

杏丁注射液对血管内皮细胞 HSP 72 表达的影响

李靖¹, 吴云霞², 张美春³

(1. 武警湖北总队医院急诊科, 湖北 武汉 430060; 2. 华中科技大学同济医学院中西医结合研究所, 湖北 武汉 430030; 3. 武警湖北总队医院四内科, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的: 观察杏丁注射液对紫外线照射后血管内皮细胞热休克蛋白 72 (heat shock protein 72, HSP 72) 表达的影响。方法: 采用体外培养的猪主动脉血管内皮细胞, 以含浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10 mg/ml 的杏丁注射液的培养基培养 72 h 后, 用紫外线分别照射细胞 30 min, 以 Western-blot 方法检测内皮细胞中的 HSP 72 表达。结果: 正常情况下检测不到 HSP 72 表达, 紫外线照射后血管内皮细胞 HSP 72 有较强表达, 杏丁注射液在 0.1 mg/ml 浓度即有很明显的促进 HSP 72 表达的作用, 1.0 mg/ml 浓度时其作用达到高峰, 再增加浓度并不能增加 HSP 72 表达。结论: 杏丁注射液能通过促进 HSP 72 表达而保护血管内皮细胞在应激状态下免受损伤, 这可能是其防治心脑血管疾病的重要机制之一。

[关键词] 杏丁注射液; 血管内皮细胞; 热休克蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2005)04-0307-04

Effect of Xingding Injection on expression of heat shock protein 72 in vascular endothelial cells

LI Jing¹, WU Yun-Xia², ZHANG Mei-Chun³

(1. Department of Emergency, Hubei General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Wuhan, Hubei Province 430060, China; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province 430030, China; 3. Department of Internal Medicine, Hubei General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Wuhan, Hubei Province 430060, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Xingding Injection on the expression of heat shock protein 72 (HSP 72) in vascular endothelial cells after ultraviolet radiation. Methods: Porcine aortic endothelial cells were cultured for 72 hours in culture mediums with different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 mg/ml) of Xingding Injection. Ultraviolet radiation was administered to the cultured cells for 30 minutes. Western-blot assay was used to measure the expression of HSP 72 in the vascular endothelial cells. Results: There was no expression of HSP 72 in the cultured vascular endothelial cells without ultraviolet radiation, but there was some expression of HSP 72 after ultraviolet radiation. Xingding Injection of different concentrations could significantly improve the expression of HSP 72. The expression of HSP 72 in the vascular endothelial cells cultured in culture medium with 1.0 mg/ml Xingding Injection was the highest, and there was no more increase of expression when the concentration was higher, instead the expression decreased. Conclusion: Xingding Injection can protect the vascular endothelial cells from injury during stress. It may be one of its mechanisms in preventing and treating cardio-cerebrovascular disorders.

KEY WORDS Xingding Injection; vascular endothelial cells; heat shock protein

J Chin Integr Med, 2005, 3(4): 307-310

银杏素有“植物化石”之称, 在治疗心脑血管病、内分泌疾病和妊娠病方面有良好的疗效。杏丁注射

液是采用高科技手段从银杏叶中提取而成的制剂, 具有明显的活血化瘀功效, 对心脑血管疾病有较好

的防治作用。研究表明^[1],在紫外线、炎症、过氧化物、热休克、肿瘤坏死因子等作用下,受损细胞中的热休克蛋白(heat shock protein, HSP)基因转录活性升高和大量表达,HSP通过将变性的蛋白质折叠并介导其降解而发挥保护细胞的作用。为探讨杏丁注射液对血管内皮细胞的保护作用,作者观察了杏丁注射液对紫外线照射后猪主动脉血管内皮细胞 HSP 72 表达的影响,以期阐明其防治心脑血管疾病的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 杏丁注射液,贵州益佰制药股份有限公司生产(批号:19990129)。胎牛血清、M199 培养基,购自 Gibco-BRL 公司;肝素和内皮细胞生长支持物,美国 Sigma 公司产品;丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、十二烷基磺酸钠、四甲基乙二胺、二硫苏糖醇、苯甲基磺酰氟, Promega 公司产品;兔抗猪 HSP 72、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG 和异硫氰酸荧光素标记羊抗兔 IgG,北京中山生物公司产品;总蛋白质定量试剂盒, Bio-Rad 公司产品。其余均为国产试剂。

1.1.2 仪器 YJ-1450 型医用净化工作台,哈尔滨净化设备公司;CO₂ 孵箱, Forma 公司;倒置显微镜、荧光显微镜(BX60 型), Olympus 公司;高速低温离心机, Sigma 公司;Western blot 垂直平板电泳槽、电泳仪, Bio-Rad 公司;恒温水浴箱,江苏太仓医疗仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 猪主动脉血管内皮细胞原代培养及鉴定 选择正常屠宰的猪,用两把止血钳夹闭猪左锁骨上动脉和无名动脉,连同心脏和肺(带完整的胸膜)一同取出,迅速拿回实验室,紧贴主动脉弓切下主动脉段 10~15 cm, D-Hanks 液充分洗去血污,在动脉腔内注入 0.25% 胰蛋白酶,立即放入盛有 300 ml 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)的烧杯中,内含 2% 抗生素, 37℃ 消化 11~13 min。收集消化液并以 M199 培养液冲洗动脉管腔 1~2 遍,一并合入离心管, 1 000 r/min 离心 10 min,去上清,用含 20% 胎牛血清培养液重新悬浮细胞,调细胞密度至 $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ 个/ml,接种于 50 ml 培养瓶,加入 4 ml 培养液(培养液中含青霉素 200 U/ml、链霉素 200 U/ml、两性霉素 B 2.5 μg/ml、肝素 15 U/ml、内皮细胞生长支持物 30 μg/ml),于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。待细胞

贴壁后,换含 10% 胎牛血清的 M199 培养液继续培养,细胞融合成片后即可传代培养。内皮细胞采用普通光学显微镜观察法和免疫荧光法检测第 Ⅲ 因子抗原表达阳性确定为内皮细胞。

1.2.2 分组及给药 将内皮细胞平均分为 6 组,即空白对照组和 0.1、0.5、1.0、5.0、10 mg/ml 的杏丁注射液组,每组 8 孔。将每孔的原培养基吸出,分别用不同的培养基 200 μl,即空白组用不含杏丁注射液的 M199 培养基,其余各组分别用含杏丁注射液 0.1、0.5、1.0、5.0、10 mg/ml 的 M199 培养基,于 37℃ 培养 72 h 后,将生长细胞的 6 孔板置于超净工作台中,应用紫外光源垂直照射细胞 30 min,光源距离培养基约 30 cm。

1.2.3 细胞总蛋白提取及蛋白定量 收集各组细胞,计细胞总数并调至一致, 6 000 r/min 离心 5 min, 4℃ PBS(pH 7.4)清洗 1 次,弃上清并尽量吸干。根据细胞总数按 20 000 个细胞 1 μl 的比例,加入冰冷的悬浮缓冲液,迅速混匀,于 4℃ 裂解 30 min,此时细胞由于破膜和 DNA 释放将会很黏稠,然后将裂解物于 16 000 r/min 离心 10 min,取上清即为提取的细胞总蛋白,以 Bio-Rad 公司 DC Protein Assay Kit 进行蛋白定量。

1.2.4 Western blot 检测内皮细胞 HSP 72 的表达 取一定量的蛋白样本,立即加入等体积的 2×十二烷基磺酸钠变性缓冲液,混匀,将样品置 94℃ 加热变性 10 min,室温冷却,按文献^[1]报道的 Western blot 标准方法检测 HSP 72 水平。基本步骤如下:每孔加上述样品总蛋白量 10 μg,于 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离;将凝胶上的蛋白质电转印至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜上,丽春红染色,观察电泳转膜效果;用 PBS 洗去丽春红,将 NC 膜置 5% 脱脂奶粉中于 37℃ 封闭 1 h;然后用一抗(1:500 稀释)于 37℃ 孵育 1 h, 37℃ 磷酸盐洗液(含 0.05% 吐温-20 的磷酸盐, v/v)清洗 3 次,每次 10 min;二抗为相应的辣根过氧化物酶标记 IgG,用脱脂奶粉按 1:2 000 稀释, 37℃ 孵育 1 h;二抗孵育后的 NC 膜以 TBS 洗 3 次后用化学发光法(ECL 试剂盒, Amersham 公司)显色,倒去洗液后加入化学发光试剂,室温反应 1~3 min, NC 膜移至暗室,暗盒曝光适当时间,取出胶片冲洗。

1.3 统计学方法 用 Gel-Pro Analyzer 3.0 软件对 Western blot 蛋白质条带进行定量,用 SPSS 11.0 软件做统计学处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间的比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞的形态观察 主动脉内皮细胞呈典

型鹅卵石状生长, 并且有接触抑制现象, 长满的内皮细胞中有时会看到大的内皮细胞, 有的不止一个核, 此为正在分裂中的细胞而不是平滑肌细胞, 见图 1。另外, 在单细胞层表面会出现内皮细胞的“出芽”。

2.2 免疫荧光法鉴定内皮细胞 免疫荧光结果可见细胞核周有第 因子相关抗原表达, 表明培养细胞为内皮细胞。见图 2。

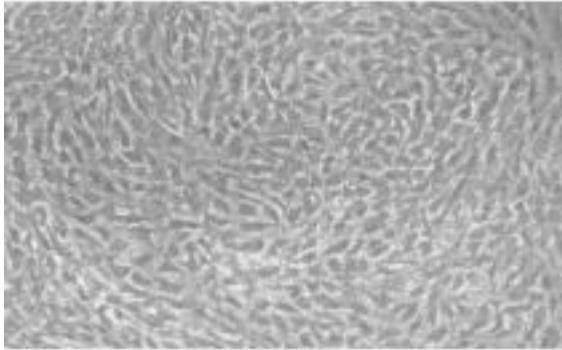


图 1 主动脉内皮细胞形态 (×100)

Fig 1 Configuration of aortic endothelial cells (×100)

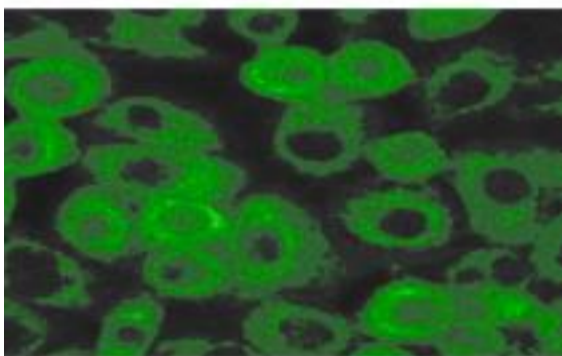


图 2 内皮细胞第 因子相关抗原表达阳性 (×400)

Fig 2 Positive expression of factor-related antigen of endothelial cells (×400)

2.3 各组内皮细胞 HSP 72 的表达 未经紫外线照射的情况下, 各组均未检测到内皮细胞 HSP 72 的表达。经紫外线照射的各组, 随杏丁注射液剂量的不同 HSP 72 表达水平有所改变。与对照组相比, 低剂量组 (0.1 mg/ml) HSP 72 表达已有明显增加 ($P < 0.05$); 在中剂量 (0.5、1.0 mg/ml) 时, HSP 72 的表达较对照组明显升高 ($P < 0.01$); 高剂量 (5.0、10 mg/ml) 则又呈下降趋势, 且与对照组相比无明显升高 ($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

以 HSP 合成为主要特征的热休克反应是所有生物体在不利因素刺激下所产生的普遍现象, 在不同的物种之间具有高度的保守性^[1]。HSP 的主要功能是伴侣蛋白质的合成和帮助变性蛋白质的复性或降解^[2]。许多资料表明, HSP 的合成赋予了细胞耐受热、紫外线、毒物或其他应激的能力, 因此 HSP 的表达有利于细胞设法耐受或免遭不良的, 甚至有

表 1 不同浓度杏丁注射液对紫外线照射后内皮细胞 HSP 72 表达的影响

Tab 1 Effect of Xingding Injection of different concentrations on expression of HSP 72 of endothelial cells after ultraviolet radiation ($\bar{x} \pm s$)

Culture medium	n	Expression of HSP 72 (OD)
Normal control	5	50.38 ± 2.33
Xingding Injection (0.1 mg/ml)	5	116.82 ± 3.58*
Xingding Injection (0.5 mg/ml)	5	159.19 ± 6.31**
Xingding Injection (1.0 mg/ml)	5	184.86 ± 4.34**
Xingding Injection (5.0 mg/ml)	5	81.43 ± 2.08
Xingding Injection (10 mg/ml)	5	60.18 ± 1.67

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs normal control

可能致命的应激因素对细胞的再次损伤, 具有极其重要的细胞保护功能^[3]。按分子量大小可将 HSP 分为 HSP 100、HSP 90、HSP 70、HSP 60、小分子 HSP (22 ~ 32 kDa) 及泛素 (7 ~ 8 kDa) 等家族, 但最为主要的是 HSP 70 家族。HSP 70 家族成分大部分为构成型成员, 仅一种为诱导性成员, 在热或其他应激因素后显著高表达, 即诱导性 HSP 70 (又称 HSP 72)^[4]。猪血管内皮细胞 HSP 70 家族两个表达较强的成分, 即 HSP 72 和 HSP 73, 其中 HSP 72 应激因素后显著高表达。之所以选择猪主动脉内皮细胞作为研究对象, 首先是因为猪与人有很好的同源性^[5,6], 其次猪的心血管系统与人的有很多相似之处, 随着年龄增长, 猪可自发性出现动脉粥样斑块, 与人的病变进程几乎完全一样, 而动脉粥样硬化是很多心脑血管疾病的原因和发病机制之一。由动脉粥样硬化导致的高血压其进程很难控制和逆转, 因此寻找和早期运用药物防止血管内皮受损以预防动脉粥样硬化斑块的形成显得尤为重要。

本研究发现一定剂量范围内的杏丁注射液能明显促进紫外线照射损伤后猪血管内皮细胞 HSP 72 的表达, 推测这可能是杏丁注射液防治心脑血管疾病, 保护心脑血管细胞免受缺血缺氧损伤的重要机制之一。HSP 72 作为一种重要的保护性蛋白, 与细胞增殖和凋亡等生命过程关系密切, HSP 72 表达水平和内皮细胞增殖活性呈正相关, 与凋亡率呈明显负相关; HSP 72 的另一重要功能就是可以保护细胞遗传物质 DNA, 使受损伤细胞 DNA 修复, 导致细胞增殖和降低细胞死亡。研究表明, 在诸多应激因素 (热、重金属、缺氧等)^[7,8] 作用下, 均是由于磷酸化的热休克因子 (heat shock factor, HSF) 水平升高而最终引起 HSP 70 表达的升高。杏丁注射液能明显促进紫外线照射损伤后猪血管内皮细胞 HSP 72 的表达, 但这个级联反应是怎样启动和传

导的,其信号转导机制如何,目前仍不明确,尚有待进一步研究阐明。

[参考文献]

1 Ranson NA, White HE, Sailbil HR . Chaperonins [J] . Biochem J, 1998, 333 (Pt 2): 233-242 .

2 Gerge J, Shoenfeld Y, Georgopoulos C . Heat shock proteins and stress tolerance in the biology of heat shock proteins and molecular chaperones [J] . Arteri Thromb Vasc Biol, 1999, 19(3): 505-510 .

3 Angelidis CE, Lazaridis I, Pagoulatos GN . Constitutive expression of heat-shock protein 70 in mammalian cells confers thermoresistance [J] . Eur J Biochem, 1991, 199(1): 35-39 .

4 Rajalingam R, Mehra NK, Singal DP . Polymorphism in heat-shock protein 70-1 (HSP 70-1) gene promoter region and susceptibility to tubercloid leprosy and pulmonary tuberculosis in Asian Indians[J] . Indian J Exp Biol, 2000, 38(7): 658-662 .


5 Slater DN, Sloan JM . The porcine endothelial cell in tissue culture[J] . Atherosclerosis, 1975, 21(2): 259-272 .

6 Basta G, Venneri L, Lazzerini G, *et al* . In vitro modulation of intracellular oxidative stress of endothelial cells by diagnostic cardiac ultrasound[J] . Cardiovasc Res, 2003, 58(1): 156-161 .

7 Yoshida H, Haze K, Yanagi H, *et al* . Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins . Involvement of basic leucine zipper transcription factors [J] . J Biol Chem, 1998, 273(50): 33741-33749 .

8 Chu B, Soncin F, Price BD, *et al* . Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1 [J] . J Biol Chem, 1996, 271(48): 30847-30857 .

[收稿日期] 2004-06-06 [本文编辑] 周庆辉

Short Communication 经验交流 

推拿结合针刺治疗颈源性头痛的疗效观察

胡蔚琼¹, 徐斯伟²

(1 .上海交通大学第一人民医院推拿科,上海 200080; 2 .上海交通大学第一人民医院针灸科,上海 200080)

[关键词] 按摩疗法; 针刺; 颈源性头痛; 治疗结果

[中图分类号] R247; R747.2 [文章标识码] B [文章编号] 1672-1977(2005)04-0310-02

Clinical observation on treatment of cervicogenic headache with tuina and acupuncture

HU Wei-Qiong¹, XU Si-Wei²

(1 .Department of Tuina, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China; 2 . Department of Acupuncture and Moxibustion, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

KEY WORDS massotherapy, TCM; acupuncture; cervicogenic headache; treatment outcome

J Chin Integr Med, 2005, 3(4): 310-311

颈源性头痛是由颈椎或颈部软组织病损所引起,以慢性、单侧头部疼痛为主要表现的综合征。笔者采用推拿和针刺治疗颈源性头痛 95 例,现总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 95 例均为 2001 年 9 月~2003 年

10 月的门诊患者,分为 3 组。针刺组 26 例,男性 13 例,女性 13 例,年龄 20~68 岁,平均(47.50±12.95)岁,病程 2 个月~2.5 年,平均(18.76±7.52)个月;推拿组 28 例,男性 13 例,女性 15 例,年龄 23~70 岁,平均(46.21±14.12)岁,病程 3 个月~3 年,平均(19.32±9.82)个月;推拿结合针刺组

[作者简介] 胡蔚琼(1970-),女,主治医师。

Correspondence to: HU Wei-Qiong . E-mail: xswhwq@sina.com