

通心络对 A β 损伤脑微血管内皮细胞中炎症因子及信号通路 NF- κ B 表达的影响

张志慧, 曹冉, 周龙岗, 葛小丽, 魏聪

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(No. 2005CB523301)

作者单位: 050035 石家庄, 河北以岭医药研究院/国家中医药管理局心脑血管络病重点研究室(张志慧、周龙岗、葛小丽、魏聪);
050091 石家庄, 河北医科大学附属以岭医院(曹冉)

【摘要】 目的 探讨通心络对 β 淀粉样蛋白片段(A β_{1-42})诱导的人脑微血管内皮细胞中炎症因子、信号通路 NF- κ B 表达的影响。方法 采用人脑微血管内皮细胞, 给予不同剂量的通心络预处理, 并用 20 μ mol/L 的 A β_{1-42} 干预 24 h 诱导细胞损伤, 检测经处理后细胞内炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及信号通路 NF- κ B 的表达。结果 A β_{1-42} 可诱导人脑微血管内皮细胞炎症反应, IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 均不同程度升高, 信号通路 NF- κ B 表达增强, 而通心络可有效降低 IL-1、IL-6、TNF- α 及信号通路 NF- κ B 的表达, 且呈现剂量依赖性。结论 A β_{1-42} 可通过信号通路 NF- κ B 诱导人脑微血管内皮细胞的炎症反应, 而通心络可以逆转这一现象, 这可能是通心络治疗老年性痴呆(AD)的作用机制之一。

【关键词】 通心络; 人脑微血管内皮细胞; β 淀粉样蛋白片段; 炎症因子; 信号通路

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2010.09.001

The intervention effect of Tongxinluo on inflammatory factors, NF- κ B signaling pathway in brain microvascular endothelial cells injured by A β ZHANG Zhi-hui*, CAO-Ran, ZHOU Long-gang, et al. * Yiling Pharmaceutical Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050035, China

【Abstract】 Objective To explore the intervention effect of *Tongxinluo* on inflammatory factors, NF- κ B signaling pathway in the brain microvascular endothelial cells injured by amyloid A β_{1-42} . **Methods** The human brain microvascular endothelial cells were pre-incubated by *Tongxinluo*, then injured by β amyloid $_{1-42}$. IL-1 β , IL-6, TNF- α were detected by ELISA, and NF- κ B signaling pathway was detected by western blot. **Results** It demonstrated that the A β_{1-42} could induce the inflammatory reaction in human brain microvascular endothelial cells, and improve the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , while the *Tongxinluo* could decrease the expression of inflammatory factors and NF- κ B signaling pathway dose-dependent. **Conclusion** The A β_{1-42} could induced the inflammatory reaction in human brain microvascular endothelial cells with NF- κ B signaling pathway, while the traditional Chinese medicine *Tongxinluo* could inverse it, which may be one of the mechanism of *Tongxinluo* on treatment Alzheimer disease.

【Key words】 *Tongxinluo*; Human brain microvascular endothelial cells; Amyloid β protein; Inflammatory factor; Signaling pathway

β 淀粉样蛋白片段(A β)被认为是导致老年性痴呆(AD)的直接病理原因^[1]。通心络是治疗心脑血管病的复方制剂, 由人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片组成, 具有益气活血、通经活络功效。该药治疗神经退行性病变的报道较少, 本研究观察通心络对 β 淀粉样蛋白片段 A β_{1-42} 损伤脑微血管内皮细胞的保护作用, 以及人脑微血管内皮细胞受损后炎症因子、信号通路 NF- κ B 表达, 为通心络治疗 AD 提供更多的实验依据和理论基础。

1 材料与方

1.1 材料 通心络药粉由石家庄以岭药业股份有限公司生产(批号:070901)。主要试剂:A β_{1-42} 为国家疾病预防控制中心病毒学研究所馈赠; 人脑微血管内皮细胞株, 购自美国 ATCC 试剂公司; 白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒购于美国 ADL 公司; NF- κ B 抗体购自 Santa cruz Biotechnology 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人脑微血管内皮细胞复苏: 从液氮中迅速取出装有人脑微血管内皮细胞的冻存管, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养

基转移至细胞培养瓶中,置 37℃,5% CO₂ 培养箱中继续传代培养,待细胞生长至融合状态后用 0.5% 胰蛋白酶消化传代备用。

1.2.2 Aβ₁₋₄₂ 的老化处理:将 Aβ₁₋₄₂ 1mg 溶解在 1ml 的 DMEM 培养基中,置于 37℃ 孵箱中孵育 7d,使其成为凝聚状态,然后置 -20℃ 贮存备用。

1.2.3 分组及药物处理:细胞培养后,取对数生长期的人脑微血管内皮细胞以 10⁵ cell/ml 密度接种于 6 孔板,实验分为 5 组:(1)空白对照组:用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 6h 后,换新鲜 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后进行检测;(2)模型组:用 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 6h 后,换新鲜 10% FBS 的 DMEM 培养基,加入终浓度为 20 μmol/L Aβ₁₋₄₂ 作用 24 h 诱导细胞损伤;(3)通心络组(包括小、中、大剂量组):细胞培养后,分别加入终浓度为小剂量(100 μg/ml)、中剂量(200 μg/ml)、大剂量(400 μg/ml)的通心络预处理 6h,换新鲜 10% FBS 的 DMEM 培养基,并加入终浓度为 20 μmol/L 的 Aβ₁₋₄₂ 作用 24h 诱导细胞损伤^[2]。

1.3 检测指标 IL-1β、IL-6、TNF-α 表达:实验结束后,收集各组细胞培养液,离心取上清液,ELISA 检测 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达,具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书严格操作。NF-κB 蛋白的表达:实验结束提取各组内皮细胞蛋白,各组取 30 μg 样品蛋白行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(100V, 3h)后,转入硝酸纤维素膜;应用 5% 的脱脂奶粉(TBST 稀释,pH 7.4)室温封闭硝酸纤维素膜 1h,加入 1:200 稀释的 NF-κB 特异性人抗多克隆抗体,4℃ 密封过夜;次日,TBS-T 振荡洗膜后,应用荧光鼠源二抗孵育 1.5 h,TBS-T 振荡洗膜后,再经 TBS-T 洗膜 1 次,在 Odyssey 扫膜仪上成像分析,判断 NF-κB 的诱导情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 通心络对 Aβ₁₋₄₂ 损伤的人脑微血管内皮细胞中炎症因子分泌的影响 与空白对照组比较,模型组 IL-1β、IL-6、TNF-α 均升高(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);与模型组比较,通心络 3 个剂量均可降低 IL-1β、TNF-α、IL-6 的水平(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),且大剂量组优于中、小剂量组(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 通心络对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的人脑微血管内皮细胞炎症因子分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	IL-1β	TNF-α	IL-6
空白对照组	155.2 ± 0.1	162.0 ± 6.5	165.1 ± 1.7
模型组	201.2 ± 0.1 [#]	230.6 ± 6.3 [*]	231.5 ± 4.8 [#]
通心络大剂量组	158.2 ± 0.1 [*]	164.3 ± 8.4 [*]	159.2 ± 1.0 [*]
通心络中剂量组	179.3 ± 0.2 ^{ΔΔ}	183.8 ± 6.2 ^{ΔΔ}	181.6 ± 9.2 ^{ΔΔ}
通心络小剂量组	181.3 ± 0.1 ^{ΔΔ}	189.1 ± 2.3 ^{ΔΔ}	170.0 ± 9.8 ^{ΔΔ}

注:与空白对照组比较,**P* < 0.05,[#]*P* < 0.01;与模型组比较,Δ*P* < 0.05,^{*}*P* < 0.01;与通心络大剂量组比较,Δ^Δ*P* < 0.01

2.2 通心络对 Aβ₁₋₄₂ 损伤的人脑微血管内皮细胞中信号通路 NF-κB 表达的影响 与空白对照组比较,模型组 NF-κB 蛋白表达增强(*P* < 0.01);与模型组比较,通心络 3 个剂量均可降低 NF-κB 蛋白表达(*P* < 0.01)。见图 1。

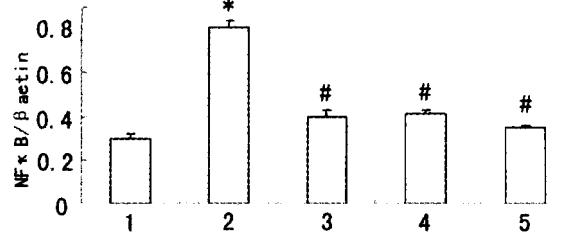
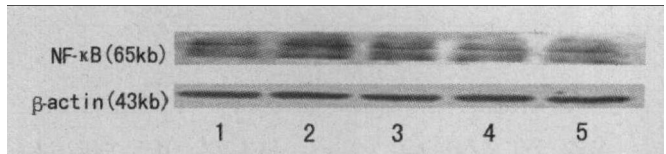


图 1 各组人脑微血管内皮细胞中 NF-κB 蛋白的表达
注:与空白对照组比较,**P* < 0.01;与模型组比较,[#]*P* < 0.01
1. 空白对照组;2. 模型组;3. 通心络大剂量组;4. 通心络中剂量组;5. 通心络小剂量组

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)最常见病理为神经细胞丢失,神经纤维缠结,老年斑,血管淀粉样改变^[2,3]。Aβ 包括分别含有 40 个和 42 个氨基酸残基的多肽 Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂。虽然 Aβ₄₂ 的量较 Aβ₄₀ 少得多,但 Aβ₄₂ 以更加稳定的形式存在于老年斑和神经原纤维缠结中。Aβ 是淀粉样沉淀的产物,被认为是导致 AD 的直接病理原因^[4],同样,Aβ 沉积脑血管的改变也是老年性痴呆的发病机制^[5]。Aβ 损伤的目标是中枢神经系统的小动脉、细动脉和毛细血管,有人认为“脑微血管疾病触发了 AD”^[6]。有人把 AD 定义为“内皮细胞介导的神经元退行性病变”^[7]。Aβ 对脑微血管的损伤中,炎症反应是主要的,研究认为 AD 也许是由年龄相关的炎症过程所导致^[8]。对 AD 患者脑中的微血管培养液进行检测,ELISA 结果发现 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达增高,非痴呆的老年人微血管培养液中炎症因子的增高不明显,此结果说明微血管内皮细胞存在炎症因素^[7]。IL-1β、IL-6、TNF-α 细胞因子 mRNA 表达均为 NF-κB 依赖性,用 NF-κB 特异性抗体进行组织切片染色显示核定位的 NF-κB 活性的增加,同时伴有炎症细胞聚集的增加和前炎症细胞因子如 IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 的合成^[9]。由于 NF-κB 在前炎症因子基因表达和机体免疫功能中发挥重要作用,其活化控制是减少因炎症因子所致组织损伤的有效治疗策略^[10]。

通心络可不同程度降低炎症因子表达,且随剂量增加效果更明显^[11],表明通心络可以有效抑制 Aβ 所致的人脑微血管内皮细胞炎症反应,在炎症因子升高的同时,信号通路分子 NF-κB 表达增强,由于 IL-1β、IL-6、TNF-α 细胞因子表达均为 NF-κB 依赖性,Aβ₁₋₄₂ 所诱导人脑微血管内皮细胞的炎症反应有可能是通过信号通路分子 NF-κB 上调而实现的,而通心络可同时抑制 NF-κB 及 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达,这在一定意义上表示通心络有效抑制其中的炎症反应是通过下调信号通路分子 NF-κB 而实现的,这可能是通心络治疗老年性痴呆的机制之一。

参考文献

- Panchal M, Rholam M, Brakch N. Abnormalities of peptide metabolism in Alzheimers' disease[J]. Curr Neurovasc Res, 2004, 1(4): 317-323.
- 张志慧,吴以岭. 通心络对 Aβ₁₋₄₂ 损伤人脑微血管内皮细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(7):504-505.

- 3 Scarpini E, Scheltens P, Feldman H, et al. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives [J]. The LANCET Neurology, 2003, 2(9): 539-547.
- 4 Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. Physiol Rev, 2001, 81(2): 741-766.
- 5 Rodriguez MT, Caiella AM, Silva S, et al. Apolipoprotein E and intronic polymorphism of presenilin 1 and alpha-1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2000, 11(5): 239-244.
- 6 Knopman D, Boland LL, Mosley T, et al. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults [J]. Neurology, 2001, 56(1): 42-48.
- 7 Grammas P, Ovase R. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease [J]. Neurobiology of Aging, 2001, 22(6): 837-842.
- 8 Gottlieb S. Scientists propose a new theory for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. BMJ, 2001, 322: 1085.
- 9 Li QT, Verma IM. NF-κB regulation in the immune system [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2(4): 725-734.
- 10 蒋培余. NF-κB 及其相关分子在炎症性疾病中作用的探讨 [J]. 湖州师范学院学报, 2004, 26(2): 99.
- 11 吴士珍, 吴相锋, 袁国强, 等. 缺氧大鼠血管内皮功能的变化及通心络超微粉的干预作用 [J]. 疑难病杂志, 2009, 8(3): 131.

(收稿日期: 2009-10-21)

罕见病例

华法令引发罕见过敏性哮喘 1 例

胡国薇, 于桂兰, 王莉璞

作者单位: 100730 中国医学科学院/中国协和医科大学北京协和医院卫干科

【关键词】 华法令; 哮喘; 过敏性; 不良反应
 【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2010.09.002

患者, 男, 80 岁。因发作性头晕、乏力 4 h 于 2009 年 8 月就诊。门诊心电图示心房扑动, 心室率 117 次/min; 心脏彩超示双房增大, 左房内径 56 mm × 37 mm, 右房内径 54 mm × 37 mm, 室间隔轻度增厚, LVEF 0.67, 主动脉根部增宽, 老年性主动脉瓣退行性变; 24 h 动态心电图: 心搏总数 117 271 次, 心率 58 ~ 143 次/min, 未见室性心律失常。予美托洛尔 12.5 ~ 37.5 mg, 每日 2 次; 门冬氨酸钾镁(潘南金) 2 片, 每日 3 次; 地高辛 0.125 mg, 每日 1 次; 盐酸曲美他嗪(万爽力) 2 片, 每日 3 次; 拜阿司匹林 0.1 g, 每日 1 次。未再头晕, 但感乏力。2 周后复查心电图仍示心房颤动、心房扑动; 心室率 104 ~ 120 次/min, 故考虑单独药物难以转复和维持窦律, 且心室率控制欠满意, 拟行射频消融术治疗收住院。既往有高血压病史。入院查体: T 36.2℃, P 90 次/min, BP 150/80 mmHg。8 月 20 日行右心房峡部房扑射频消融术。手术顺利, 术后心电图呈窦性心律。患者未再头晕、胸闷、心悸。术前 3 d 予低分子肝素抗凝, 美托洛尔 25 mg 每 12 小时 1 次控制心室率, 术后当日 16:00 始予华法令 3 mg 抗凝治疗。华法令应用第 2 日 18:00 患者出现憋气、干咳, 坐立位症状无改善, 听诊肺内哮鸣音, 可必特复方气雾剂、普米克令舒雾化后症状可缓解。即停用美托洛尔后症状仍每晚出现, 支气管扩张剂可完全缓解。患者既往无支气管哮喘及过敏病史。初次发病在使用华法令 1 d 后, 发病时间窗吻合, 停用华法令, 喘憋症状未再出现。

讨论 根据患者临床表现和检查, 其肺源性哮喘诊断明确。患者既往无支气管哮喘及过敏病史, 药物引发哮喘可能性

大; 虽然常见药物美托洛尔诱发哮喘常见, 但患者门诊及术前均有应用, 停用症状亦无缓解, 基本除外由其引起的可能性; 患者发作哮喘有明显时间规律, 均夜间出现, 与华法令给药时间窗吻合, 并且停用华法令后患者未再发作哮喘, 进一步提供了华法令引发哮喘的证据, 可以肯定诊断。华法令是一种抗凝剂, 它通过抑制维生素 K 的依赖因子 II、VII、IX、X 以及抗凝血蛋白 C 和 S 的合成而发挥作用, 主要用于防治血栓栓塞性疾病。其主要不良反应是出血^[1], 部位多为消化道、泌尿道、皮肤及软组织, 少见不良反应为皮肤坏死^[2]、紫趾综合征^[3]等。目前国内尚无华法令引发哮喘的文献报道。

药物引起的哮喘发病机制常见以下 2 方面: (1) I 型速发型超敏反应学说, 机体接受药物产生 IgE 抗体, IgE 与肥大细胞、嗜碱细胞结合(致敏细胞), 同种药物再进入机体与细胞表面 IgE 特异结合形成复合物引起哮喘。(2) 类过敏反应学说^[4], 可能与慢反应物和前列腺素以及组胺等介质释放有关。华法令引发哮喘的机理是否同其他药物相同尚不清楚。

参考文献

- 1 Gibbar-Clements T, Shirrell D, Dooley R, et al. The challenge of warfarin therapy [J]. Am J Nurs, 2000, 100(3): 38-40.
- 2 Chan YC, Valenti D, Mansfield AO, et al. Warfarin induced skin necrosis [J]. Br J Surg, 2000, 87(3): 266-272.
- 3 Al-Niaimi F, Clark C. A case of unilateral purple toes due to warfarin [J]. Clin Exp Dermatol, 2009, 34(4): 527-528.
- 4 蒋彦章. 类过敏反应. 药物流行病学杂志 [J]. 1993, 2(3): 150-152.

(收稿日期: 2010-05-27)