

• 实验研究 •

三七总皂苷对拟缺血损伤脑微血管内皮细胞转化生长因子- β 、 血管内皮生长因子表达的影响*

臧妍妍¹, 李卫红^{1△}, 郭晓谨², 万亮琴¹, 李芳赫¹, 张 赛¹,
马家宝¹, 姜昭妍¹, 胡艳红¹, 张 凡¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 通州中西医结合医院, 北京 101100)

摘要: **目的** 观察三七总皂苷对拟缺血损伤脑微血管内皮细胞的凋亡和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响, 以期揭示三七总皂苷发挥脑保护作用的分子机制。 **方法** 原代培养大鼠脑微血管内皮细胞, 采用氧糖剥夺法制备拟缺血损伤模型, 分为正常组、模型组、三七总皂苷组, 流式细胞术检测细胞凋亡情况、酶联免疫吸附法检测细胞 TGF- β 1, VEGF-B 水平、Western blotting 法检测细胞 TGF- β 蛋白的表达水平。 **结果** 模型组细胞凋亡率与正常组相比显著性升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 三七总皂苷组细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.01$); 与正常组相比, 模型组细胞上清液中 TGF- β 1 含量明显增多 ($P < 0.05$); 与正常组相比, 模型组细胞上清液中 VEGF-B 含量显著性增多 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 三七总皂苷组中细胞上清液中 VEGF-B 含量明显增多 ($P > 0.05$); 正常组内皮细胞 TGF- β 表达量较少, 造模后, TGF- β 表达显著增加 ($P < 0.05$), 三七总皂苷能够下调 TGF- β 蛋白的表达。 **结论** 三七总皂苷可能通过抑制内皮细胞的凋亡, 保持内皮细胞的完整性, 上调 VEGF 表达, 促进缺氧条件下血管的新生, 这可能是三七总皂苷脑保护的机制之一。

关键词: 三七总皂苷; 脑微血管内皮细胞; 转化生长因子 β 1; 血管内皮生长因子; 缺血损伤; 细胞凋亡; 血管新生

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2016)02-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.02.001

缺血性脑卒中梗死灶周围新生血管的密度与缺血性卒中患者的存活率直接相关, 脑血管新生可能为神经元重构提供关键的神经血管底物^[1]。其中转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 介导的信号在血管生成过程中起关键作用, 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 能够在活体趋化血管内皮细胞或使内皮细胞分化, 刺激血管发生^[2]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是内皮细胞的强力丝裂剂, 具有强大的促进新血管生成作用^[3]。三七总皂苷 (panax notoginseng saponins, PNS) 是五加科人参属植物三七的主要有效活性部位, 广泛应用于缺血性脑血管疾病的治疗, 然而, 目前对三七总皂苷脑保护作用的物质基础研究开展较少。本实验在前期研究基础上, 采用大鼠原代培养的脑

微血管内皮细胞 (RBMEC) 模型, 观察了三七总皂苷对拟缺血损伤脑微血管内皮细胞的凋亡及 TGF- β 、VEGF 表达的影响, 以期揭示三七总皂苷发挥脑保护作用的分子机制。

1 材料

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 三羟甲基氨基甲烷 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); SDS 十二烷基硫酸钠、三羟甲基氨基酸甲烷 (GenView 分装); 甘氨酸 (Sigma 分装); 高分子量预染蛋白 Marker (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); ECL 化学发光试剂盒 (PIERCE); 通用定影粉 (天津市世纪奥博商贸有限公司); 大鼠转化生长因子 β -1 (TGF-

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81273885); 北京中医药大学“航海中医药”协同创新项目 (522/0100604299)

收稿日期: 2016-03-01

作者简介: 臧妍妍 (1986-), 女, 河南周口人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药复方的配伍机制。

△通信作者: 李卫红, E-mail: liweihong.403@163.com

β1)酶联免疫试剂盒(武汉华美);大鼠血管内皮细胞生长因子-B(VEGF-B)酶联免疫试剂盒(武汉华美);三七总皂苷(中国食品药品检验研究所)。

1.2 仪器

FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Beton-Dick-inSon 公司);倒置相差显微镜(日本 Nikon);5810R 低温水平离心机(德国 Eppendorf);ZS-3 板式酶标仪(北京市新风机电技术公司);P3000 蛋白电泳仪(Bio-Rad 公司);蛋白转印系统(Bio-Rad 公司);TS-100 Orbital Shaker(其林贝尔公司);TDK-2 水平摇床(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);Tanon-4500 数码凝胶图像处理系统(北京原平皓生物技术有限公司);Micro ONE 掌上离心机(TOMY 公司)。

2 方法

2.1 大鼠脑微血管内皮细胞的培养

采用实验室已建立的脑微血管内皮细胞培养方法^[4],取出大鼠脑组织放入 PBS 液的培养皿中,剪碎,用 PBS 液漂洗 3 次,再加入胰蛋白酶 37℃消化 25min,离心 2 次,沉淀用完全培养基悬浮,接种培养瓶中,静置培养,细胞铺满培养瓶,可进行传代培养。本实验使用第三代内皮细胞。

2.2 拟缺血损伤模型的制备

采用本实验室已建立的氧糖剥夺模型^[5],当细胞传至第三代时,采用无糖的 Kreb's 液置换原培养基,将其放入低氧培养箱中进行培养,37℃培养 6h,培养箱中的气体组成为 94% N₂、5% CO₂、1% O₂,造成细胞缺氧损伤的模型。

2.3 实验分组与处理

将第三代脑微血管内皮细胞接种于 96 孔板,置于培养箱中继续培养,培养 48h 后,细胞呈 80% 汇合状态,将细胞随机分为 3 组:正常组、模型组、三七总皂苷组。三七总皂苷组按 22μg/mL 浓度在造模前 3h 及造模过程中给药,实验结束后进行以下指标检测。

2.4 流式细胞术检测

用 PBS 洗涤各组细胞 2 次后,每组加入 DAPI、PITC-Anmexin V 抗体和 100μL 结合缓冲液,混合均匀后,置于暗室中染色 30min,每组加入 100μL 缓冲液。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

2.5 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞 TGF-β1、VEGF-B 水平

收集细胞培养上清液于无菌试管中 4℃ 2 500r/

min 离心 15min,收集上清备用,于 λ=450nm 条件下酶标仪测定吸光度,具体步骤按照酶免试剂盒说明书操作。

2.6 采用 Western blotting 法检测各组细胞 TGF-β 蛋白的表达水平

各组细胞内加入细胞裂解液,取上清,转移至新的离心管中至于冰上,即为提取的蛋白,弃沉淀。采用 BCA 法检测蛋白定量。每个样品取相同总蛋白含量(50~100μg),加入相同体积的 5×loading buffer 上样缓冲液;混匀后,沸水浴煮 10min 后进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),用湿转法将凝胶中蛋白转至聚二氟乙烯(polyvinylidene fluoreide,PVDF)膜上,转膜结束后,小心取出凝胶和膜,将膜放入盛有封闭液(5%的脱脂奶粉)的容器中,室温摇床封闭 1h。加入 TGF-β1 抗体,4℃孵育过夜,用 5%的脱脂奶粉按二抗说明书比例稀释二抗(通常 1:4 000~1:20 000),37℃孵育 2h,ECL 法显影,将胶片进行扫描,用 Quantity One 图像分析软件分析目标条带的光密度值。

2.7 统计方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,各组数据在满足正态性分布和方差齐性时,组间采用单因素方差分析(ANOVA),当 $P < 0.05$ 时表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 三七总皂苷对细胞凋亡的影响

与正常组比,模型组细胞凋亡率显著性升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,三七总皂苷组细胞凋亡率明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.01$),详见表 1。

表 1 各组脑微血管内皮细胞凋亡情况($\bar{x} \pm s, n=4, \%$)

组别	细胞凋亡
正常组	8.06±3.58
模型组	32.72±9.58**
三七总皂苷组	19.01±4.56***

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,*** $P < 0.01$

3.2 三七总皂苷对拟缺血脑微血管内皮细胞上清液中 TGF-β1、VEGF-B 含量的影响

与正常组相比,模型组细胞上清液中 TGF-β1 含量明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,三七总皂苷组中细胞上清液中 TGF-β1

含量呈降低的趋势($P>0.05$),详见表2。

表2 各组脑微血管内皮细胞上清液中 TGF- β 1 的含量

组别	TGF- β 1/(pg/mL)
正常组	54.30 $\pm$ 9.06
模型组	73.75 $\pm$ 12.51*
三七总皂苷组	68.48 $\pm$ 15.47

注:与正常组比较,* $P<0.05$

与正常组相比,模型组细胞上清液中 VEGF-B 含量显著性增多,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,三七总皂苷组中细胞上清液中 VEGF-B 含量明显增多($P>0.05$),详见表3。

表3 各组脑微血管内皮细胞上清液中 VEGF-B 的含量

组别	VEGF-B/(pg/mL)
正常组	129.34 $\pm$ 19.12
模型组	227.00 $\pm$ 22.04**
三七总皂苷组	252.21 $\pm$ 11.19#

注:与正常组比较,** $P<0.01$,与模型组比较,# $P<0.05$

3.3 三七总皂苷对拟缺血脑微血管内皮细胞 TGF- β 蛋白表达的影响

图1显示,Western blotting 检测 TGF- β 蛋白表达情况,正常组内皮细胞 TGF- β 表达量较少,缺血损伤后,TGF- β 表达显著增加($P<0.05$),三七总皂苷能够下调 TGF- β 蛋白的表达。定量分析显示,与

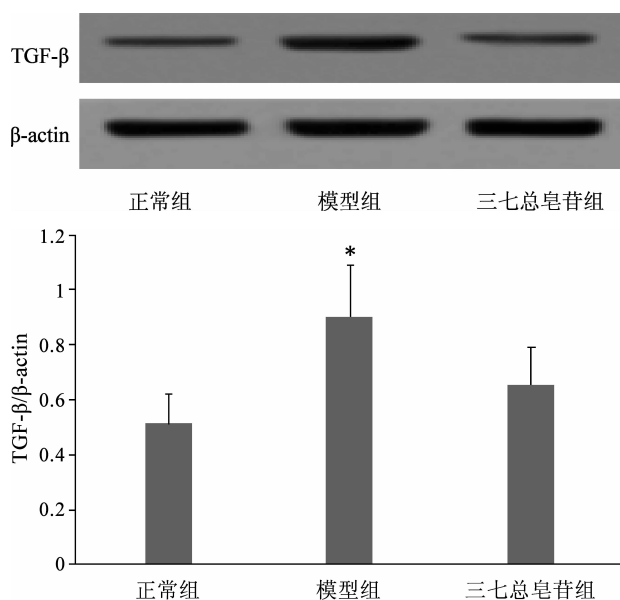


图1 三七总皂苷对拟缺血脑微血管内皮细胞 TGF- β 蛋白表达的影响

注:与正常组比较,* $P<0.05$

正常组相比,模型组灰度值显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,三七总皂苷组灰度值有下降的趋势($P>0.05$)。

4 讨论

脑微血管内皮细胞是参与构成血脑屏障保护脑组织的主要成分,脑出血后会导致脑血管内皮细胞受损,血管舒缩物质释放发生紊乱,进一步导致血管痉挛,从而加重脑出血所致的缺氧损伤。因此,建立体外脑微血管内皮细胞模型,研究血脑屏障的结构、功能特性和损伤机制,对进一步研究由于屏障功能破坏造成的脑损伤疾病和进行药物治疗具有重要的意义^[6]。

TGF- β 1 作为一种多功能的细胞因子,可通过细胞表面的受体信号传导途径控制细胞的增殖、分化、凋亡和免疫功能^[7]。在生理情况下大多数的 TGF- β 1 是以潜在活性的形式存在,血管内皮细胞在体外单独培养时,分泌较少^[8]。本次实验结果显示,在缺氧低糖条件下,TGF- β 1 含量水平增加,表明其可能抑制内皮细胞生长并诱导其凋亡。

血管内皮生长因子 B (vascular endothelial growth factor-B, VEGF-B) 是 VEGF 家族中的重要成员,研究表明它在促进心血管内皮增殖和血管新生中具有重要意义^[9]。Sun 等^[10]研究发现,VEGF-B 具有刺激神经元新生并促进轴突生长的作用。本次实验结果显示,在缺氧低糖条件下,VEGF-B 含量水平显著性增多。低氧是诱导 VEGF 及其受体表达的主要因素,结果表明低氧可能严重刺激了血管内皮细胞中 VEGF-B^[11]。三七总皂苷组与模型组比较,VEGF-B 的表达有明显提高,说明三七总皂苷在保护脑缺血损伤细胞可能与增加 VEGF-B 的分泌有关,提示三七总皂苷可能通过激活 VEGF-B 使内皮细胞增生并诱导新血管生成,新生血管可增加脑缺血组织供血量及供氧量,从而减轻脑组织的损伤。

TGF- β 是一种活性很强的血管生成调节因子,具有激活缺血半暗带内皮细胞,促进微血管再生的功能^[12]。研究表明^[13],TGF- β 可通过诱导血管内皮生长因子受体-1(BEGFR-1)在内皮细胞的表达来促进微血管生成、恢复缺血区供血。本次研究结果显示,脑缺血后 TGF- β 蛋白的表达明显增多,这与国内动物实验研究结果基本一致^[12]。与正常组相比,三七总皂苷组 TGF- β 蛋白的表达未见明显差异,提示三七总皂苷可抑制脑微血管内皮细胞分泌 TGF- β 蛋白的表达。据此,我们推断三七总皂苷可能是抑

制缺血损伤 TGF- β 1 诱发脑微血管内皮细胞的凋亡,并通过下调 TGF- β 蛋白的表达从而保护缺氧的内皮细胞,从而促进在缺氧条件下血管的新生,但其具体机制仍有待进一步的研究。

综上所述,三七总皂苷对缺氧的脑微血管内皮细胞可以起到保护的作用,减少 TGF- β 1 的分泌,增加 VEGF-B 的分泌,抑制 TGF- β 蛋白的表达,实验结果表明三七总皂苷可能通过抑制内皮细胞的凋亡,保持内皮细胞的完整性,促进缺氧条件下血管的新生,这可能是三七总皂苷脑保护的机制之一。

参考文献:

- [1] Arai K, Jin G, Navaratna D, et al. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke [J]. FEBS J, 2009, 276(17): 4644-4652.
- [2] 常坤鹏, 丁小灵. 缺血性脑卒中新生血管相关因子的研究 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2015, 23(4): 312-316.
- [3] Otrick ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review [J]. Blood Cells Mol Dis, 2007, 38(3): 258-268.
- [4] 李卫红, 李澎涛, 华茜, 等. 不同内皮细胞条件培养液对皮层神经元线粒体功能的影响及通络救脑注射液的保护作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(2): 131-134.
- [5] 朱元, 李澎涛, 李卫红, 等. 不同状态的大鼠星形胶质细胞条件培养液对脑微血管内皮细胞血脑屏障特征性酶的影响 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2012, 14(2): 1393-1398.
- [6] Kim KS. Microbial translocation of the blood - brain barrier [J]. Int J Parasitol, 2006, 36(5): 607-614.
- [7] 万赛英, 顾卫, 谭锋. 转化生长因子 β 1 与脑缺血 [J]. 国外医学: 脑血管疾病分册, 2005, 13(8): 591-595.
- [8] 万赛英, 黎杏群, 智屹惠, 等. 脑微血管内皮细胞缺氧模型转化生长因子 β 1 表达与脑溢血的干预 [J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(46): 8625-8629.
- [9] 雍海溟, 宋强, 张水华. 血管内皮生长因子 B 生物学功能的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2012, 25(7): 774-777.
- [10] Sun Y, Jin K, Childs JT, et al. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration [J]. Dev Biol, 2006, 289(2): 329-335.
- [11] 徐双云, 徐家丽, 沈怀云, 等. 缺氧缺血性脑病新生儿血浆中血管内皮生长因子动态变化的临床意义 [J]. 蚌埠医学院学报, 2009, 34(8): 669-671.
- [12] 徐冉, 段淑荣, 王慧慧, 等. 人脑梗死后转化生长因子- β 及血管内皮生长因子的表达及神经保护作用研究 [J]. 中国全科医学, 2010, 13(23): 2560-2563.
- [13] Shih SC, Ju M, Liu N, et al. Transforming growth factor β 1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(26): 15859-15864.

(编辑: 徐建平)

Effects of *Panax Notoginseng* Saponins on the Expression of TGF- β and VEGF from Cultured Brain Microvascular Endothelial Cells on the Hypoxia Induced Damage in Vitro

ZANG Yanyan¹, LI Weihong¹, GUO Xiaojin², WAN Liangqin¹, LI Fanghe¹, ZHANG Sai¹,
MA Jiabao¹, JIANG Zhaoyan¹, HU Yanhong¹, ZHANG Fan¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Tongzhou Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing 101100, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effects of the *panax notoginseng* saponins (PNS) on brain vascular endothelial cells apoptosis and expression of TGF- β , VEGF, in order to reveal the molecular mechanism of PNS on brain protection. **Methods** The model of hypoxia induced damage in cultured brain vascular endothelial cells was set up in vitro and divided into normal group, model group and PNS group. Flow cytometry was adopted to detect cell apoptosis, ELISA was used to determine the protein level of TGF- β 1, VEGF-B, the expression of TGF- β was measured by western blot. **Results** Compared with the normal group, the rate of apoptosis in model group increased significantly ($P < 0.01$); Compared with the model group, the rate of apoptosis in PNS group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the level of TGF- β 1 increased significantly in model group ($P < 0.05$). In model group the level of VEGF-B increased significantly ($P < 0.01$) compared with the normal group; compared with the model group, the level of VEGF-B in PNS group increased ($P > 0.05$); the expression of TGF- β is less in normal group, expression of TGF- β in model group increased ($P < 0.05$), compared with model group, the expression of TGF- β is decreased. **Conclusion** PNS can decrease the rate of brain vascular endothelial cells apoptosis, and impaired the damage of cells, beneficial to angiogenesis, so as to protect the neurons in hypoxia injury.

KEY WORDS: *panax notoginseng* saponins (PNS); brain microvascular endothelial cells; transforming growth factor- β (TGF- β); vascular endothelial growth factor (VEGF); ischemic injury; apoptosis; angiogenesis