参根: 采自泰山东麓, 并经泰山医学院药学院中药学教研室鉴定确认; 正常分娩后的健康新生儿脐带, 山东泰安市中心医

[收稿日期] 2010-03-05 [接受日期] 2010-09-19

[基金项目] 山东省教育厅科研基金(J04E07). Supported by Research Foundation of Education Department of Shandong Province (J04E07).

[作者简介] 于长凯, 硕士. E-mail: lygyck2009@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0538-6229756, E-mail: ysgao@tsmc.edu.cn

院分娩室提供; DMEM/F12 培养基, 美国 Sigma 公司; 胎牛血清, 美国 Invitrogen 公司; 胶原酶 I, 美国 Invitrogen 公司; H_2O_2 (30%, AR 级), 天津四通化工公司产品, 临用前稀释, 并在 5 min 内使用; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒, 北京宝赛生物技术有限公司; 兔抗人 VIII 因子抗体; 武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗人 Bcl-2 抗体; 北京宝赛生物技术有限公司; FITC 标记山羊抗兔 IgG; 武汉博士德生物工程有限公司; 激光共聚焦显微镜, 美国 Bio-Red 公司(型号 Radiance 2100); 超速低温离心机; 美国 Beckman-CoulterSigma 公司(型号 LE-80K); 倒置荧光显微镜; 日本 OLYMPUS 公司(型号 IX71); 流式细胞仪; 美国 B-D 公司(型号 FACS-Calibur); IPP 通用医学图像分析系统; MEDIA CY-BERBNETCS 公司(型号 ipwin32)。

1.2 血管内皮细胞的培养和鉴定 参照 Jaffe 等^[5]的方法, 取新生儿脐带(长度为 20~30 cm), 冲洗干净。注入 0.1% 的胶原酶 I 溶液 10 ml, 37℃ 消化 15 min, 收集消化液并用 10 ml 培养液冲洗管腔, 56×g 离心 10 min, 重悬细胞, 以 1×10^5 /ml 接种于培养瓶中, 置 37℃、5% CO_2 培养。约 1 周后可传代, 2 代内用于实验。原代培养的细胞培养 5~7 d 后, 倒置显微镜下观察细胞的形态。

在 6 孔板里放入盖玻片, 调整细胞密度为 $(1 \sim 3) \times 10^4$ /ml, 每孔接种 1 ml, 待 3~5 d 后细胞均匀铺满孔底, PBS 冲洗; 95% 冰乙醇固定; 将稀释的兔抗人 VIII 因子抗体小心加入到盖玻片上, 37℃ 孵育 1 h; 吸出液体, PBS 冲洗 3 次; 加入稀释的荧光素 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体, 37℃ 孵育 1 h; 吸出液体, 在激光共聚焦显微镜下观察、摄片。

1.3 白花丹参提取物的制备 称取白花丹参粉末 100 g, 蒸馏水浸泡, 文火煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 用布氏漏斗抽滤; 用旋转蒸发仪浓缩至 100 ml。得 1.0 g/ml 的白花丹参水提取物, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌后于 4℃ 保存, 备用, 用含血清培养液稀释成相应浓度(按生药含量计算)用于实验。

1.4 分组与处理 取处于对数生长期的 HUVEC, 按如下条件分组处理: (1) 对照组: 加入 DMEM/F12 培养基; (2) 模型组: 加入 DMEM/F12 培养基和 H_2O_2 ; (3) 白花丹参高剂量组与 (4) 白花丹参低剂量组: 加入 DMEM/F12 培养基、 H_2O_2 和白花丹参提取液。使 (2)、(3)、(4) 组中 H_2O_2 的浓度均为 2.0 mmol/L。使 (3)、(4) 组中白花丹参浓度分别为 0.10

g/ml 和 0.01 g/ml, 各组继续培养 4 h。

1.5 流式细胞技术检测血管内皮细胞凋亡 干预结束后, 胰蛋白酶消化, 制备 1×10^6 /ml 细胞悬液, 取 1 ml 转移至离心管; 56×g, 4℃ 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 ml 冷 PBS, 56×g, 4℃ 离心 10 min, 重复 3 次, 200 μ l 结合液重悬细胞; 加入 10 μ l Annexin V 和 5 μ l PI, 轻轻混匀, 避光室温染色 15 min; 加入 300 μ l 结合液, 上机检测细胞凋亡情况。试验重复 3 次, 取平均值。

1.6 白花丹参对血管内皮细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 干预结束后, 收集细胞, 制备单细胞悬液, 加入兔抗人 Bcl-2 抗体, 37℃ 作用 30 min, PBS 洗涤 1 次, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体, 4℃ 避光孵育 45 min, PBS 洗涤 1 次, 用 PBS 重悬, 取 20 μ l 涂片, 在荧光显微镜下观察摄片, 每组 7 张, 应用荧光显微镜图像采集处理系统进行分析, 比较各组平均荧光强度。

1.7 统计学处理 选用 SAS 8.1 统计软件进行统计学处理, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用单因素方差分析等进行统计。组间比较采用 q 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 HUVEC 的鉴定 HUVEC 接种于培养瓶 12 h 后, 大部分已贴壁, 5~7 d 后细胞已基本融合、呈特征性的“铺路石”样镶嵌排列(图 1A)。免疫细胞荧光技术鉴定 HUVEC: 共聚焦显微镜下可见细胞核周围呈黄绿色发亮荧光, 95% 以上的细胞呈特征性的阳性反应, 见图 1B。

2.2 白花丹参对 H_2O_2 诱导 HUVECs 凋亡的影响 经流式细胞仪检测, 正常对照组凋亡率为 $(7.93\% \pm 1.45\%)$; H_2O_2 损伤模型组凋亡率为 $(40.63\% \pm 3.48\%)$; 与正常对照组($n=3$)相比, H_2O_2 损伤模型组凋亡率增高($P < 0.01$)。白花丹参高剂量组与白花丹参低剂量组的凋亡率分别为 $(15.47\% \pm 5.20\%)$ 和 $(31.08\% \pm 1.93\%)$ 。与 H_2O_2 损伤模型组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$), 即白花丹参各剂量组明显抑制了 H_2O_2 的作用, 降低了血管内皮细胞的凋亡率, 见图 2。

2.3 白花丹参对血管内皮细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 结果显示, 正常对照组的平均荧光强度为 19.33 ± 1.17 ; H_2O_2 损伤模型组的平均荧光强度为 14.61 ± 0.53 , 与正常对照组相比, H_2O_2 损伤模型组 Bcl-2 平均荧光强度降低有统计学意义($P < 0.01$), 提示 H_2O_2 损伤模型组细胞 Bcl-2 表达明显减少。白花丹参高剂量组与白花丹参低剂量组的平均荧光强

度分别为 20.78 ± 1.88 和 15.40 ± 0.38 。白花丹参高剂量组与 H_2O_2 损伤模型组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示高浓度和中浓度的白花丹参明显抑制了 H_2O_2 的作用, 使血管内皮细胞 Bcl-2 蛋白表达增加, 使平均荧光强度增高; 而白花丹参低剂量组与 H_2O_2 损伤模型组相比, 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3。

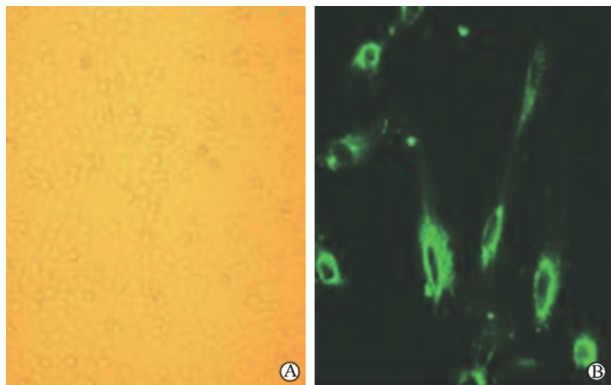


图 1 HUVEC 的鉴定

Fig 1 Identification of HUVECs

A: Morphological identification; B: W factor staining identification. Original magnification: $\times 100$ (A); $\times 400$ (B)

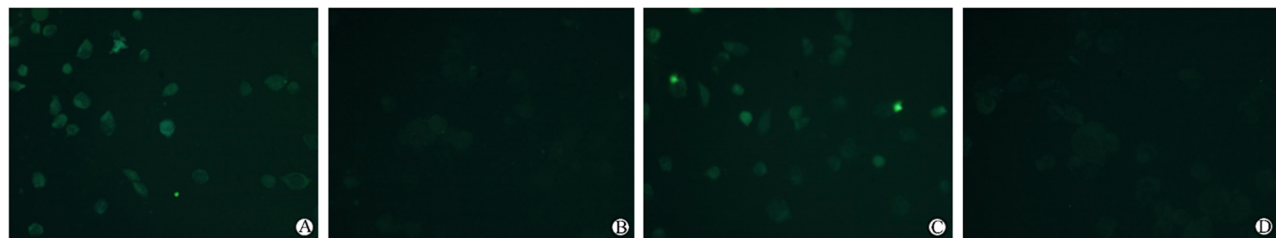


图 3 白花丹参提取物对 HUVEC 凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达的影响

Fig 3 Influence of *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba (SMA) on expression of apoptosis related gene Bcl-2 in HUVECs

A: Control; B: Model; C: SMA 0.10 g/ml; D: SMA 0.01 g/ml. Original magnification: $\times 100$

3 讨论

白花丹参对血管内皮细胞具有保护作用^[4], 但相关机制未明。而血管内皮细胞凋亡与心、脑血管疾病密不可分, 故推测白花丹参可能通过抑制血管内皮细胞凋亡、进而保护其活性。本研究选用流式细胞技术检测了白花丹参对血管内皮细胞凋亡情况的影响。本实验结果表明: 白花丹参可显著降低由 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞的凋亡率, 而且白花丹参的剂量越高, 血管内皮细胞凋亡率降低越明显。提示白花丹参是过抑制血管内皮细胞凋亡这一机制来保护血管内皮细胞。

细胞凋亡的发生和调控是一个极其复杂的系统, 其机制尚未完全清楚。但已证明受多个基因的

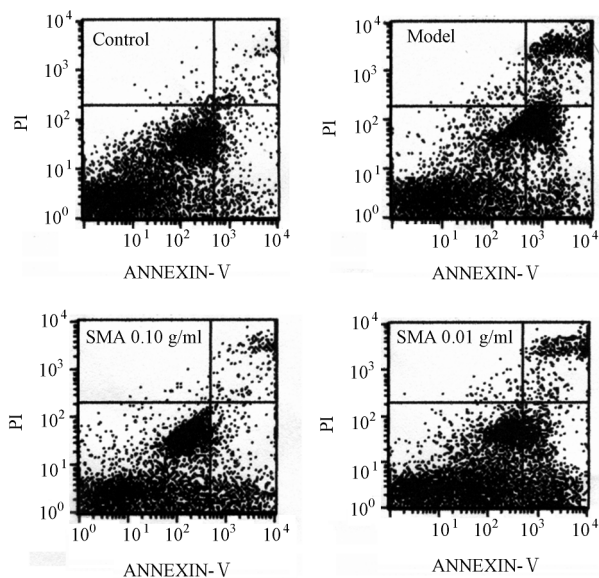


图 2 白花丹参抑制人血管内皮细胞凋亡的作用

Fig 2 Inhibitory effect of SMA on apoptosis of human vascular endothelial cells

PI⁻/Annexin V⁻: Living cells; PI⁺/Annexin V⁻: Mechanically damaged cells; PI⁺/Annexin V⁺: Later apoptotic and necrotic cells; PI⁻/Annexin V⁺: Early apoptotic cells. Control: DMEM/F12; Model: DMEM/F12+ H_2O_2 ; SMA: *Salvia miltiorrhiza* bge. f. alba.

调控, 其中 Bcl-2 基因及其表达的 Bcl-2 蛋白在凋亡的调控中具有重要的作用^[6-8], 是研究得最早、也是研究得比较清楚的凋亡相关基因和蛋白之一。本实验通过检测 Bcl-2 蛋白的平均荧光强度来评价 Bcl-2 的表达情况, 结果显示: 经白花丹参作用的血管内皮细胞 Bcl-2 表达显著增加, 而且白花丹参的剂量越高, 血管内皮细胞表达的 Bcl-2 蛋白越多。可见, 白花丹参使血管内皮细胞表达的 Bcl-2 蛋白增多, 而 Bcl-2 表达的增加抑制了血管内皮细胞凋亡。这与相关报道^[9-11]符合。而且, 结果显示白花丹参高剂量组的 Bcl-2 表达量增加明显, 甚至超过了对照组, 这说明白花丹参对 Bcl-2 表达的促进作用很强, 只要白花丹参达到一定的剂量, 就可以消除由于 H_2O_2 的作用而使 Bcl-2 表达下降的程度。但是, 白花丹参

低剂量组与 H₂O₂ 损伤模型组之间在 Bcl-2 表达没有明显差别,而从降低细胞凋亡率的结果来看,白花丹参低剂量组对血管内皮细胞也具有很好的保护作用,推测白花丹参除通过促进 Bcl-2 表达增加外,应该尚有其他途径来抑制血管内皮细胞的凋亡,或者除抑制凋亡以外尚有其他渠道来保护血管内皮细胞免受损伤,这些有待于进一步研究证实。本研究发
 现白花丹参对 H₂O₂ 诱导的血管内皮细胞凋亡具有抑制作用,这种作用与 Bcl-2 表达上调有关。

[参考文献]

[1] 高允生,曹广超,王晓丹,齐永秀,张继国,朱玉云. 白花丹参水提物对小鼠耐缺氧能力的影响[J]. 医药导报,2006,25:975-977.
 [2] 李允尧,赵华英,陈沪宁,陈永林. 山东省白花丹参的植物资源[J]. 中药材,2000,23:69.
 [3] Quyyumi A A. Endothelial function in health and disease:new insights into the genesis of cardiovascular disease[J]. Am J Med,1998,105:32-39.
 [4] 于长凯,张晓艳,高允生. 白花丹参对过氧化氢致人脐静脉血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药物警戒,2010,7:199-201.

[5] Jaffe E A,Nachman R L,Becker C G,Minick C R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. J Clin Invest,1973,52:2745-2756.
 [6] 柳朝阳,孙鹏,苗志,张涛,王建杰. 川芎嗪抑制大鼠局灶性脑缺血损伤神经元凋亡的作用[J]. 中国老年学杂志,2010,30:1519-1521.
 [7] 王占强,贾春红,鲁杨,赵丹阳,王全才,张鸿. 二氮嗪对氧糖剥夺后 PC12 细胞凋亡及对 Bcl-2 蛋白的影响[J]. 中国药理学通报,2010,24:930-933.
 [8] 于志君,成彩莲. 脑缺血再灌注损伤中凋亡调控基因表达的变化及意义[J]. 武汉科技大学学报:自然科学版,2006,29:425-428.
 [9] 廖德荣,刘启功,程燕子,曾艳,张兹伟. 血管内皮生长因子对过氧化氢诱导的内皮细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志,2006,14:483-486.
 [10] 戴晓明,蒋凤荣,张旭,戴建国,程雪琴,江沛. 麦冬不同提取物对过氧化氢损伤人血管内皮细胞 ICAM-1、VEGF、Bcl-2 表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2008,8:2401-2404.
 [11] 陈春焯,张乾勇,易龙,金鑫,陈卡,吕静. Bcl-2 在氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. 第三军医大学学报,2009,31:663-667.

[本文编辑] 尹茶

• 书 讯 •

《中西医结合抗肿瘤》和《护理学导论》已出版

《中西医结合抗肿瘤》由黄衍强、吴孝雄、黄飞主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0081-2,32 开,定价:16.00 元。

中西医结合诊治肿瘤是肿瘤患者治愈、康复的重要手段。本书用通俗、生动的语言,结合真实病例,全面介绍了中西医结合治疗肿瘤的原理和方法,让患者真正感受到中西医结合治肿瘤的无穷魅力,使患者树立战胜癌魔的信心。本书适合肿瘤患者及其家属阅读,也可供临床肿瘤专科医务人员学习参考。

《护理学导论》由周庆华、朱春梅主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0108-6,16 开,定价:21.00 元。作为护理专业必修课程,本书可引导学生系统、全面地了解护理专业学科体系的形成、发展和构成;内容上包括从基础理论到临床应用,编写体例上以工作任务为中心进行展开,以教学实践为基础,兼顾执业考试,注意前后知识点的衔接,以期实现提高护生的基本素质、培养独立思考和创造性思维的临床护理人员之目标。本书适合高职、高专护理专业的学生使用,也可供临床工作的护理人员参考。

《中西医结合抗肿瘤》和《护理学导论》由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

http://www.smmup.com