

◇ 中药复方药物药理学 ◇

通心络对 $A\beta_{1-42}$ 损伤人脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 、VEGF 表达的干预作用

张志慧¹ 吴以岭^{1,2,3}

(1. 河北医科大学附属以岭医院 河北 石家庄 050091; 2. 河北以岭医药研究院 河北 石家庄 050035;

3. 国家中医药管理局重点研究室(心脑血管络病) 河北 石家庄 050035)

中国图书分类号: R 287; R 322.12; R 322.81; R 329.24;
R 394.2; R 745.702.2; R 745.705.31

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2010)01-0124-04

摘要:目的 通心络对 β 淀粉样蛋白片段 ($A\beta_{1-42}$) 诱导的人脑微血管内皮细胞中 VEGF 的分泌及 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达的干预作用。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 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 干预 24 h 诱导细胞损伤, 经处理后检测细胞形态的变化、VEGF 分泌及 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白的表达。结果 $A\beta_{1-42}$ 可诱导人脑微血管内皮细胞损伤, VEGF 分泌减少及 VEGF 蛋白表达降低, HIF-1 α 蛋白表达增强。通心络可升高 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 VEGF 分泌, 增强其蛋白的表达, 增强 HIF-1 α 蛋白表达, 保护内皮细胞。结论 通心络可通过 HIF-1 α 途径增强 VEGF 蛋白的表达, 增加血清中 VEGF 蛋白的分泌, 从而对 $A\beta_{1-42}$ 损伤的脑微血管内皮细胞起到保护作用。

关键词: 人脑微血管内皮细胞; $A\beta_{1-42}$; VEGF; HIF-1 α ; 通心络

阿尔采末病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发生于老年人的原发性中枢神经系统退化性疾病^[1]。迄今为止, AD 的病因不清楚, 尚无有效的治疗措施^[2~4]。最常见病理见于神经细胞的丢失, 神经纤维缠结、老年斑、血管淀粉样改变^[5,6]。缺氧是机体最为常见的损伤因素, 缺氧对血管内皮细胞 (vascular endothelial cells, VEC) 的结构和功能有复杂的影响, 从而影响内皮细胞 (EC) 许多重要生理功能的发挥^[7,8]。由于缺氧的机制在 AD 发病过程中的重要性, 因此, HIF-1 α 的调节作用可能在 AD 的发病过

程中起到重要作用^[9~11]。实验证实, AD 患者脑微血管中 HIF-1 α 是增加的。正常情况下, 由于缺氧的刺激, 应不断会有新生血管出现, 而在 AD 中新生血管生成不明显是由于 $A\beta$ 的沉积及对血管新生的抑制造成的^[12]。同时血管内皮生长因子 (VEGF) 是 HIF-1 α 的一个重要靶基因, 也是血管生成的主要调节因子。本研究中我们用 $A\beta_{1-42}$ 损伤脑微血管内皮细胞来建立老年性痴呆脑内皮细胞损伤模型, 观察 $A\beta_{1-42}$ 诱导的人脑微血管内皮细胞损伤后 HIF-1 α 在介导 VEGF 增生中的表达及通心络的干预作用, 以探索 AD 的发病机制及其药物的治疗作用。

1 材料

1.1 材料 通心络 (Tongxinluo, TXL) 原粉 (由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、冰片等组成): 石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: 070901。

1.2 主要试剂 $A\beta_{1-42}$ (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 (美国 ATCC 公司); HIF-1 α 、VEGF 抗体 (Santa Cruz Biotechnology); VEGF ELISA 试剂盒 (美国 ADL 公司)。

2 方法

2.1 人脑微血管内皮细胞 复苏人脑微血管内皮细胞株, 将其用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基转移至细胞培养瓶中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 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。

2.2 淀粉样蛋白的老化处理 将 1 mg $A\beta_{1-42}$ 溶解在 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 7 d, 使其成为凝聚状态, 然后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

2.3 $A\beta_{1-42}$ 损伤人脑微血管内皮细胞的量效关系 待人脑微血管内皮细胞生长状态良好时, 取对数生长长期的人脑微血管内皮细胞以 $10^8 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 密度接种于 96 孔板, 加入含不同浓度 $A\beta_{1-42}$ 的 DMEM 培养液, 100 μl /孔。第 1 组细胞的处理: 取对数生长长期的人脑微血管内皮细胞加入 $A\beta_{1-42}$, 终浓度依次为 5、10、20、40、80、160 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 24 h, 以不加

收稿日期: 2009-08-26, 修回日期: 2009-10-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (No 2005CB 523301)

作者简介: 张志慧 (1975 -), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 神经免疫性疾病、老年性疾病的基础与临床, E-mail: zhzhui358@sohu.com;

吴以岭 (1949 -) 男, 硕士, 教授, 主任医师, 研究方向: 中医络病及心脑血管、糖尿病基础与临床, 通讯作者, Tel: 0311-85901553, Fax: 0311-85901088

$A\beta_{1-42}$ 的细胞为阴性对照。第2组细胞的处理:取对数生长期的人脑微血管内皮细胞更换培养基并加入 $A\beta_{1-42}$ (终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),于培养6、12、24、36、48 h中止培养,以不加 $A\beta_{1-42}$ 的细胞为阴性对照。MTT检测两组细胞的活性,根据实验结果(Fig 1、2)终浓度为 $20 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用24 h适合建立人脑微血管内皮细胞损伤模型。

2.4 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 $10^8 \text{cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 密度接种于96孔板,实验分为①正常对照组:用10% FBS的DMEM培养基培养细胞28 h后进行检测;②模型组:细胞培养后,加入终浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $A\beta_{1-42}$ 作用24 h诱导细胞损伤后换无血清DMEM培养基作用4 h;③通心络组:细胞培养 $A\beta_{1-42}$ 损伤前,分别加入终浓度为100、200、400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的通心络作用4 h加入 $A\beta_{1-42}$ 继续培养24 h。

2.5 ELISA 检测 VEGF 的表达 实验结束后,收集各组细胞培养液,离心取上清液,ELISA检测VEGF的表达(具体步骤按照酶免试剂盒说明书操作)。

2.6 Western blot 检测各组内皮细胞中 VEGF、HIF-1 α 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(100 V 3 h)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1 h,加入1:1 000稀释的VEGF特异性人抗多克隆抗体、HIF-1 α 特异性人抗多克隆抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 密封过夜。次日,TBST振荡洗膜后,应用荧光光源二抗孵育1.5 h,TBST振荡洗膜后,再经TBS洗膜1次,上odyssey扫膜仪上成像分析,判断HIF-1 α 与VEGF蛋白的诱导情况。

2.7 统计学处理 所有数据均采用SPSS 16.0软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析One-way ANOVA程序进行分析处理。

3 结果

3.1 $A\beta_{1-42}$ 损伤人脑微血管内皮细胞的药物浓度和时间 结果显示, $A\beta_{1-42}$ 浓度中10、20、40、80 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 均可损伤人脑微血管内皮细胞,造成其活力下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以20 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为著; $A\beta_{1-42}$ 损伤的时间中,从6 h开始到72 h至,均对人脑微血管内皮细胞具有不同程度损伤($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以24 h最为严重,见Fig 1、2。

3.2 对人脑微血管内皮细胞上清液中进行 VEGF 的检测 对ELISA测得的浓度值进行t检验分析,结果表明模型组与正常组VEGF分泌差异有显著性

($P < 0.01$),通心络3个剂量组均可增强人脑微血管内皮细胞VEGF的分泌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见Tab 1。

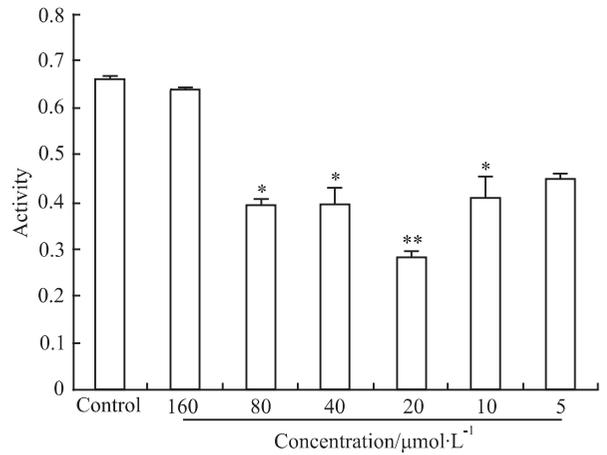


Fig 1 The effect on activity of human brain microvascular endothelial cells damaged by different concentrations of $A\beta_{1-42}$

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

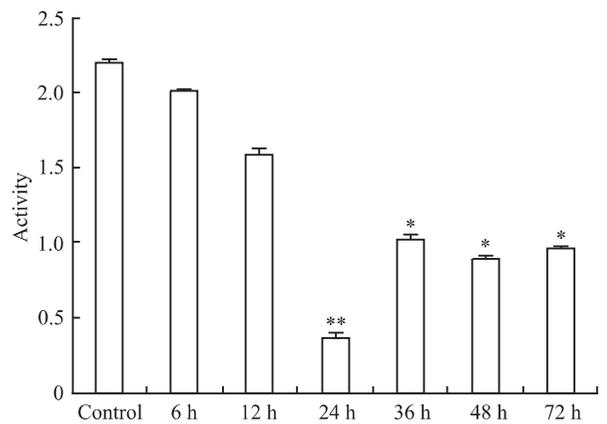


Fig 2 The effect on activity of human brain microvascular endothelial cells damaged by $A\beta_{1-42}$ on different time

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

Tab 1 The effect of Tongxinluo on VEGF of Human brain microvascular endothelial cells damaged by $A\beta_{1-42}$ ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose	VEGF/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
Normal	-	395.02 \pm 5.98
Model	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	341.00 \pm 2.88**
TXL	400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	387.90 \pm 1.33##
	200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	381.40 \pm 6.36##
	100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	376.44 \pm 6.62#

** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

3.3 对人脑微血管内皮细胞提取蛋白进行 VEGF 的 Western blot 检测 对Western blot检测的灰度值进行t检验分析,结果表明模型组与正常组VEGF蛋白表达差异有显著性($P < 0.01$),TXL 3个剂量

组均可增强人脑微血管内皮细胞中 VEGF 蛋白的表达 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) ,见 Fig 3。

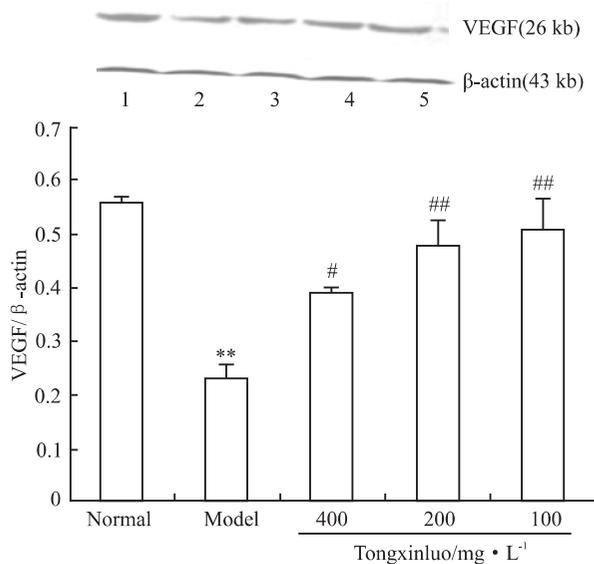


Fig 3 Western blot analysis of VEGF protein in microvascular endothelial cells of 5 groups

1: Normal control group; 2: Model group; 3: Tongxinluo high-dose group; 4: Tongxinluo middle dose group; 5: Tongxinluo low-dose group. ** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

3.4 对人脑微血管内皮细胞提取蛋白进行 HIF-1 α 的 Western blot 检测 对 Western blot 检测的灰度值进行 t 检验分析,结果表明模型组与正常组 HIF-1 α 蛋白表达有差异 ($P < 0.05$) ,TXL 3 个剂量组均可增强人脑微血管内皮细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达 ($P < 0.01$) ,见 Fig 4。

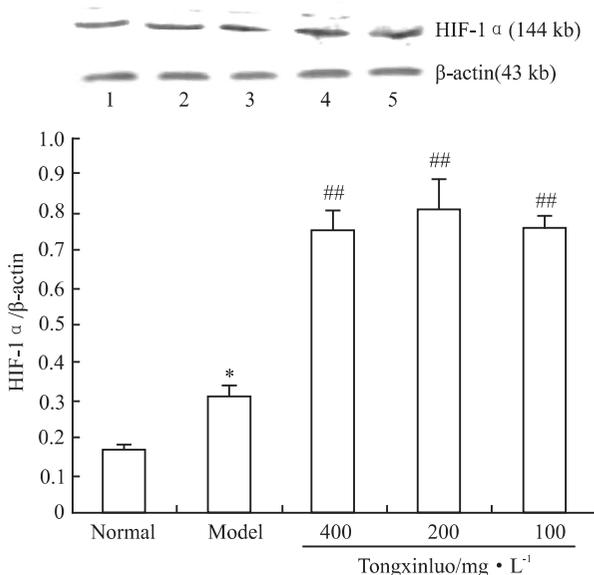


Fig 4 Western blot analysis of HIF-1 α protein in microvascular endothelial cells of 5 groups

Note see Fig 3. * $P < 0.05$ vs normal; ## $P < 0.01$ vs model

4 讨论

AD 的发病机制尚未完全明了,临床治疗所使用的胆碱能增强剂、抗氧化剂、神经细胞代谢增强剂、脑血液循环促进剂等可在一定程度上改善临床症状,但能否阻止或延缓本病的发展尚无定论,尽管 AD 的研究早已成为医学界研究的热点,但迄今尚无特效药物产生。通心络是治疗心脑血管的复方制剂,临床治疗 AD 40 例,总有效率达 98.3%^[13]。并可对抗 $A\beta_{23-35}$ 的神经毒性作用,具体作用机制还不清楚^[14]。其对缺氧引起的血管损伤具有很好的保护作用^[15]。明显抑制缺氧引起的血管内皮细胞 Caspase-3 活性增高并减少缺氧所诱导的动脉内皮细胞凋亡^[16]。能明显保护大鼠脑缺血后皮质微血管的完整性^[17]。但其对 AD 中脑微血管及其内皮细胞的研究还未见报道。

实验中我们发现 $A\beta_{1-42}$ 片断诱导体外培养的人脑微血管内皮细胞损伤后,模型组内皮细胞中 VEGF 的蛋白表达减少 ($P < 0.01$) ,HIF-1 α 蛋白表达增加 ($P < 0.05$) ;而通心络干预过的脑微血管内皮中 VEGF 的分泌和蛋白表达增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) ,HIF-1 α 蛋白表达更加明显 ($P < 0.01$) 。

实验中模型组的脑微血管内皮细胞分泌的 VEGF 及其蛋白的表达比正常对照组明显减少,说明 $A\beta$ 对 VEGF 及其血管新生具有抑制作用,这和前面文献一致,而 TXL 3 个剂量组 VEGF 的分泌及其蛋白表达较模型组有较大改善,表明 TXL 不仅能有效减少 $A\beta$ 对脑微血管内皮细胞的损伤,还能在蛋白水平上促进脑微血管内皮细胞 VEGF 表达,增加 VEGF 分泌,由此起到保护脑微血管内皮细胞结构和功能的完整性作用。而模型组内皮细胞中 HIF-1 α 的表达,说明缺氧可能参与了 $A\beta$ 损伤内皮细胞的过程,而预先通过通心络干预过的内皮细胞 HIF-1 α 升高,说明通心络在一定意义上提高了人脑微血管耐缺氧能力, HIF-1 α 对于 VEGF 上调作用,可能是通过 HIF-1 α 的通路促进 VEGF 的表达,从而保护 AD 中脑微血管内皮细胞。模型组 HIF-1 α 增加而 VEGF 及其蛋白的表达减少,可能和 $A\beta$ 对内皮细胞的直接损伤有关。通心络对 $A\beta_{1-42}$ 损伤的人脑微血管内皮细胞中 VEGF 及其蛋白的表达可能会造成 AD 中脑微血管的新生,将有助于中枢神经营养的供给,有效减少脑神经元的退行性改变,这也许是通心络治疗 AD 的其中一个机制,同时其对 AD 微血管新生的作用也是探讨 AD 药物治疗的又一个方向。

参考文献:

- [1] Scarpini E, Scheltens P, Feldman H, et al. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives [J]. *Lancet Neurol*, 2003 **2**(9):539-47.
- [2] Gitter B D, Boggs L N, May P C, et al. Regulation of cytokine secretion and amyloid precursor protein processing by proinflammatory amyloid beta (A beta) [J]. *Ann NY Acad Sci* 2000 **91**:154-64.
- [3] 刘丽萍. 阿尔茨海默病病理学研究进展 [J]. 中国临床康复, 2003 **7**(5): 785-6.
- [3] Liu L P. The progress in pathology Alzheimer disease [J]. *Chin Clin Rehab* 2003 **7**(5):785-6.
- [4] 刘辉, 陈俊抛, 梁丰, 等. NOS及NO在介导Aβ神经毒性和阿尔茨海默病发病机制中的作用 [J]. 中国临床康复, 2002, **6**(1): 44-5.
- [4] Liu H, Chen J P, Liang F, et al. The effect of NOS and NO on the Pathogenesis of Alzheimer's disease by Aβ [J]. *Chin Clin Rehab*, 2002 **6**(1):44-5.
- [5] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy [J]. *Physiol Rev* 2001 **81**:741-66.
- [6] Yankner B A. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Neuron*, 1996 **16**:921-32.
- [7] Greijer A E, vander Wall E. The role of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis [J]. *J Clin Pathol* 2004 **57**(10):1009-14.
- [8] 高和, 宁波, 王文清, 等. 低压缺氧时大鼠一氧化氮、内皮素、肾上腺髓质素变化的观察 [J]. 心脏杂志, 2003, **15**(5):404-6.
- [8] Gao H, Ning B, Wang W Q, et al. the Observation of the rat's nitric oxide, endothelin, adrenomedullin when hypoxia [J]. *Heart J*, 2003 **15**(5):404-6.
- [9] de la T J C, Stefano G B. Evidence that Alzheimer's disease is microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide [J]. *Brain Res Brain Res Rev* 2000 **34**:119-36.
- [10] Miklossy J. Cerebral hypoperfusion induces cortical watershed microinfarcts which may further aggravate cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Neurol Res* 2003 **25**:605-10.
- [11] Roher A E, Esh C, Kokjohn T A, et al. Circle of Willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 **23**:2055-62.
- [12] Grammas P, Samany P G, Thirumangalakudi L. Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: Implications for disease pathogenesis [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006 **9**:51-8.
- [13] 张原莉, 刘颖芳, 李秀敏. 通心络治疗老年性痴呆 40 例观察 [J]. 山东医药, 2002 **42**(31):11.
- [13] Zhang Y L, Liu Y F, Li X M. The observation of the treatment of 40 cases of senile dementia by Tongxinluo [J]. *Shandong Pharm*, 2002 **42**(31):11.
- [14] 冯凯, 王晓明, 孟晓梅, 等. 通心络对体外培养 SH-SY5Y 细胞 Aβ₂₅₋₃₅ 毒性损伤的保护作用 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007 **14**(2):90-2.
- [14] Feng K, Wang X M, Meng X M, et al. The protection of Tongxinluo on SH-SY5Y cell Damaged by Aβ₂₅₋₃₅ [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol* 2007 **14**(2):90-2.
- [15] 吴士珍, 吴相锋, 袁国强. 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):131-3.
- [15] Wu S Z, Wu X F, Yuan G Q. The changes of endothelial function in the rat when hypoxia and the intervention of Tongxinluo ultrafine [J]. *Diff Dis J* 2009 **8**(3):131-3.
- [16] 曾和松, 刘正湘, 马业新. 通心络抑制缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004 **10**(3):27-30.
- [16] Zeng H S, Liu Z X, Ma Y X. The study of Tongxinluo which can inhibit endothelial cell apoptosis induced by hypoxia [J]. *Chin J Exp Prescr* 2004 **10**(3):27-30.
- [17] 吴以岭, 吴正国, 袁国强. 通心络对实验性大鼠中动脉闭塞大鼠脑缺血微血管的保护作用 [J]. 中华神经科杂志, 2007 **40**(1):54-8.
- [17] Wu Y L, Wu Z G, Yuan G Q. The Tongxinluo's protection of brain microvascular protective on experimental middle cerebral artery occlusion [J]. *Chin J Neurol* 2007 **40**(1):54-8.

Regulating effect of Tongxinluo on HIF-1 α , VEGF generated by the human brain microvascular endothelial cells induced by β -amyloid1-42

ZHANG Zhi-hui¹, WU Yi-ling^{1,2,3}

(1. The Affiliated Yiling Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China;

2. The Yiling Medicine Research Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050035, China;

3. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (cardio-cerebral vascular network disease), Shijiazhuang 050035, China)

Abstract: Aim To study the regulating effect of Tongxinluo on HIF-1 α , VEGF that Generated by the Human brain microvascular endothelial cells induced by β -amyloid 1-42. **Methods** Human brain microvascular endothelial cells were pre-incubated for 4h by Tongxinluo, then injured by β -amyloid 1-42. VEGF protein and HIF-1 α were detected by Western blot. **Result** In the A β treated Human brain microvascular endothelial cells, viable cells decreased. The expression

of VEGF was Reduced, and HIF-1 α elevated. After the cells were treated with Tongxinluo, all the above indexes were improved. **Conclusion** Tongxinluo can enhance the VEGF protein expressions by the HIF-1 α and protect the Human brain microvascular endothelial cells.

Key words: human brain microvascular endothelial cells; Amyloid β protein; VEGF; HIF-1 α ; Tongxinluo