

葛根素对牛视网膜血管内皮细胞舒缩因子的影响

吴宁玲, 庄曾渊, 盛倩, 吴沂旒, 郭晓晴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973776)
作者单位:(100040)中国北京市,中国中医科学院眼科医院
作者简介:吴宁玲,女,毕业于中国中医科学院,眼科学博士,主治医师,研究方向:中西医结合眼视光学及眼底病。
通讯作者:庄曾渊,男,毕业于南京中医药大学,眼科学士,眼科研究员,研究方向:中西医结合眼底病。bjzhuangxy@sina.com
收稿日期:2013-08-05 **修回日期:**2014-01-06

Effects of puerarin on the relaxing and contraction factors produced by bovine retina vascular endothelial cells

Ning-Ling Wu, Zeng-Yuan Zhuang, Qian Sheng, Yi-Ni Wu, Xiao-Qing Guo

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30973776)

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Zeng-Yuan Zhuang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. bjzhuangxy@sina.com

Received:2013-08-05 Accepted:2014-01-06

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of puerarin of different concentrations on relaxing and contraction factors produced by cultured bovine retinal vascular endothelial cells (RVECs).

• **METHODS:** The eighth generation of bovine RVECs was used for the research. The RVECs were cultivated in nutrient solution with different concentrations of puerarin in experimental group and in nutrient solution without drug, growth factor and serum in the control group. Expressions of eNOS and ET-1 in each group were measured by Western blotting method after 48h.

• **RESULTS:** Compared with the negative comparison group, relative expression of eNOS in puerarin group increased ($P < 0.01$), and eNOS expression also enhanced with the increase of the concentration of drugs; the ET-1 relative expressions of puerarin group decreased ($P < 0.01$), and ET-1 expression also decreased with the increase of the concentration of drugs.

• **CONCLUSION:** By up-regulating eNOS expression, down-regulating the ET-1 expression and regulating vascular nitric oxide endothelin (NO/ET) ratio, puerarin can relax retinal vascular smooth muscle.

• **KEYWORDS:** puerarin; retina vascular endothelial cells; relaxing factor and contraction factor

Citation: Wu NL, Zhong ZY, Sheng Q, et al. Effects of puerarin on the relaxing and contraction factors produced by bovine retina vascular endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(2):229-231

摘要

目的:观察不同浓度葛根素对体外培养的牛视网膜血管内皮细胞舒缩因子的影响。

方法:取第8代牛视网膜血管内皮细胞用于实验。实验组中加入含不同浓度葛根素的培养液,对照组加入不含药物、无生长因子及血清的培养液。培养48h后用Western blotting法测各组细胞eNOS及ET-1的表达。

结果:与阴性对照组比较,葛根素组eNOS的相对表达量均升高($P < 0.01$),且随着药物浓度的增加eNOS的表达也增加。葛根素组ET-1的相对表达量均降低($P < 0.01$),且随着药物浓度的增加ET-1表达下降。

结论:葛根素通过上调eNOS的表达,下调ET-1的表达,调节血管一氧化氮内皮素(NO/ET)的比值,从而发挥松弛视网膜血管平滑肌的作用。

关键词:葛根素;视网膜血管内皮细胞;舒缩因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.02.08

引用:吴宁玲,庄曾渊,盛倩,等.葛根素对牛视网膜血管内皮细胞舒缩因子的影响.国际眼科杂志2014;14(2):229-231

0 引言

血管内皮细胞是重要的内分泌细胞,可分泌多种血管活性物质参与血管舒展和紧缩调节,血管内皮分泌的血管活性物质主要可分为两大类:一类是内皮源性舒张因子(EDRF),包括NO等;另一类是内皮源性血管收缩因子(EDCF),如内皮素-1(ET-1)。正常生理情况下,EDRF和EDCF的平衡在保持正常血管张力、维持血管内皮的功能、维持器官的灌流、修复损伤及解除血管痉挛中起着重要的作用。本实验利用蛋白免疫印迹法(western blotting)检测葛根素对于视网膜内皮源性舒缩因子NO及ET-1的影响,从而为眼部不同缺血性疾病的临床选药提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 牛视网膜血管内皮细胞:购自北京中日友好医院临床研究所。试剂与药品:DMEM高糖培养基和胎牛血清(美国Gibco公司),胰酶、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT,美国Sigma公司),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;葛根素注射液(华北制药有限公司)。eNOS兔抗人多克隆抗体购自美国Abcam公司,ET-1兔抗人多克隆抗体购自德国Acris生物技术公司。主要仪

器与设备:ELX808 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),倒置显微镜(日本 Olympus 公司),伯乐电泳仪、转膜仪(MINI-PROTEAN):美国 Bio-RAD 公司;匀浆器(PRO200):美国 PRO 公司;摇床(DTY-2000):北京德天佑科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 视网膜血管内皮细胞的培养与传代

将购买的牛视网膜血管内皮细胞(RVECs)原代细胞复苏,用含 200g/L FBS、100mg/L ECGF、100mg/L 肝素以及 100×10^3 U/L 双抗的 DMEM 完全培养基接种于 20g/L 明胶包被的培养瓶,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱培养。以后每 4~5d 传代 1 次。取第 8 代视网膜血管内皮细胞用于实验。

1.2.2 实验分组

取生长良好、已达 90% 融合的细胞作为实验细胞,按 1:3 传代至 3 个培养瓶里。培养 48h 待细胞融合 75% 以上再随机分为 3 组:(1)阴性对照组:细胞外液为不加药物、无生长因子及血清的培养基;(2)葛根素低浓度组:细胞外液为含终浓度为 5μg/mL 葛根素、无生长因子及血清的培养基;(3)葛根素高浓度组:细胞外液为含终浓度为 50μg/mL 葛根素、无生长因子及血清的培养基。培养 48h 后收集细胞。

1.2.3 Western blotting 法测各组细胞 eNOS 及 ET-1 的表达

将收集好的细胞分别放入标记好的 2mL 离心管内,每管加入 100μL 裂解液,将离心管放入冰盒内孵育 20min,离心 12000rpm,20min,提取上清液,分装。将稀释好的 1-3BCA 标准品和待测蛋白样品各取 25μL 分别加到做好标记的 96 孔板内,每孔加入 200μL BCA 工作液,充分混匀,盖上 96 孔板盖,37℃ 孵育 30min,冷却至室温,用酶标仪测定 562nm 处的吸光度值,绘制标准曲线,计算样品中的蛋白浓度。将 SDS-PAGE 上样缓冲液与蛋白样品按照 1:4 的比例混匀,将蛋白样品放入沸水中加热 5min,冷却至室温,3000r/min 离心 30s 备用。SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离,电转至硝酸纤维素膜上,将转好的膜放入封闭液内封闭 1h。按要求稀释好一抗(NOS 1:100;ET-1 1:1500),将膜放入一抗内,4℃ 过夜孵育。TBST 洗 10min,4 遍,按要求稀释二抗(1:10000),将膜放入二抗内,室温孵育 50min。TBST 洗 6 遍,ECL 试剂显色曝光,冲洗显示条带,同时以 β-actin 作为内参照。信号强度用 IMAGE J 图像分析软件进行相对定量分析。

统计学分析:采用统计软件包 SPSS for Windows 17.0 统计软件,采用 ANOVA 方差分析处理多组及组间计量资料,用 LSD 法进行两两比较,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜血管内皮细胞各组 eNOS 的变化

葛根素对视网膜血管内皮细胞 eNOS 表达的影响(图 1)。1~3 组 eNOS 的相对表达量分别为 0.20 ± 0.03 , 0.63 ± 0.02 及 0.79 ± 0.05 ,三组间相比,差异有统计学意义($F = 371.15$, $P < 0.01$)。与阴性对照组相比,葛根素低浓度及高浓度组 eNOS 的相对表达量均升高($P < 0.01$),且随着药物浓度的增加 eNOS 的表达也增加。葛根素低浓度及高浓度两组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

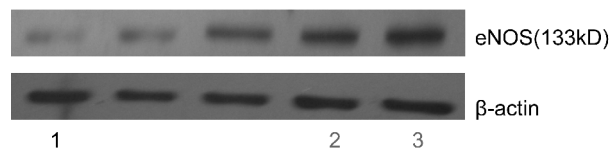


图 1 各组细胞 eNOS 表达的 Western Blot 结果 1:阴性对照组;2:葛根素低浓度组;3:葛根素高浓度组。

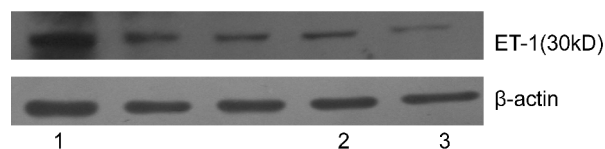


图 2 各组细胞 ET-1 表达的 Western Blot 结果 1:阴性对照组;2:葛根素低浓度组;3:葛根素高浓度组。

2.2 视网膜血管内皮细胞各组 ET-1 的变化

葛根素对视网膜血管内皮细胞 ET-1 表达的影响(图 2)。1~3 组 ET-1 的相对表达量分别为: 1.13 ± 0.07 , 0.49 ± 0.02 及 0.35 ± 0.03 ,三组间相比,差异有统计学意义($F = 416.93$, $P < 0.01$)。与阴性对照组相比,葛根素低浓度及高浓度组 eNOS 的相对表达量均升高($P < 0.01$),葛根素组 ET-1 的表达随着药物浓度的增加而下降,两组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 NO 和 NOS 在改善血液循环中的作用

血管内皮细胞的完整性对于维持血管正常的舒缩功能至关重要,除作为生理屏障外,还通过分泌多种血管活性物质调节平滑肌细胞和多种循环细胞的功能。其中内皮依赖性舒张因子(EDRF)和内皮细胞依赖性收缩因子(EDCF)功能的动态平衡对维持正常血管内皮功能具有非常重要的作用。一氧化氮(NO)是 EDRF 的主要成分,具有强大的松弛血管平滑肌的作用^[1]。作为 EDRF 的 NO 是由血流剪切力、血管活性物质等刺激内皮细胞通过 eNOS 催化产生^[2]。eNOS 产生基础状态的 NO,抑制平滑肌细胞增殖及向血管内膜下迁移;抑制血小板黏附及聚集功能,阻止血栓形成;抑制脂质过氧化及氧自由基的产生,使细胞免受超氧阴离子损伤^[3]。

由于 NO 为小分子气体物质,性状活跃,不易检测,因此我们通过检测 NO 合成的限速酶 NOS,间接检测血管内皮细胞内 NO 的表达变化。本实验用培养的视网膜血管内皮细胞,观察葛根素对内皮细胞分泌 NO 及 NOS 的表达的影响。结果发现葛根素能上调视网膜血管内皮细胞 eNOS 的表达,与对照组相比差异有显著性,说明葛根素通过增强 eNOS 的活性来增加视网膜血管内皮细胞分泌 NO,从而发挥其松弛血管平滑肌的作用。

在我们以前的研究中发现葛根素在一定浓度范围能促进视网膜血管内皮细胞的增殖,且存在剂量-效应关系^[4]。因此我们推测葛根素可能促使有利于内皮细胞生长的因子分泌,从而发挥保护内皮细胞的作用。在本实验中 Western Blot 结果显示:葛根素能显著上调 eNOS 的表达,这与吴平等的结果相一致^[5,6],有报道一氧化氮具有促进内皮细胞增殖的作用,提示葛根素促进内皮细胞的增殖是通过增加 eNOS 的表达,上调 NO 介导的。

3.2 ET-1 在血液循环中的作用 内皮素(endothelin,ET)是由内皮细胞和神经细胞合成释放的一种神经内分泌活性肽,具有收缩血管调节组织局部血流量的作用,是目前研究发现体内最强的缩血管物质,为内皮细胞依赖性收缩因子(EDCF)的主要成分。ET具有强大的缩血管作用,其中ET-1的缩血管作用最强。培养的牛血管内皮细胞可自然分泌大量ET-1,引起血管收缩^[7]。正常情况下视网膜血管的管径和血流量受非神经机制调节,即体液调节。目前认为NO和ET在这一系统中起关键作用^[8]。在基础条件下,内皮细胞释放一定量的ET,刺激视网膜周细胞收缩,管径变小,血流减少;另一方面,ET增多刺激内皮细胞合成并释放NO和PGI₂,使血管扩张,血流增多。内皮损伤后NO和ET间平衡失调,可直接影响有关酶的活性,导致血管舒缩功能紊乱,血管内皮受损及通透性改变。近来研究发现糖尿病患者血浆中ET-1水平升高^[9],可能与高血糖缺氧状态下血管内皮细胞受损有关。在本实验中Western Blot结果显示:葛根素能显著下调ET-1的表达,与对照组相比差异有显著性,说明葛根素通过抑制视网膜及脉络膜血管内皮细胞分泌ET-1,而减轻其缩血管的作用。

3.3 葛根素对视网膜血管内皮细胞舒缩因子的影响 NO和ET-1协调平衡,维持着血管的外周阻力和局部血管的舒缩状态,调节着视网膜的血液循环。本研究发现加药组视网膜血管内皮细胞的eNOS表达量增加,ET-1的表达均下调,且与对照组相比差异有显著性,据此可以推测葛根素可能通过调节血管一氧化氮内皮素(NO/ET)的比值,维持内皮依赖性舒张因子(EDRF)和内皮细胞依赖性

收缩因子(EDCF)功能的动态平衡,从而发挥松弛视网膜血管平滑肌的作用,改善视网膜的血流。这从细胞分子水平初步阐述了葛根素改善眼部血液循环的部分机制,对缺血性眼病的临床用药的选用具有重要指导意义。

参考文献

- 1 Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327(6122):524-526
- 2 Joshua W, Knowles, Robert L, et al. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS^{-/-} ApoE^{-/-} mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000;105(4):451-458
- 3 Grassi D, Desideri G, Ferreri C. Cardiovascular risk and endothelial dysfunction: the preferential route for atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2011;12(9):1343-1353
- 4 吴宁玲,吴旻旎,庄曾渊,等.葛根素对体外培养的视网膜血管内皮细胞增殖的影响. *眼科新进展* 2012;32(7):610-612
- 5 赵雪艳,李凌,许予明.葛根素对牛主动脉内皮细胞增殖的影响. *郑州大学学报(医学版)* 2009;44(6):1250-1253
- 6 朱庆磊,何爱霞,吕欣然.葛根素对氧自由基的清除和抗氧化性损伤作用. *解放军药学报* 2001;17(1):1-3
- 7 Takahashi K, Brooks RA, Kanse SM, et al. Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors and associated pericytes. *Diabetes* 1989;38(9):1200-1202
- 8 Kaiser H, Flammer J, Wenk M, et al. Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma; abnormal response to postural changes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995;233(8):484-488
- 9 YoKota T, Ma RC, Park JY, et al. Role of protein kinase C on the expression of platelet derived growth factor and endothelin in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes* 2003;52(3):838-845