

3 种中药复方血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响

姜 华¹, 姜玉姬²

(延边大学附属医院 1. 中医科, 2. 肾内科, 吉林省延吉市 133000)

[关键词] 中药复方血清; 人脐静脉内皮细胞; 脂多糖; 炎症因子; 动脉粥样硬化

[摘 要] 目的 研究四君子汤、血府逐瘀汤、补阳还五汤等 3 种中药复方血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)及细胞间黏附分子 1(ICAM-1)表达的影响,探讨相关中药复方防治动脉粥样硬化的机制。方法 应用药物血清学方法制备四君子汤、血府逐瘀汤、补阳还五汤含药血清及正常空白血清,以供细胞实验使用。体外培养 HUVEC,随机分为 6 组,即空白对照组、模型组、阿托伐他汀组、四君子汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组,用脂多糖刺激 2 h 后,分别加入阿托伐他汀和中药复方血清干预,24 h 后收集细胞,用荧光定量 PCR 和 Western blot 测定 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达。结果 用脂多糖刺激 HUVEC 后,引起 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$),分别以血府逐瘀汤、补阳还五汤含药血清及阿托伐他汀干预后可显著抑制 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1、ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$),而四君子汤含药血清则未见显著影响($P > 0.05$)。结论 血府逐瘀汤、补阳还五汤可抑制 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 及 ICAM-1 等炎症因子的表达,这可能是这两种中药复方防治动脉粥样硬化作用的机制之一。而四君子汤未见此作用。

[中图分类号] R2-031

[文献标识码] A

Effects of 3 Kinds of Traditional Chinese Herbal Compound Drug Serum on Expressions of Inflammatory Factors LOX-1, TNF- α , VCAM-1, and ICAM-1 Induced by Lipopolysaccharide in HUVEC

JIANG Hua¹, and JIANG Yu-Ji²

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, 2. Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

[KEY WORDS] Traditional Chinese Herbal Compound Drug Serum; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Lipopolysaccharide; Inflammatory Factor; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influences of 3 kinds of traditional Chinese herbal compound drug serum Si-junzi decoction (SD), Xuefu Zhuyu decoction (XZD) and Buyang Huanwu decoction (BHD) on the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) induced by lipopolysaccharide (LPS) in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), and to explore the mechanism of traditional Chinese medicine compound preventing and treating atherosclerosis. **Methods** For cell experiment, SD, XZD, BHD containing drug serums and normal blank serum were prepared by using drug serological method. HUVECs were cultured in vitro and divided randomly into 6 groups: blank control group, model group, atorvastatin group, SD group, XZD group and BHD group. HUVECs were stimulated with LPS for 2 h, then treated separately with atorvastatin and traditional Chinese herbal compound drug serum for 24 h. The mRNA and protein expressions of LOX-1, TNF- α , VCAM-1, and ICAM-1 were detected by fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Results** mRNA and protein expressions of LOX-1, TNF- α , VCAM-1 and ICAM-

[收稿日期] 2014-10-08

[修回日期] 2014-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160476)

[作者简介] 姜华,博士,副主任医师,研究方向为中西医结合治疗动脉粥样硬化,E-mail 为 jianghua62@163.com。姜玉姬,硕士,主治医师,研究方向为动脉粥样硬化的机制与防治,E-mail 为 jiangyuj1118@163.com。

1 were significantly increased after HUVEC stimulated by LPS ($P < 0.01$). mRNA and protein expressions of LOX-1, TNF- α , VCAM-1 and ICAM-1 were significantly inhibited, after adding respectively XZD, BHD containing drug serums and atorvastatin to intervene ($P < 0.05$). But SD containing drug serum had no significant effect ($P > 0.05$). **Conclusions** Traditional Chinese herbal compound XZD and BHD can inhibit the expressions of inflammatory factors LOX-1, TNF- α , VCAM-1 and ICAM-1, and this may be one of the mechanisms of them to prevent and treat atherosclerosis. While SD has no such role.

收载于《医林改错》中的补阳还五汤具有补气活血、通经活络的功效,临床上广泛应用于各种心脑血管疾病的治疗。研究表明,补阳还五汤具有良好的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的作用^[1-2];但补阳还五汤抗 As 的作用机理仍不明确。我们在前期研究^[3]中发现,以补阳还五汤为基础加减而成的益气活血复方对血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等炎症因子有明显的抑制作用。以前期研究结果为基础,本实验选用四君子汤、血府逐瘀汤、补阳还五汤等 3 种方剂,研究不同治法的方剂对 LOX-1、TNF- α 、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)及 ICAM-1 等炎症因子的影响,比较益气、活血化瘀及益气活血 3 种不同治法代表方剂及西药阿托伐他汀对 As 相关炎症因子影响的异同,为相关中医治法、方剂在抗 As 的临床应用及其机理探讨提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性新西兰大耳白兔 20 只,体重 2.0 ± 0.5 kg,由辽宁中医药大学实验动物中心提供。四君子汤处方:人参 9 g,白术 9 g,茯苓 9 g,甘草 6 g;血府逐瘀汤处方:桃仁 12 g,红花 9 g,当归 9 g,生地 9 g,川芎 5 g,赤芍 6 g,牛膝 9 g,桔梗 5 g,柴胡 3 g,枳壳 6 g,甘草 3 g;补阳还五汤处方:生黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,地龙 3 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g。药物由延边大学附属医院中药药剂科提供。各组方药均煎 3 次,时间分别为 1.5 h、1 h、45 min,合并煎煮液后浓缩至四君子汤含生药 200 g/L,血府逐瘀汤含生药 400 g/L,补阳还五汤含生药 800 g/L。人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)由辽宁中医药大学附属医院检验科提供。胎牛血清为 Gibco 公司产品;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为 Sigma 公司产品;阿托伐他汀纯

品为美国 LKT Laboratories 公司产品;兔抗人 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 及 ICAM-1 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 动物含药血清的制备

新西兰白兔随机分为四君子汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组、空白组,每组 5 只。3 个中药组分别以四君子汤、血府逐瘀汤、补阳还五汤灌胃,空白组以同等量的生理盐水灌胃,连续 7 天。动物给药量:四君子汤组 1.6 g/kg,血府逐瘀汤组 3.6 g/kg,补阳还五汤组 6.7 g/kg。第 8 天,心脏采血,离心后分离血清;所制备的血清分别为四君子汤血清、血府逐瘀汤血清、补阳还五汤血清、空白血清。

1.3 HUVEC 分组及干预方法

培养 HUVEC 18 h,待细胞生长融合成单层后,经过 24 h 饥饿同步化,随机分为空白对照组、模型组、阿托伐他汀组、四君子汤组、血府逐瘀汤组、补阳还五汤组等 6 组。用 LPS 刺激 HUVEC 2 h 后,分别用下列方法进行干预:(1)空白对照组:10% 空白血清 + DMEM 培养液;(2)模型组:10% 空白血清 + DMEM 培养液 + 1 mg/L LPS;(3)阿托伐他汀组:10% 空白血清 + DMEM 培养液 + 1 mg/L LPS + 10 μ mol/L 阿托伐他汀;(4)四君子汤组:10% 四君子汤血清 + DMEM 培养液 + 1 mg/L LPS;(5)血府逐瘀汤组:10% 血府逐瘀汤血清 + DMEM 培养液 + 1 mg/L LPS;(6)补阳还五汤组:10% 补阳还五汤血清 + DMEM 培养液 + 1 mg/L LPS。培养 24 h 后收集细胞。

1.4 荧光定量 PCR 分析

用 RNA-OUT 提取总 RNA,逆转录,用荧光定量 PCR 方法测定 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 及 ICAM-1 基因表达。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,55 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 GAPDH 为内参。引物用 Prime 5.0 软件设计,由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列:LOX-1 上游引物:5'-TGGCAGTCTATGTCTGCACC-3',下游引物:5'-CTATGGCTACCACAGGCGAT-3',扩增产物长度为 93 bp;TNF- α 上游引物:5'-AGATGATCTGACTGCCTGGG-3',下游引物:5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA-3',扩增产物长度为 142 bp;VCAM-1 上

游引物:5'-TCACAGCCCATGACACTACA-3',下游引物:5'-GGAAAAACAGAAAAGAGGTGGA-3',扩增产物长度为 130 bp; ICAM-1 上游引物:5'-AGGGTA-AGGTTCTTGCCCAC-3',下游引物:5'-TGAT-GGGCAGTCAACAGCTA-3',扩增产物长度为 108 bp; GAPDH 上游引物:5'-CGCTCTCTGCTCCTCCT-GTT-3',下游引物:5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3',扩增产物长度为 81 bp。由计算机自动计算得出 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

1.5 Western blot 分析

收集 HUVEC,加入 SDS 上样缓冲液裂解细胞,蛋白浓度由 BCA 法检测。以每泳道 60 μg 蛋白上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维膜,分别加入 1:200 兔抗人 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 一抗,4℃封闭过夜后用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 1:1000 羊抗兔二抗,置室温 2 h 显色,比较目的条带吸光度值。

表 1. 3 种中药复方血清和阿托伐他汀对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响(n=5)

Table 1. Effects of 3 kinds of traditional Chinese herbal compound drug serum and atorvastatin on mRNA expression of LOX-1, TNF-α, VCAM-1 and ICAM-1(n=5)

分 组	LOX-1	TNF-α	VCAM-1	ICAM-1
空白对照组	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.21	1.01 ± 0.15	1.01 ± 0.12
模型组	5.36 ± 0.67 ^a	4.30 ± 0.53 ^a	3.82 ± 0.45 ^a	3.59 ± 0.34 ^a
阿托伐他汀组	2.14 ± 0.48 ^b	2.06 ± 0.62 ^b	1.71 ± 0.48 ^b	1.73 ± 0.58 ^b
四君子汤组	4.90 ± 0.63 ^c	3.96 ± 0.54 ^c	3.41 ± 0.81 ^c	3.21 ± 0.26 ^c
血府逐瘀汤组	3.51 ± 0.42 ^{bc}	3.14 ± 0.47 ^{bc}	2.86 ± 0.51 ^{bc}	2.77 ± 0.54 ^{bc}
补阳还五汤组	2.92 ± 0.41 ^{bc}	2.90 ± 0.25 ^{bc}	2.35 ± 0.14 ^{bc}	2.43 ± 0.62 ^{bc}

表中数据为与内参比较所得出的数值,故无相应的单位。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较;c 为 $P < 0.05$,与阿托伐他汀组比较。

2.2 3 种中药复方血清和阿托伐他汀对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,阿托伐他汀组、血府逐瘀汤组及补

1.6 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种中药复方血清和阿托伐他汀对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响

与空白对照组比较,模型组 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,阿托伐他汀组、血府逐瘀汤组和补阳还五汤组均显著抑制 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 mRNA 表达($P < 0.05$),而四君子汤组各项指标无明显变化($P > 0.05$)。本实验条件下 3 个中药组的上述作用显著逊于阿托伐他汀组($P < 0.05$)(表 1)。

阳还五汤组均显著抑制 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 蛋白表达($P < 0.05$),而四君子汤组各项指标无明显变化($P > 0.05$)。本实验条件下 3 个中药组的上述作用显著逊于阿托伐他汀组($P < 0.05$)(表 2、图 1)。

表 2. 3 种中药复方血清和阿托伐他汀对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的影响(n=5)

Table 2. Effects of 3 kinds of traditional Chinese herbal compound drug serum and atorvastatin on protein expression of LOX-1, TNF-α, VCAM-1 and ICAM-1 (n=5)

分 组	LOX-1	TNF-α	VCAM-1	ICAM-1
空白对照组	0.38 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.25 ± 0.03
模型组	0.95 ± 0.06 ^a	0.95 ± 0.04 ^a	0.93 ± 0.04 ^a	0.92 ± 0.08 ^a
阿托伐他汀组	0.56 ± 0.01 ^b	0.54 ± 0.05 ^b	0.43 ± 0.05 ^b	0.35 ± 0.05 ^b
四君子汤组	0.81 ± 0.05 ^c	0.86 ± 0.06 ^c	0.82 ± 0.04 ^c	0.85 ± 0.07 ^c
血府逐瘀汤组	0.74 ± 0.04 ^{bc}	0.78 ± 0.03 ^{bc}	0.68 ± 0.11 ^{bc}	0.58 ± 0.04 ^{bc}
补阳还五汤组	0.68 ± 0.04 ^{bc}	0.66 ± 0.05 ^{bc}	0.60 ± 0.05 ^{bc}	0.52 ± 0.03 ^{bc}

表中数据为与内参比较所得出的数值,故无相应的单位。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较;c 为 $P < 0.05$,与阿托伐他汀组比较。

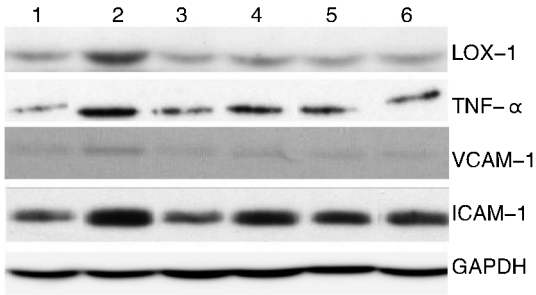


图 1. Western blot 检测各组 LOX-1、TNF-α、VCAM-1、ICAM-1 蛋白表达 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阿托伐他汀组,4 为四君子汤组,5 为血府逐瘀汤组,6 为补阳还五汤组。

Figure 1. Protein expression of LOX-1, TNF-α, VCAM-1 and ICAM-1 detected by Western blot in different groups

3 讨论

目前 As 的炎症反应学说被普遍接受^[4]。研究表明 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 在 As 病变过程中起着重要的作用,抑制 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 的表达对 As 发生和发展有明显的抑制作用^[5-7]。我们在前期研究^[3]中发现,以补阳还五汤加减而成的益气活血复方,对 LOX-1、TNF-α 及 ICAM-1 等炎症因子有明显的抑制作用,而这可能是其发挥抗 As 作用的机制之一。我们的另一项前期研究^[8]表明,阿托伐他汀对 LOX-1、TNF-α 及 ICAM-1 等炎症因子有明显的抑制作用^[8]。因此,本实验选用益气法代表方剂四君子汤、活血法代表方剂血府逐瘀汤、益气活血法代表方剂补阳还五汤等 3 种不同治法的方剂,并且与阿托伐他汀进行比较,研究 3 种不同治法的方剂对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 等炎症因子的影响以及与阿托伐他汀的差异。

本研究结果表明,用 LPS 刺激 HUVEC 后 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达明显提高,在用中药复方血清干预 24 h 后,血府逐瘀汤组和补阳还五汤组 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达明显下降,说明血府逐瘀汤和补阳还五汤对上述几种炎症因子有明显的抑制作用。血府逐瘀汤和补阳还五汤可能通过抑制 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 等炎症因子的表达,从而减少单核细胞与血管内皮细胞黏附以及内皮细胞的损伤,这可能是这 2 种中药复方发挥抗 As 作用的机制之一。而四君子汤组 LOX-1、TNF-

α、VCAM-1 及 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达无明显变化,说明四君子汤对 As 可能无明显疗效。

阿托伐他汀的抗 As 作用已得到充分认可,广泛应用于临床抗 As 治疗。比较阿托伐他汀组与血府逐瘀汤组、补阳还五汤组,阿托伐他汀组对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 的抑制作用最明显,而血府逐瘀汤组和补阳还五汤组的抑制效果不如阿托伐他汀组。在前期研究^[3]中,我们采用益气活血复方高、中、低 3 个浓度组进行实验,实验结果表明 3 个浓度组中高浓度组效果最好,其次为中浓度组,低浓度组效果最差。表明中药复方对 LOX-1、TNF-α 及 ICAM-1 的抑制作用有浓度依赖性,即达到一定浓度以后才能起到作用或作用更显著。在本实验中我们均按方剂的原有剂量(中浓度)进行实验,因此可能存在因浓度未达到理想水平而影响抑制效果的可能。在未来的实验中,我们将进一步研究不同浓度组中药复方对 LOX-1、TNF-α、VCAM-1 及 ICAM-1 等炎症因子的影响,以探讨并比较中药复方与西药的疗效。

[参考文献]

[1] 尚改萍, 文志斌, 何晓凡, 等. 补阳还五汤抗家兔动脉粥样硬化形成及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(2): 112-114.

[2] 邱顺辉, 章常华, 高书亮, 等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化与间隙连接蛋白关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 161-165.

[3] 姜 华, 姜玉姬. 益气活血复方对 Toll 样受体 4 信号转导通路及下游炎症因子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 219-223.

[4] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.

[5] Xu SW, Ogura S, Chen JW, et al. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers[J]. Cell Mol Life Sci, 2013(16): 2 859-872.

[6] 毛 洋, 刘小琼, 王洪梅, 等. 细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 促进兔动脉粥样硬化斑块内血管新生[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(3): 217-222.

[7] 郭寻竹, 宋丽萍. 兔动脉粥样硬化模型血清 TNF-α 与斑块内细胞凋亡的相关性研究[J]. 解放军医学院学报, 2014, 35(2):174-177.

[8] 姜 华, 姜玉姬. 阿托伐他汀对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞 Toll 样受体 4 及炎症因子表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(1): 37-41.

(此文编辑 曾学清)