

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.001

葛根素对脉络膜血管内皮细胞增殖的影响

吴宁玲, 吴沂旒, 庄曾渊, 夏 彧

(中国中医科学院眼科医院眼科, 北京 100040)

【摘要】目的:观察不同浓度葛根素(Puerarin, Pur)对体外培养脉络膜血管内皮细胞(Choroidal vascular endothelial cells, CVEC)s增殖的影响。方法:取第3代人 CVEC)s用于实验。实验组中加入含不同浓度的 Pur 培养液,细胞对照组加入等量空白培养液。24 h 及 48 h 后采用四甲基偶氮唑蓝比色法检测血管内皮细胞的增殖情况。结果:与细胞对照组比较, 0.05、0.50、5.00 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ Pur 组作用 24 h 及 48 h 后 CVEC)s A 值均增加($P<0.01$)。结论:Pur 对体外培养的 CVEC)s 有明显的促进增殖作用,其作用与 Pur 的剂量有关。

【关键词】葛根素;脉络膜血管内皮细胞;增殖

【中国图书分类法分类号】R773.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-23

Effect of Puerarin on the proliferation of choroidal vascular endothelial cells in vitro

WU Ningling, WU Yini, ZHUANG Zengyuan, XIA Yu

(Department of Ophthalmology, Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of different concentrations of Puerarin(Pur) on the proliferation of choroidal vascular endothelial cells(CVEC)s in vitro. Methods: The third generation of CVEC)s were used for the research. The CVEC)s in experimental group were exposed to different concentrations of Pur while those in cell control group were exposed to equal amount of blank medium. The effect of Pur on the proliferation of cells was measured by methyl thiazolyl thiazolium(MTT) assay. Results: CVEC)s cultured with 0.05, 0.50, 5.00 $\mu\text{g/ml}$ and 50.00 $\mu\text{g/ml}$ Pur showed increase in absorbance(A) value at 24 h and 48 h after treatment($P<0.01$). Conclusion: Pur can obvious promote the proliferation of CVEC)s, which is related with the dosage of Pur.

【Key words】Puerarin; choroidal vascular endothelial cells; proliferation

近年来研究发现血管内皮细胞是重要的内分泌细胞,内皮细胞可通过自分泌和旁分泌产生一系列活性物质,参与调节和维持血液的正常循环。脉络膜血管内皮细胞(Choroidal vascular endothelial cells, CVEC)s损伤会导致许多血管舒张和紧缩调节的活性物质分泌紊乱,加快许多眼部疾病(如黄斑变性、高度近视、特发性脉络膜视网膜炎、眼组织胞浆菌病及眼底血管样条纹等)的发展,因此研究保护 CVEC)s 是防治这类疾病的新途径。

葛根素(Puerarin, Pur)为豆科葛属植物葛根异黄酮的主要有效成分之一,其化学名为 4,7-二羟

基-8- β -D 葡萄糖基异黄酮。现代研究发现其能降低血液黏稠度、抑制血小板聚集,降低血栓素 A₂ (Thromboxane A₂, TXA₂)的水平,并能使增高的血浆内皮素、血管紧张素 II 及肾素活性降低,扩张微动脉,改善微循环,增加血流量,改善缺氧缺血。已有研究表明 Pur 对血管内皮细胞表现出保护作用。

大量的研究资料表明:发生在某一器官或组织的病理过程应该采用该器官和组织特异的微血管内皮细胞,而不能采用大血管内皮细胞作为细胞模型来研究它的相关机制,这样才可能获得更符合实际的研究结果。目前已经有 Pur 对主动脉内皮细胞、脐静脉内皮细胞等内皮细胞的作用研究,但 Pur 对 CVEC)s 作用的体外实验研究尚未见报道。本文对 CVEC)s 培养、传代及 Pur 对 CVEC)s 增殖的影响进行了系统研究。

作者介绍:吴宁玲(1975-),女,主治医师,在读博士,

研究方向:中西医结合眼科。

通信作者:庄曾渊,男,研究员,Email:bjzhuangxy@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30973776)。

1 材料与方法

1.1 人 CVEC s

购自齐氏生物科技有限公司。

1.2 试剂和仪器

HAM'F12 培养基和胎牛血清,美国 Gibco 公司产品;胰酶、四甲基偶氮唑蓝 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜,美国 Sigma 公司产品;内皮细胞生长因子 (Endothelial cell growth factor, ECGF),购自北京中日友好医院临床研究所;Pur 注射液 (华北制药有限公司产品,批号:10120501)。ELX808 酶标仪,美国 Bio-Tek 公司产品;倒置显微镜,日本 Olympus 公司产品。

1.3 人 CVEC s 培养

将购买的人 CVEC s 复苏,用含 200 g/L FBS、100 mg/L ECGF、100 mg/L 肝素、胰岛素 (0.3 IU/ml) 以及 1 g/L 双抗的 HAM'F12 完全培养基接种于 2 g/L 明胶包被的培养瓶,置 37℃、体积分数 5%CO₂ 孵箱培养。以后每 3~4 d 换液 1 次直至长成单层细胞。选第 3 代内皮细胞,0.1%胰蛋白酶消化备用。

1.4 实验分组

实验分为 5 组,即细胞对照组和 Pur 0.05、0.50、5.00、50.00 μg/ml 组。Pur 注射液每支含 Pur 干粉 0.2 g,用无血清、无生长因子的 HAM'F12 配制为 0.05、0.50、5.00、50.00 μg/ml,4℃保存备用;细胞对照组培养液中不加入 Pur,用无血清、无生长因子的 HAM'F12 培养液培养。

1.5 MTT 比色实验检测 CVEC s 增殖情况

将 CVEC s 以 3×10⁴ 个/ml 浓度接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,用含 20%胎牛血清及 100 μg/ml 生长因子的培养基在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 24 h,更换含不同浓度 Pur 的培养基继续培养 24 h 及 48 h 后,96 孔板每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml),继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内上清培养液,每孔再加入 150 μl 二甲基亚砜,打匀振荡 5 min,使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度 (Absorbance, A) 值。

1.6 统计学方法

采用统计软件包 SPSS 17.0 统计软件对计量资料进行方差分析,用 LSD 法进行两两比较。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

倒置显微镜下观察 CVEC s 形态,其复苏后培养 24 h,可见约 20%~30% CVEC s 已贴壁,呈三角形或短梭形,排列不规则,核淡,胞膜明显,5~7 d 后成片融合,细胞紧密排列,互不重叠,呈典型的铺路卵石样结构。传代细胞约 5~7 d 能增殖

铺满培养瓶底。

2.2 不同浓度 Pur 对细胞增殖的影响

24 h 及 48 h 4 个浓度 Pur 组 A_{570 nm} 值均高于细胞对照组 ($P<0.05$),CVEC s 增殖明显,并且随药物浓度增加 A_{570 nm} 值也增加,说明 Pur 有促进 CVEC s 增殖的作用。其中 24 h 及 48 h 组中均为 5.00 μg/ml Pur 组增殖活性最高,但浓度继续增加 A_{570 nm} 值反而下降。见表 1。

表 1 不同浓度 Pur 对人 CVEC s 生长的作用比较

Tab.1 Comparison on the effect of different concentrations of Pur on growth of CVEC s

药物浓度 (μg/ml)	24 h A _{570 nm} 值	48 h A _{570 nm} 值
0.05	0.271 ± 0.030*	0.338 ± 0.020*
0.50	0.318 ± 0.010*	0.369 ± 0.020*
Pur 组 5.00	0.368 ± 0.010*	0.411 ± 0.020*
50.00	0.317 ± 0.010*	0.373 ± 0.010*
细胞对照组	0.125 ± 0.020	0.223 ± 0.030
F 值	73.98	34.51
P 值	0.000	0.000

注:与细胞对照组比较,*, $P<0.01$

2.3 Pur 组及细胞对照组形态学观察

倒置显微镜下观察:Pur 组细胞形态正常,细胞密度较对照组密集。见图 1~6。



图 1 24 h 细胞对照组

Fig.1 24 h cell control group

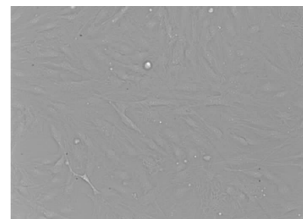


图 2 24 h 0.50 μg/ml Pur 组

Fig.2 24 h 0.50 μg/ml Pur group

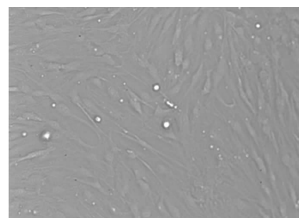


图 3 24 h 5.00 μg/ml Pur 组

Fig.3 24 h 5.00 μg/ml Pur group

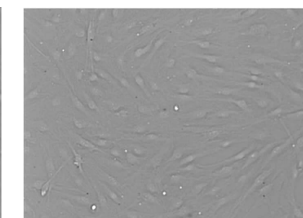


图 4 48 h 细胞对照组

Fig.4 48 h cell control group

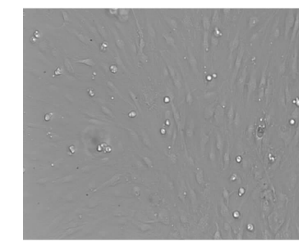


图 5 48 h 0.50 μg/ml Pur 组

Fig.5 48 h 0.50 μg/ml Pur group

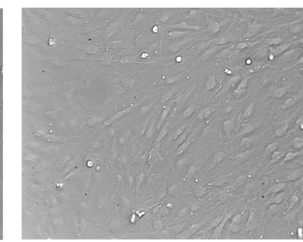


图 6 48 h 5.00 μg/ml Pur 组

Fig.6 48 h 5.00 μg/ml Pur group

3 讨论

Pur 为豆科植物葛根异黄酮的主要有效成分之一,其化学名为 8- β -D-葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮,分子量为 416.38^[1]。研究表明,Pur 的作用主要是由于其主要成分异黄酮具有雌激素样作用,因此又被归为植物雌激素。植物雌激素可以结合于雌激素受体发挥雌激素样作用,可以抗氧化、清除氧自由基、降低血清胆固醇,促进细胞增殖^[2]。Pur 促进血管内皮细胞增殖的作用与其主要成分异黄酮具有雌激素样作用有关^[3]。有研究表明 Pur 不但直接对内皮细胞具有保护作用,可能同时增加内皮祖细胞的数量,并改善其功能从而促进内皮修复^[4]。

本实验发现,Pur 在 0.05~50.00 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时,MTT 结果的 $A_{570\text{ nm}}$ 值均高于细胞对照组,并且在一定浓度范围 $A_{570\text{ nm}}$ 值随着药物浓度的增加而增加,说明 Pur 对体外培养 CVECs 存在剂量-效应关系,适宜浓度 Pur 对体外培养的 CVECs 增殖呈明显促进作用。综上所述,Pur 在一定浓度下可显著地促进 CVECs 增殖,表现出对 CVECs 的保护作用。

血管内皮细胞是人体最大的内分泌、旁分泌及自分泌的代谢器官,可以产生和分泌几十种生物活性物质。血管内皮细胞具有复杂的功能,主要分为 4 点:屏障保护作用、血管张力作用、内皮分泌作用、修复增殖作用。血管内皮是最易受损的靶细胞,可因缺血、缺氧、血流的机械损伤等因素而受损。有文献报告,Pur 能减轻血液黏稠度,减轻内皮损伤,内皮细胞功能改善后,合成释放 NO 增多,使血管平滑肌收缩力下降,减轻血管紧张度,有利于维持血管舒缩因子平衡,在一定程度上保护了血管内皮,亦改善了内皮功能;能使自由基生成减少并增加其清除率,减轻自由基对内皮细胞的损伤^[5];Pur 还可扩张血管,增加组织灌注,改善微循环,使内皮细胞的供氧量增加,代谢改善,损伤减轻^[6]。

目前发现,在很多眼部病理情况下首先是血管内皮细胞功能受损,分泌血管内皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、转化生长因子明显增高,并移行穿过 Bruch 膜,靠近视网膜色素上皮层或与之接触,通过紧密连接或缝隙连接形成有极性的单层细胞。而在本研究中发现 Pur 表现出对 CVECs 的保护作用,因而可以推测在很多导致 CVECs 损伤从而引

起严重的眼部并发症的疾病,如黄斑变性、高度近视、特发性脉络膜视网膜炎、眼组织胞浆菌病以及眼底血管样条纹等,Pur 对血管内皮细胞的保护作用将在一定程度上阻断内皮细胞受损这一始动环节,从而减轻血管内皮细胞生长因子等病理因子的分泌,进而减轻由于这些病理因子增加引起的眼部病理改变,可望为治疗这类疾病提供一个新的途径。Pur 对 CVECs 发挥保护作用的机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王万铁,沈炳权,金可可,等.葛根素葡萄糖注射液对缺血-再灌注损伤兔心肌的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2005,25(s1):4-6.
Wang W T, Shen B Q, Jin K K, et al. Protective effect of Puerarin and glucose injection on myocardium in the reperfusion injury after myocardial ischemia in rabbits[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2005, 25(s1): 4-6.
- [2] Boué S M, Wiese T E, Nehls S, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(8): 2193-2199.
- [3] 方希,薛丹婷,方立,等.内质网应激与动脉粥样硬化[J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):947-951.
Fang X, Xue D T, Fang L, et al. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008, 13(8): 947-951.
- [4] 周丕琪,沈霖,杨艳萍,等.葛根素治疗椎动脉型颈椎病 123 例临床观察[J].中西医结合学报,2006,4(1):80-81.
Zhou P Q, Shen L, Yang Y P, et al. Clinical observation of puerarin in treating patients with vertebral artery insufficiency due to cervical spondylosis: a report of 123 cases[J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2006, 4(1): 80-81.
- [5] 高培国,强辉,凌鸣.葛根素对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J].西安交通大学学报(医学版),2012,33(2):245-248.
Gao P G, Qiang H, Ling M. Protective effect of Puerarin on the injury of human vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide in vitro [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2012, 33(2): 245-248.
- [6] 高秀荣,王春梅,秦桂云,等.葛根素注射液改善冠心病微循环的临床观察[J].中国微循环,2002,6(4):216-217.
Gao X R, Wang C M, Qin G Y, et al. The clinical observation of Puerarin injection in improving microcirculation disturbance of coronary heart disease[J]. Journal of Chinese Microcirculation, 2002, 6(4): 216-217.

(责任编辑:冉明会)