

# 盐酸川芎嗪对血管紧张素 II 损伤内皮细胞的保护作用

高雪 杨洁 元英进\*

(天津大学制药工程系, 天津 300072)

**摘要** 以体外培养人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 为研究模型, 从细胞水平上分析了血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 损伤过程及中药川芎的一种有效成分——盐酸川芎嗪(tetramethylpyrazine hydrochloride, TMP·HCl)保护过程中内皮细胞的相关酶活性变化及信号转导规律。结果表明, 体外培养内皮细胞在 AngII 刺激下, 细胞活力降低; 且 ERK、JNK 的磷酸化程度, 内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)和诱生型一氧化氮合成酶(iNOS)表达量, 胞内抗氧化酶的活力分别发生变化; 而 TMP·HCl 预保护后, 发生相反变化, 同时提高了细胞活力, 证实 ERK、JNK、eNOS、iNOS 等信号分子以及活性氧参与细胞损伤及存活过程。

**关键词** 盐酸川芎嗪; 血管紧张素 II; 内皮细胞; MAPK; 一氧化氮合成酶

血管紧张素 II (angiotensinII, AngII) 是肾素-血管紧张素系统(rennin angio-tensin system, RAS) 的主要活性肽, 通过 G 蛋白偶联受体而激活 MAPK 家族中的 3 个主要的成员 ERK1/2、JNK、p38。研究表明, AngII 能诱导 ERK 和 JNK 途径的激活, 导致内皮细胞损伤<sup>[1,2]</sup>。血管内皮细胞在一氧化氮合成酶(NOS)催化下合成一氧化氮(NO)。NOS 在内皮细胞中主要表达两种亚型<sup>[3]</sup>: 内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)和诱生型一氧化氮合成酶(iNOS)。生理状态下, 在心血管系统中, 内皮细胞主要表达 eNOS, 几乎不表达 iNOS; 而在病理状态下, iNOS 大量表达, 产生过量 NO, 导致内皮细胞损伤。Andreozzi 等<sup>[4]</sup>发现内皮细胞在 AngII 刺激下, NOS 通过 AT2 受体途径激活, 诱导产生过量 NO, 损害内皮细胞。

本文从细胞分子水平上探讨胁迫因子盐酸川芎嗪(tetramethylpyrazine hydrochloride, TMP·HCl)和血管紧张素 II (angiotensinII, AngII)对体外培养内皮细胞的生理状态变化和相关信号转导过程的影响, 通过研究内皮细胞在胁迫状态下和保护状态下的行为规律, 初步阐明了 TMP·HCl 的相关药理作用机制, 为临床心血管疾病的防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与药物

TMP·HCl, 购自天津市药品检验所。AngII、胰蛋白酶、噻唑兰(MTT)、PMSF、青霉素和链霉素, 购自 Sigma 公司。Dulbecco 改进的 Eagle 培养基

(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), 购自 Gibco 公司。磷酸化的 ERK1/2、JNK 抗体、eNOS 和 iNOS 抗体, 辣根过氧化物酶标记的二抗及化学发光剂(ECL), 购自 Santa Cruz 公司。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

### 1.2 仪器

MK3 型全自动酶标仪购自 Thermo Labsystems 公司, 蛋白质电泳、转印系统购自美国 Bio-Rad 公司, MCO-17AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱购自三洋电机(中国)有限公司。

### 1.3 细胞培养

人脐静脉内皮细胞系 EA.hy926 由美国北卡罗来纳州大学的 Cora Jean S Edgell 博士赠送, 本实验室保存。细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.4 MTT 比色法检测细胞存活率

将 EA.hy926 细胞接种于 96 孔培养板中(2×10<sup>4</sup>个/孔), 细胞 75% 汇合时, 每孔分别加不同浓度(10、100 μmol/L) TMP·HCl 温育 24 h 后, 换无血清培养基, 加 1 μmol/L AngII 刺激 18 h, 每孔加入 100 μl 含 0.5 mg/ml MTT 的 DMEM 高糖培养基, 在细胞培养箱中继续培养 4 h。倾去上清液, 每孔加 150 μl DMSO,

收稿日期: 2007-04-05 接受日期: 2007-06-22

国家杰出青年基金资助项目(No.20425620)

通讯作者: Tel/ Fax: 022-27401149, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn

充分溶解甲臎结晶, 漩涡震荡数次, 在倒置显微镜下观察直到紫色结晶全部溶解, 用酶标仪测定每孔在 570 nm 波长处的吸光度值。

### 1.5 胞内 LDH 含量测定

将 EA.hy926 细胞接种于六孔培养板中( $10^5$  个/孔), 每孔加入细胞悬液 2 ml, 细胞 75% 汇合时, 细胞分为三组, 1) 对照组: 正常培养细胞; 2) 损伤剂组: 细胞只用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 18 h; 3) 药物加损伤剂组: 细胞先用 10、100  $\mu\text{g/ml}$  TMP-HCl 预处理 24 h, 然后再用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 18 h, 收集细胞, 用 PBS 洗 3 次, 离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 200 g, 5 min), 加裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 250 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.1% NP-40, 0.5 mmol/L PMSF, 10 mg/ml 抑蛋白酶肽, 10 mg/ml 亮抑蛋白酶肽, 1 mmol/L NaF, 0.1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mmol/L DTT) 600  $\mu\text{l}$ /管裂解(4  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min)。离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 14 000 g, 20 min)。取 100  $\mu\text{l}$  上清液, 用于胞内 LDH 含量测定。测定步骤按照试剂盒说明书测定 LDH 的渗出率。

### 1.6 SOD 和 CAT 活力测定

细胞处理方法同 1.5。经过药物处理后, 收集细胞, 用 PBS 洗细胞 3 次, 用裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% Triton X-100)裂解细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min, 离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 14 000 g, 20 min), 取 10  $\mu\text{l}$  上清液, Bradford 方法测定蛋白质含量。取部分上清液测定细胞内 SOD 和 CAT 活力。SOD 活力分析采用联苯三酚自氧化法。CAT 活力分析采用紫外速率直接法。具体步骤如自由基医学研究方法所示<sup>[5]</sup>。

### 1.7 免疫印迹分析

将 EA.hy926 细胞接种于六孔培养板中( $10^5$  个/孔), 细胞 75% 汇合时, 换无血清培养基, 用以下方法处理细胞: (1) 加 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激不同时间(0、15、30、60 min)。(2) 细胞分为三组, 1) 对照组: 正常培养细胞; 2) 损伤剂组: 细胞只用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 30 min; 3) 药物加损伤剂组: 细胞先用 10、100  $\mu\text{g/ml}$  TMP-HCl 预处理 24 h, 然后再用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 30 min。

细胞用实验方法处理后, 用冷 PBS (0.01 mol/L) 洗 3 遍, 洗去残存培养基和细胞碎片, 加裂解液裂解(4  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min)。将细胞用刷子刮下, 收集并离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 14 000 g, 15 min), 取上清液。用 Bradford 方法检测蛋白质含量。进行 SDS-PAGE 电泳, 每孔上样量为 20  $\mu\text{g}$  蛋白质, 湿法转移蛋白质至硝酸纤维素膜, Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.5, 5% 脱脂奶粉, 0.1%

Tween-20) 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。洗膜后将纤维素膜与 p-ERK、p-JNK、eNOS 或 iNOS 一抗温育 2 h, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗温育 1 h, 最后与 ECL 化学发光增强剂反应 1 min, 暗室中在 X 光片成像。

### 1.8 数据及统计处理

实验重复 3 次, 结果用均值加减标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。数据均用统计学软件 SPSS 12.0 进行统计学分析,  $P < 0.05$  为有显著差异性。

## 2 结果

### 2.1 TMP-HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组细胞相比, 用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激 18 h 的细胞存活率约降低 40%。而用不同浓度(10、100  $\mu\text{mol/L}$ )TMP-HCl 温育 24 h 后, 再用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激 18 h, 存活率相对提高, 且呈浓度依赖性。当浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞存活率为对照组细胞的 80%, 比不用 TMP-HCl 保护的受刺激细胞的存活率提高 20%。该实验结果提示 TMP-HCl 对 AngII 诱导的内皮细胞损伤有一定的保护作用, 且呈浓度依赖性。

### 2.2 TMP-HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞 LDH 渗出率的影响

如图 2 所示, 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 18 h 后, 胞外 LDH 渗出率显著提高, 大约是对照组的 2 倍。分别用 10、100  $\mu\text{mol/L}$  TMP-HCl 预处理 24 h, LDH 渗出受到抑制。用 10  $\mu\text{mol/L}$  TMP-HCl 预处理的细胞, LDH 渗出率降低了约 14%, 100  $\mu\text{mol/L}$  TMP-HCl 使细胞 LDH 渗出率降低了约 35%。因而可以得知

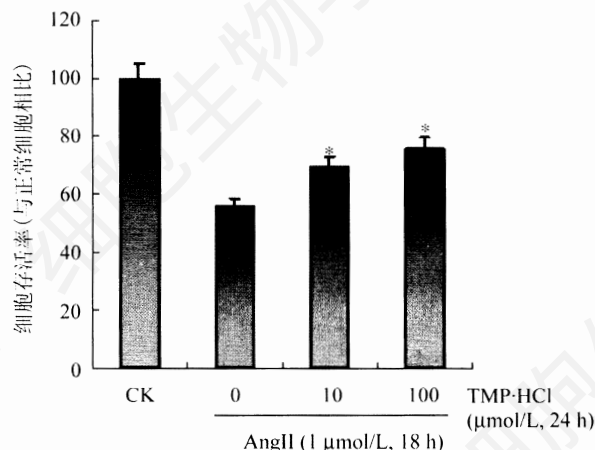


图 1 不同浓度 TMP-HCl 对内皮细胞存活率的影响  
与仅用 AngII 处理的细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

TMP·HCl 可以浓度依赖性的降低 LDH 渗出率。

### 2.3 TMP·HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞 SOD 和 CAT 水平的影响

如图 3 所示, 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 处理 18 h 后, SOD 和 CAT 活力显著降低, 分别降低到了对照组的 50% 和 35% 左右。分别用 10、100  $\mu\text{mol/L}$  TMP·HCl 预处理 24 h, SOD 和 CAT 活力得到显著提高。10  $\mu\text{mol/L}$  TMP·HCl 作用于细胞, SOD 和 CAT 活力的活力分别提高约 30% 和 45%。而 100  $\mu\text{mol/L}$  TMP·HCl 作用于细胞, SOD 和 CAT 活力的活力分别提高约 35% 和 40% SOD 能清除体内的超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ ), CAT 能使体内的  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ 。TMP·HCl 可以显著地增加内皮细胞胞内 SOD 和 CAT 活力, 表明 TMP·HCl 能提高胞内抗氧化能力。

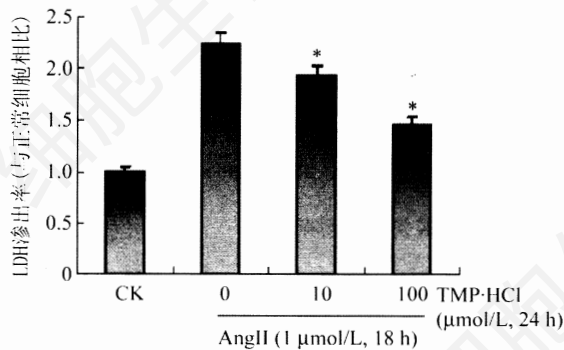


图2 TMP·HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞 LDH 渗出率的影响与仅用 AngII 处理的细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

### 2.4 AngII 对 ERK 和 JNK 磷酸化的影响

如图 4 所示, 用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 诱导细胞不同时间(0, 15, 30, 60 min)后, 很快激活细胞内 ERK1/2 磷酸化, 且在刺激 30 min 时表达最高。

### 2.5 TMP·HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞 ERK 和 JNK 磷酸化的影响

如图 5 所示, 用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 诱导细胞 30 min 后, 很快激活细胞内 ERK1/2、JNK, 加了 TMP·HCl (10, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 预保护的细胞 ERK 和 JNK 磷酸化程度随药物浓度增高而降低, 且呈浓度依赖性, 其激活程度与 TMP·HCl 浓度成反比。

### 2.6 盐酸川芎嗪对 AngII 损伤的内皮细胞 eNOS 和 iNOS 表达的影响

如图 6 所示, 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激 30 min 过后,

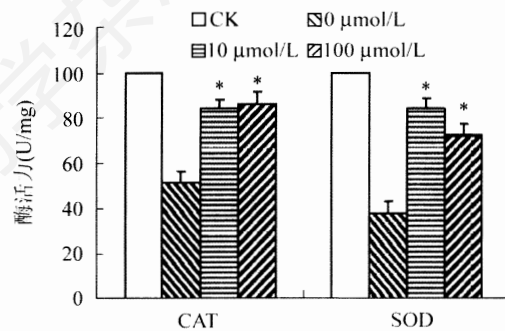


图3 TMP·HCl 对 AngII 损伤的内皮细胞 CAT 和 SOD 的影响与仅用 AngII 处理的细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

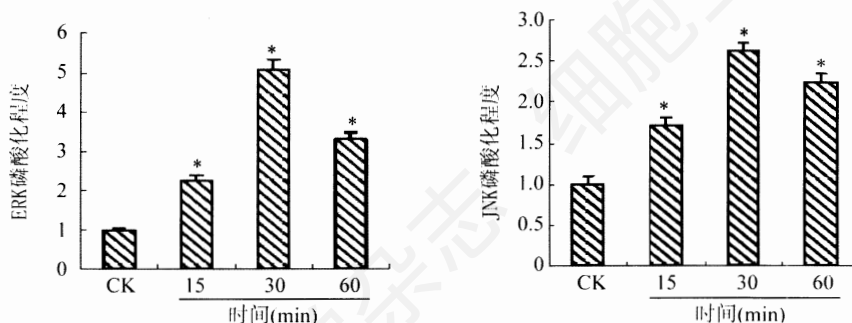
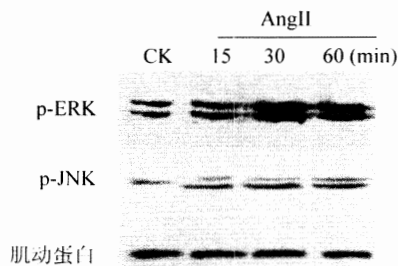


图4 不同刺激时间对内皮细胞 ERK1/2 和 JNK 激活的影响与正常培养细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

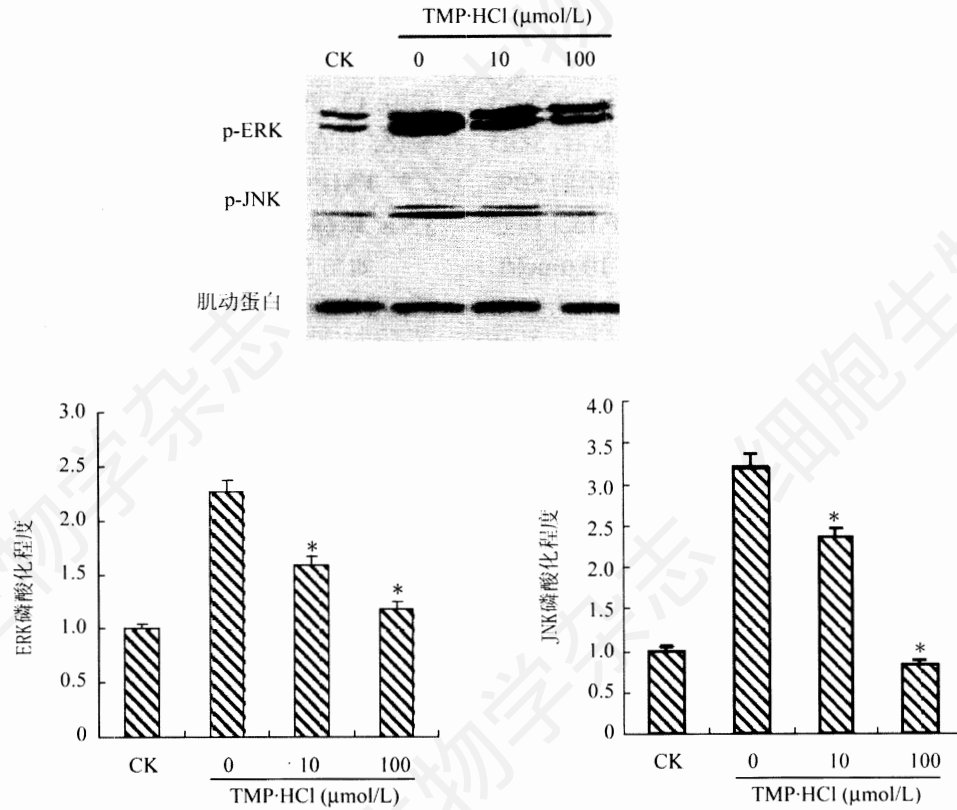


图5 不同浓度 TMP-HCl 对内皮细胞 ERK1/2 和 JNK 激活的影响  
与仅用 AngII 处理的细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

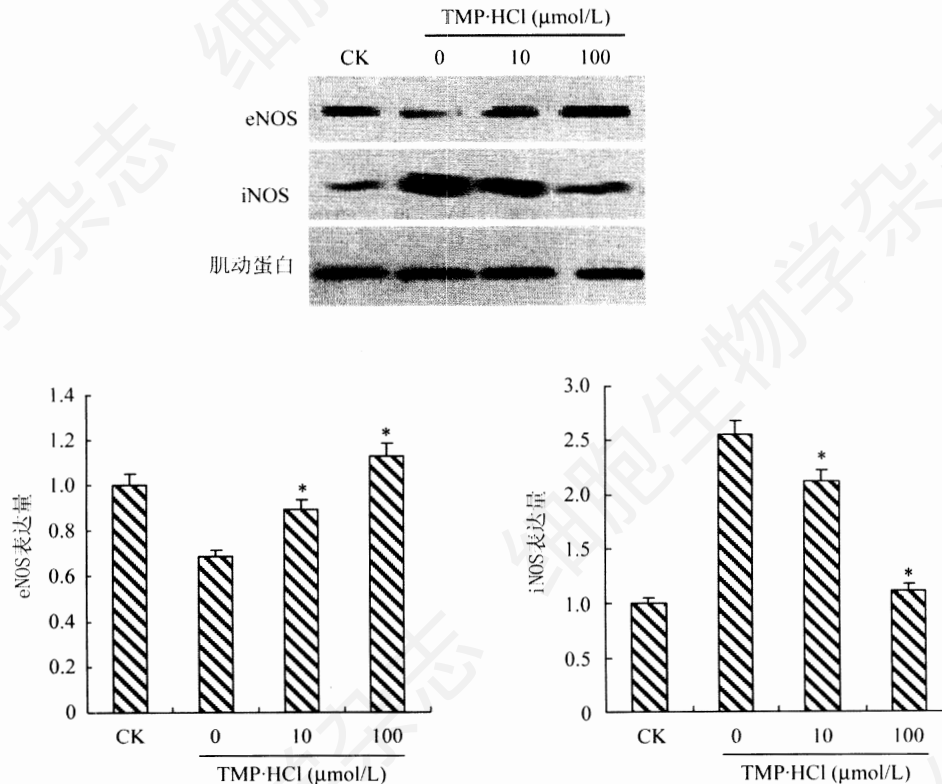


图6 不同浓度 TMP-HCl 对内皮细胞 eNOS 和 iNOS 表达的影响  
与仅用 AngII 处理的细胞比较, \* $P < 0.05$ ; CK: 正常培养细胞。

内皮细胞中 eNOS 表达量下降而 iNOS 表达量增高。用不同浓度(10、100  $\mu\text{mol/L}$ )TMP·HCl 对细胞进行预处理 24 h 后,再用 1  $\mu\text{mol/L}$  AngII 刺激细胞 30 min,随 TMP·HCl 浓度增加,eNOS 表达量增加,而 iNOS 表达量下降。这说明 AngII 可以抑制内皮细胞内 eNOS 的表达,而使 iNOS 的表达量增加。而 TMP·HCl 可以浓度依赖性的提高内皮细胞内的 eNOS 表达,降低 iNOS 表达。

### 3 讨论

从信号转导角度研究细胞损伤的保护,对认识病理及防治有重要意义。研究表明<sup>[6]</sup>,川芎嗪可以通过抑制内皮细胞产生内毒素等机制起到对内皮细胞的保护作用。本研究也表明,TMP·HCl 能提高 AngII 损伤的内皮细胞活力,抑制 AngII 诱导的 LDH 的渗出,对内皮细胞具有保护作用。但在 TMP·HCl 预保护下,AngII 对内皮细胞损伤信号转导通路的影响至今未见报道。众所周知,ERK1/2、JNK 信号途径的激活,可能导致细胞的增殖、存活、损伤<sup>[7,8]</sup>等。越来越多的证据表明,活性氧(ROS)与 MAPK 途径参与血管内皮的损伤<sup>[9]</sup>,MAPK 途径可能是 ROS 诱导的细胞损伤或凋亡的下游途径<sup>[10]</sup>。SOD 和 CAT 能提高内皮细胞抗氧化损伤的能力<sup>[11]</sup>。实验结果表明,TMP·HCl 能提高 SOD 和 CAT 活力,清除胞内大量积累的 ROS<sup>[12]</sup>,保护细胞减少氧化损伤。所以,本文认为很可能是 AngII 能促使内皮细胞产生大量 ROS,增强细胞内超氧阴离子活动<sup>[13]</sup>,激活 ERK 和 JNK 磷酸化,导致细胞损伤。

通过用 NOS 的表达量表示 NO 的产量<sup>[14]</sup>,表明 TMP·HCl 能提高 AngII 损伤的内皮细胞 eNOS,这可能导致 NO 的产量提高,而 NO 对 AngII 损伤的内皮细胞是具有保护作用的<sup>[15]</sup>。但在 AngII 刺激下,内皮细胞病理性酶 iNOS 表达增高,其催化产生 NO 能和  $\text{O}_2^-$  反应形成过氧亚硝基(ONOO<sup>-</sup>),再迅速分解产成羟自由基(OH<sup>·</sup>),在体内诱导巯基氧化和脂质过氧化而引起细胞损伤。而 TMP·HCl 的加入,降低了 iNOS 的表达,对损伤的内皮细胞产生保护作用。Chan 等<sup>[16]</sup>

认为 ERK 和 JNK 途径上调 iNOS 的表达,虽然本实验中,NOS 和 MAPK 的相互关联未深入研究,但是 MAPK 磷酸化以及 iNOS 表达量的增高,其在细胞内信号转导途径必然存在相互关联。

综上所述,AngII 可能诱导内皮细胞产生大量 ROS,降低了 SOD 和 CAT 活力,并激活了 ERK 和 JNK 磷酸化途径,致使病理性的 iNOS 表达,过量产生的 NO 和 ROS 生成 ONOO<sup>-</sup>,导致内皮细胞损伤。而 TMP·HCl 的加入,能清除体内大量的 ROS,增强对 SOD 和 CAT 的活力,抑制 ERK1/2 和 JNK 的磷酸化,能促进 AngII 抑制的 eNOS 的表达,而且抑制 iNOS 的表达,从而调节细胞中 NO,达到保护内皮细胞的作用。

实验进一步证实了 AngII 对内皮细胞有损伤的作用,用 TMP·HCl 预处理后能减弱 AngII 的损伤作用。说明,TMP·HCl 能保护内皮细胞的损伤作用,其抑制机制可能与 ERK、JNK 的信号通路有关。本研究为探索 TMP 防治以内皮细胞损伤为主要病变的心血管疾病的分子机制提供了新的实验依据,为进一步探讨动脉粥样硬化、高血压、冠状动脉血管疾病的发病机制提供了新的资料。但是有关 ROS、NOS 和 MAPK 之间的调控关系,还有待实验进一步考证。

### 参考文献(References)

- [1] Pintucci G *et al. Surgery*, 1999, **126**: 422
- [2] Pombo CM *et al. J Biol Chem*, 1994, **269**: 26546
- [3] Michel T *et al. J Clin Invest*, 1997, **100**: 2146
- [4] Andreozzi F *et al. Circ Res*, 2004, **94**: 1211
- [5] 庞战军. 自由基医学研究方法,北京:人民卫生出版社,2000,16
- [6] Zhao H *et al. Microvasc Res*, 2002, **63**: 218
- [7] Brand S *et al. J Cell Biochem*, 2006, **97**: 709
- [8] Kayisli UA *et al. J Soc Gyneco Invest*, 2006, **13**: 86A
- [9] Salameh A *et al. Blood*, 2005, **106**: 3423
- [10] Lopez Farre A *et al. Hypertension*, 2001, **38**: 1400
- [11] Hou YZ *et al. Life Sci*, 2004, **75**: 1775
- [12] Muzykantov VR. *J Controll Release*, 2001, **71**: 1
- [13] Dabrowski A *et al. Pancreas*, 2000, **21**: 376
- [14] Papapetropoulos A *et al. J Clin Invest*, 1997, **100**: 3131
- [15] Dimmeler S *et al. Regul Pept*, 2000, **90**: 19
- [16] Chan ED *et al. Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, **280**: C441

## Protective Effect of Tetramethylpyrazine Hydrochloride on Endothelial Cell Injury Induced by Angiotensin II

Xue Gao, Jie Yang, Ying-Jin Yuan\*

(Department of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract** We set human umbilical vein endothelial cell line EA.hy926 as a model to analyze the activity changes of relative enzymes and regulation mechanism of relative signal pathways of the model under the condition of injury by angiotensin II (AngII) and / or protection by tetramethylpyrazine hydrochloride (TMP·HCl), an effective component of traditional Chinese medicine *Ligusticum chuanxiong Hort.* Results showed that viability of cultured endothelial cell decreased after stimulating by AngII, while phosphorylation level of ERK and JNK expression, amount of eNOS and iNOS, activity of SOD and CAT altered. Pretreatment by TMP·HCl reversed all these changes and increased the cell viability, which demonstrated that ERK, JNK, eNOS, iNOS and ROS play important roles in the process of cell injury and survival.

**Key words** tetramethylpyrazine hydrochloride; angiotensin II; endothelial cell; MAPK; NOS

Received: April 5, 2007 Accepted: June 22, 2007

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.20425620)

\*Corresponding author. Tel/ Fax: 86-22-27401149, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn