

## 中药研究

# 黄芪多糖对 TNF- $\alpha$ 诱导心脏微血管内皮细胞黏附分子基因转录及 p38MAPK 信号通路的影响

刘 蓓<sup>1</sup> 朱海燕<sup>2</sup> 高永红<sup>1</sup> 徐 冰<sup>1</sup> 朱陵群<sup>1</sup> 陈立新<sup>3</sup>

(1 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室,北京市东城区海运仓 5 号,100700;

2 北京师范大学中药资源与资源药物研究所; 3 北京中医药大学)

**关键词** 黄芪多糖;P-选择素;E-选择素;p38 MAPK;TNF- $\alpha$

机体在正常情况下,中性粒细胞与血管内皮细胞几乎不产生黏附作用,在前炎症因子刺激后,两者黏附增加,从而对血管内皮造成严重伤害。黄芪多糖是中药黄芪的主要活性物质,前期研究发现,黄芪多糖具有良好的免疫调节作用,并且对心肌缺血再灌注损伤引发的炎症级联反应具有一定的抑制作用<sup>[1]</sup>。本研究从基因转录水平观察黄芪多糖干预 TNF- $\alpha$  诱导的 HCEMC 中 P-选择素、E-选择素转录的影响,同时观察 p38MAPK 信号通路的变化,进一步探讨黄芪多糖干预内皮细胞炎症黏附作用的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 原代人心脏微血管内皮细胞(Scien-Cell),从人心肌组织中分离后立即冻存,用抗Ⅷ因子、抗 CD31(P-CAM)抗体(免疫荧光法)和 DiI-Ac-LDL 摄取检测,均符合内皮细胞特性。

1.1.2 主要药品及试剂 黄芪多糖(天津赛诺制药有限公司,批号:Z20040086)、多聚赖氨酸(Sigma)、95%乙醇(北京试剂公司);内皮细胞培养基(Scien-Cell);0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2~7.4)、虎红(Solarbio);TNF- $\alpha$ (10 $\mu$ g, Peprotech)、SV Total RNA 分离纯化试剂盒、反转录试剂盒(Promega)、PCR Master Mix(ABI)。

1.1.3 主要仪器 CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱(Sanyo);Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(Stratagene);倒置相差显微镜(Olympus IMT-2);超净工作台(CJT-E-11 北京昌平长城空气净化工程公司);电热恒温水箱

(HH.W21.420)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 人心脏微血管内皮细胞的培养 将细胞冻存管从液氮中取出立即于 37℃ 恒温水浴箱中融化,注入预先用 20mg/L 多聚赖氨酸包被的 75cm 培养瓶中,使用内皮细胞培养基进行培养,放置于 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中,2~3 天传代 1 次,实验使用第 5 代细胞。

1.2.2 实验分组及给药方法 观察细胞培养至 80% 融合,每组给予相应药物,继续培养 24h。实验分组:1)正常对照组:细胞不加任何干预;2)TNF- $\alpha$  组:加入终浓度为 10 $\mu$ g/L 的 TNF- $\alpha$ ;3)APS 低剂量组:APS(25 $\mu$ g/mL)预孵育 1h,加入终浓度为 10 $\mu$ g/L 的 TNF- $\alpha$ ;4)APS 高剂量组:APS(100 $\mu$ g/mL)预孵育 1h,加入终浓度为 10 $\mu$ g/L 的 TNF- $\alpha$ ;5)SB203580 组:SB203580(10 $\mu$ g/L)预孵育 1h 后吸弃液体,加入终浓度为 10 $\mu$ g/L 的 TNF- $\alpha$ 。

1.2.3 总 RNA 提取 细胞总 RNA 提取严格按照 SV Total RNA 分离纯化试剂盒操作步骤进行。提取的总 RNA 用核酸蛋白分析仪测 OD260、OD280,计算总 RNA 纯度,OD260/OD280 比值在 1.7~2.0 之间。

### 1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测

1.2.4.1 逆转录反应 按照反转录试剂盒操作说明配制反转录体系:MgCl<sub>2</sub>4 $\mu$ L,10 $\times$ 反转录 buffer 2 $\mu$ L,RNase Inhibitor 0.5 $\mu$ L,OligdT-Adaptor Primer 1 $\mu$ L,dNTP Mixture 2 $\mu$ L,AMV Reverse Transcriptase 0.6 $\mu$ L。RNA 模板 9.9 $\mu$ L(含 1 $\mu$ g),总体积:20 $\mu$ L。反应条件:42℃ 30min,然后 95℃ 5min。合成的 cDNA 以无 RNA 酶水稀释 5 倍,置 -20℃ 备用。

1.2.4.2 实时荧光定量 PCR NCBI 查人 P-选择素、E-选择素、p38MAPK、 $\beta$ -actin 引物序列,以设计软件 Premier5.0 自动设计, $\beta$ -actin 为内参。引物合成由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。P-选择

素:Forward 5'-TTC AGG ACA ATG GAC AGC AGT-3'; Reverse 5'-GTC CCA CCC ATT ATC AGA CCT-3'; 扩增片段长度 306bp; E-选择素:Forward 5'-GCA CAT CTC AGG GAC AAT GGA-3'; Reverse 5'-TTG GAC TCA GTG GGA GCT TCA-3'; 扩增片段长度 238bp; p38MAPK:Forward 5'-GCC GAA GAT GAA CTT TGC GA-3'; Reverse 5'-GTG GTG GCA CAA AGC TGA TG-3'; 扩增片段长度 260bp;  $\beta$ -actin:Forward 5'-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA-3'; Reverse 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3'; 扩增片段长度 302bp。

反应体系:PCR master mix 12.5 $\mu$ L, 上游引物 1 $\mu$ L (10 $\mu$ mol/L), 下游引物 1 $\mu$ L (10 $\mu$ mol/L), cDNA 5 $\mu$ L, RNase Free Water 5.5 $\mu$ L, 总体积:25 $\mu$ L。实时定量 PCR 仪反应条件:95 $^{\circ}$ C 10min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 40 次循环。反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线与融解曲线。根据计算机生成 CT 值, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法求出初始 cDNA 的相对量。

1.2.5 统计学方法 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组之间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

结果显示, 与正常对照组比较, TNF- $\alpha$  组 P-选择素、E-选择素、p38MAPK 基因表达明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, 黄芪多糖各剂量组、SB203580 组 P-选择素、E-选择素、p38MAPK 基因表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )。(见表 1)

## 3 讨论

TNF- $\alpha$  是由巨噬细胞产生的一种细胞炎性因子, 能够促发炎症反应, 并加重心肌缺血再灌注损伤。冠心病不稳定心绞痛和心肌梗死患者血清中 TNF- $\alpha$  的浓度都有明显升高<sup>[2-3]</sup>。研究认为, 炎症组织释放 TNF- $\alpha$  激活血管内皮细胞, 随后发生的基因表达被认为是心肌缺血再灌注损伤的关键环节<sup>[4-5]</sup>。多项研究发现细胞黏附分子中的选择素家族与心肌缺血再灌注损伤关系密切, 通过降低血管内皮细胞黏附分子的表达, 干预细胞的黏附能力, 能够对缺血心肌起到保护作用。

黄芪性甘温, 归脾、肺二经, 具有补气升阳, 益气固表, 利水消肿, 托疮生肌等功效。现代研究发现, 黄芪能够通过抑制 NO 生成、激活抗氧化酶和抑制心肌细胞凋亡, 以及抑制某些炎症因子的生成等作用, 保护缺血心肌再灌注损伤<sup>[6]</sup>。中性粒细胞与血管内皮细胞黏附分子发生的相互作用与心肌缺血再灌注损伤有紧

密联系<sup>[7-8]</sup>。机体在心肌缺血再灌注和炎症反应的条件下, 中性粒细胞与血管内皮细胞黏附增加, 继而损伤血管内皮。本实验运用 TNF- $\alpha$  刺激心脏微血管内皮细胞, 并观察其中黏附分子的基因转录变化与黄芪多糖的关系。实验结果显示黄芪多糖能够降低炎症因子 TNF- $\alpha$  刺激作用下心脏微血管内皮细胞 P-选择素、E-选择素的基因转录, 提示黄芪多糖有可能部分阻断细胞黏附分子的表达, 从而对心脏缺血再灌注起保护作用。

表 1 黄芪多糖对 TNF- $\alpha$  介导人心脏微血管内皮细胞 P-选择素、E-选择素及 p38MAPK mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	P-选择素	E-选择素	p38MAPK
正常组	1.154 $\pm$ 0.245 $\Delta\Delta$	0.468 $\pm$ 0.026 $\Delta\Delta$	0.775 $\pm$ 0.195 $\Delta\Delta$
TNF- $\alpha$ 组	2.580 $\pm$ 0.129**	1.560 $\pm$ 0.071**	3.395 $\pm$ 0.154**
APS 高剂量组	1.374 $\pm$ 0.159 $\Delta\Delta$	0.767 $\pm$ 0.130 $\Delta\Delta$	1.001 $\pm$ 0.085 $\Delta\Delta$
APS 低剂量组	1.543 $\pm$ 0.182 $\Delta\Delta$	0.803 $\pm$ 0.145 $\Delta\Delta$ *	1.197 $\pm$ 0.156 $\Delta\Delta$
SB203580 组	1.360 $\pm$ 0.064 $\Delta\Delta$	0.641 $\pm$ 0.063 $\Delta\Delta$	0.941 $\pm$ 0.228 $\Delta\Delta$
F 值	11.368	18.465	40.821

注:与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ 。

我们前期的研究中已发现, 黄芪多糖能够减少人微血管内皮细胞缺血再损伤模型核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的基因表达, 进而抑制再灌注损伤中部分黏附分子的表达<sup>[9]</sup>。而 p38MAPK 是机体内另一条重要的炎症信号通路, 参与了机体的多种炎症反应, 与心、脑、肾的缺血再灌注损伤有密切关系<sup>[10-11]</sup>, 并且与 NF- $\kappa$ B 信号通路存在复杂的交叉对话关系<sup>[12]</sup>。Shimizu 等<sup>[13]</sup>对心肌梗死大鼠模型的研究发现, 心肌缺血能够激活 p38MAPK 通路, 继而伴随的是 NF- $\kappa$ B 基因的表达增加, 认为 p38MAPK 与 NF- $\kappa$ B 信号转导机制与心肌缺血密切相关, 阻断 p38MAPK 信号通路能够明显减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[14-15]</sup>。通过本研究我们发现, 黄芪多糖和 p38MAPK 抑制剂 SB203580 能够明显改善由 TNF- $\alpha$  诱导的人微血管内皮细胞损伤, 并能减少在前炎症因子 TNF- $\alpha$  刺激作用下人微血管内皮细胞 p38MAPK 基因表达。结合既往研究结果我们推测, 黄芪多糖除了能抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 还能干预 p38MAPK 信号通路, 从而通过多条途径抑制炎症反应, 发挥抗心肌再灌注损伤的作用。鉴于信号通路的复杂性, 黄芪多糖的具体干预位点还不明确, 这一结果有可能是黄芪多糖通过抑制 p38MAPK 信号通路, 直接下调黏附分子的表达; 也可能是影响 NF- $\kappa$ B 通路后, 间接下调黏附分子; 或者两种可能同时存在。具体机制有待更进一步深入研究, 同时需要从蛋白表达方面进行验证。

## 参考文献

- [1] 张灼, 陈立新, 宋崇顺, 等. 黄芪多糖对大鼠心肌缺血 - 再灌注损伤后的保护作用. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(2): 33 - 34.
- [2] 杨平, 抗永伦, 温先勇, 等. 冠心病患者炎症标志物检测的临床意义. 医学理论与实践, 2007, 20(1): 9 - 12.
- [3] Mizia - Stec K, Gasior Z, Zahorska - Markiewicz B, et al. Serum tumour necrosis factor - alpha, interleukin - 2 and interleukin - 10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. Coron Artery Dis, 2003, 14(6): 431 - 438.
- [4] Michael Buerke, Diethard Pruefer, Dennis Sankat, et al. Effects of Aprotinin on Gene Expression and Protein Synthesis After Ischemia and Reperfusion in Rats. Circulation, 2007, 116: 1121 - 126.
- [5] Jones SP, Trocha SD, Stranqe MB, et al. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(5): H2196 - 2201.
- [6] 刘静, 郭颖. 黄芪注射液对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用. 锦州医学院学报, 2006, 27(3): 34 - 36.
- [7] A. Ramachandran, S. Jha, D. J. Lefer, et al. Pathophysiology of Myocardial Reperfusion Injury: The Role of Genetically Engineered Mouse Models. Veterinary Pathology, 2008, 45(5): 698 - 706.
- [8] Jeong Ryul Lee, Jae Jin Han, Jeong Wook Seo, et al. Correlation between ICAM - 1 and functional recovery of piglet myocardium with leukocyte - depleted reperfusion. Surg, 2000, 70: 1531 - 1535.
- [9] 朱海燕, 陈立新, 朱陵群. 黄芪多糖对缺氧再复氧后人心脏微血管内皮细胞 ICAM - 1、VCAM - 1 表达的影响. 辽宁中医杂志, 2008, 35(2): 293 - 295.
- [10] 孙立倩, 景晓彬, 崔建忠. SB203580 对 IR 鼠模型脑组织中神经元凋亡的影响. 山东医药, 2009, 49(2): 34 - 36.
- [11] Moolman JA, Hartley S, Van Wyk J, et al. Inhibition of myocardial apoptosis by ischemic and beta - adrenergic preconditioning is dependent on p38MAPK. Cardiovasc Drug Ther, 2006, 20(1): 13 - 25.
- [12] Li J, Lang MJ, Mao XB, et al. Antiapoptosis and mitochondrial effect of pioglitazone preconditioning in the ischemic/reperfused heart of rat. Cardiovasc Drugs Ther, 2008, 22(4): 283 - 291.
- [13] Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T. Activation of mitogen - activated protein kinases and activator protein - 1 in myocardial infarction in rats. Cardiovasc Res, 1998, 38(1): 116 - 124.
- [14] Gorog DA, Jabr RI, Tanno M, et al. MAPK - 2 modulates p38MAPK localization and small heat shock protein phosphorylation but does not mediate the injury associated with p38MAPK activation during myocardial ischemia. Cell Stress Chaperones, 2009, 14(5): 477 - 489.
- [15] Lochner A, Marais E, Genade S, et al. Protection of the ischemic heart: investigations into the phenomenon of ischemic precondition. Cardiovasc J Afr, 2009, 20(1): 43 - 51.

(2011 - 02 - 15 收稿)◎

## 2011 年《中医杂志》改为半月刊, 欢迎订阅

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医科学院联合主办的、全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊, 是中国中文核心期刊和科技核心期刊, 中国精品科技期刊, 首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊。2009 年被中国科学技术协会评为中国精品科技期刊。2010 年被中国期刊协会评为新中国 60 年有影响力的期刊。被国内外多种检索系统收录。《中医杂志》英文版 2010 年起又被列为美国《科学引文索引(扩展库)》(SCI-E)来源期刊。

本刊主要栏目中“当代名医”和“临证心得”介绍名老中医辨证用药治疗疑难病的经验, 即学即用; “专题笔谈”介绍常用中药应用的新经验, 启发思路; “临床研究”“临床报道”介绍中医药治疗的新方法、新成果, 真实可靠; “临床解惑”回答读者遇到的各类疑难问题, 深入浅出。此外, 还辟有方法学与临床评价、专家论坛、病例讨论、针灸推拿、思路与方法、综述、百家园等栏目, 可使您掌握最新信息与治疗方法, 成为您学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

2011 年《中医杂志》将改为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版。每期 9.80 元, 为大 16 开本。上半月出版的《中医杂志》基本保持原来内容及风格, 下半月出版的《中医杂志》以学术研究为主要内容, 及时反映中医药现代研究的动向及最新成果。读者可以根据自身的情况选择订阅全年 1 ~ 24 期, 也可以选择订阅 2011 年第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23 期或 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 期杂志。读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号 2—698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64014411-3036。国外发行: 中国中际图书贸易总公司(北京 339 信箱, 邮编: 100044), 国外代号 M140。

《中医杂志》(英文版)为季刊, 本社自办发行, 国内定价: 每册 22.00 元, 欲购者请汇至本刊英文版编辑部, 联系电话: 010-57132492。

本社地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 邮编: 100700, 电话: 010-64035632。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。