



黄芩素对 LPS 诱导 RIMECs 损伤的作用效果

高 洋¹, 穆 祥²

(1. 北京市怀柔区农业局, 北京 101400; 2. 北京农学院, 北京 102206)

摘要:为探究黄芩素的抗内毒素作用, 利用 MTT 法, 观察不同浓度黄芩素对细菌脂多糖(LPS)致肠黏膜微血管内皮细胞(RIMECs)损伤的作用效果。结果表明: LPS 对 RIMECs 增殖的抑制作用显著, 而黄芩素对 LPS 诱导的 RIMECs 损伤均均有一定的预防和治疗作用, 细胞增殖率升高, 且呈剂量依赖关系。

关键词:肠黏膜微血管内皮细胞; 细菌脂多糖; 黄芩素

细菌内毒素(Endotoxin, ET)是大多数革兰氏阴性菌释放的致病因子, 其毒力主要成分是脂多糖(LPS)。内毒素进入动物体内, 能引起多种病理过程, 甚至导致动物体死亡^[1]。由于小肠粘膜是毒素的主要吸收部位, 所以一般认为, 内毒素主要作用于肠黏膜上皮细胞, 但是肠黏膜微血管内皮细胞(RIMECs)也是内毒素的靶细胞^[2]。血管内皮细胞(Vascular Endothelial Cells, VECs)是裱衬在整个心血管系统内表面的单层扁平上皮细胞, 是血管与血液之间的分界细胞, 是形成心血管封闭管道系统的形态基础, 它们直接参与组织细胞的物质、能量、信息的传递, 不仅构成了微血管通透性的主要物理屏障, 保证血管内外的正常的物质交换, 而且是一种多功能的分泌细胞, 具有合成、分泌和降解生物活性物质的功能, 在维持机体正常的生理学及免疫功能、内环境的稳定及介导疾病的发生、发展和转归方面发挥重要作用^[3]。所以, 当内毒素直接或间接的损伤微血管内皮细胞时, 可导致微循环功能的障碍, 这在多器官功能障碍综合征(MODS)等病理过程中起着重要的作用。本实验室前期研究证明, LPS 在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞毒性达到 50% 以上, 可造成 RIMECs 损伤^[2]。

黄芩, 别名山茶根、土金茶根, 是唇形科黄芩属多年生草本植物, 被广泛用于多种急性感染性疾病, 有良好的解热、抗炎及一定的抗细菌抗病毒的作用^[4]。研究表明, 黄芩具有很好的抗内毒素

的作用^[5]。黄芩素是黄芩的主要成分之一。兽医学(中医药)北京市重点实验室前期研究证明黄芩素对微血管内皮细胞的增殖也有促进作用^[2]。本次试验的目的是观察不同浓度黄芩素对 LPS 致 RIMECs 损伤的作用效果, 探究黄芩素的抗内毒素作用, 由于 WST-1, CCK-8 等方法都需要将检测试剂加入受试样品中, 而中药成分易与 WST-1 或 CCK-8 等检测试剂结合导致其结构被破坏, 以致不能准确检测出受试样品对 RIMECs 的作用, 因此本试验选择 MTT 比色法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及试剂 黄芩素(中国食品药品检定研究院, 111595-201306)、LPS (Sigma 公司, L2880)、DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司, H2387)、优质胎牛血清 FBS (Hyclone 公司, SH30084.03E)、L-谷氨酰胺 (Sigma 公司, 097K0057)、注射用青霉素钠(华北制药有限公司, E0409136)注射用青霉素(华北制药有限公司, N040210)、D-Hank's 干粉 (Gibco 公司, 1136551)胰蛋白酶(Gibco 公司, 2750018)、MTT 粉末(Sigma 公司, 5655-500MG)、二甲基亚砜(美国 Sigma, D-5879)。

1.1.2 细胞及仪器 大鼠肠黏膜微血管内皮细胞, 由兽医学(中医药)北京市重点实验室纯化培养。电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司, DHG-9145A)、超净工作台(哈尔滨东联电子技术开发有限公司, DL-CF-IND)、电子分析天平(梅特勒—托利多仪器有限公司, AL104)可调式微量移液器(德国 Eppendorf 公司, 4910)、电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司, DK-8D)、恒温

收稿日期: 2018-03-26

第一作者简介: 高洋(1985-), 男, 硕士, 兽医师, 从事中兽医研究。E-mail: 542312839@qq.com。

通讯作者: 穆祥(1960-), 男, 硕士, 教授, 从事中兽医及动物疫病防控研究。E-mail: 542312839@qq.com。

干燥箱(上海一恒科技有限公司,DK-8D)、CO₂ 培养箱(日本三洋公司,MCO-17AC)、奥林巴斯研究显微镜(OLYMPUS 公司,IX71)、低温冰箱(海尔家用电器公司,MPR-414F)细胞培养板(Costar 公司)、细胞计数板(浙江玉环求精医用仪器,XB-K-25)、细胞计数器(北京科昊泽生物制品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制 DMEM 基础培养基:取 DMEM 干粉一袋,称取 NaHCO₃ 3.7 g,加入 1.0 L 超纯水中,完全溶解后,用 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaOH 和 1.0 mol·L⁻¹ 的 HCL 将 pH 调至 7.2~7.4,定容至 1.0 L,经过滤除菌,分装,4℃ 保存备用。

DMEM 完全培养基:在 85 mL DMEM 基础培养液中加入 15 mL FBS、1 mL L-谷氨酰胺以及 1 mL 双抗,混匀后,经 0.22 μm 滤器过滤后,4℃ 保存备用,需在 7 d 内用完。

MTT 工作液:取 50 mg 的 MTT 粉末,加入到 10.0 mL 的 PBS 缓冲液中,摇晃均匀,0.22 μm 滤器过滤除菌,-20℃ 避光保存。

黄芩素溶液的配制:精密称取黄芩素标准品 2 mg,加入 20 mL 的维持培养基,配制成 100 μg·mL⁻¹ 的黄芩素溶液,取适当体积维持培养基配成 100、10、1 μg·mL⁻¹ 及 100、10、1 ng·mL⁻¹ 的梯度溶液,0.22 μm 滤器过滤除菌,配制好之后于 4℃ 保存备用。

LPS 溶液的配制:精密称取 LPS 2 mg,加入 20 mL 的维持培养基,配制成 100 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液,取适当体积维持培养基配成 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液,0.22 μm 滤器过滤除菌,配制好之后于 4℃ 保存备用。

1.2.2 试验用细胞的准备 将冻存的大鼠肠黏膜微血管内皮细胞冻存管,快速在 37℃ 水浴锅中震荡、解冻,加入 2 mL 完全培养基于细胞培养板中,放入 37℃、5% 二氧化碳的恒温细胞培养箱中培养。2 h 换液 1 次后继续培养。之后每隔 24 h 换液。

1.2.3 试验分组 试验设置浓度为 100、10、1 μg·mL⁻¹ 及 100、10、1 ng·mL⁻¹ 的黄芩素试验组、细胞对照组、LPS 阴性对照组、空白对照组,每组 3 孔重复(即 n=3)。取 80%~90% 长满的大鼠肠黏膜微血管内皮细胞进行消化传代,调整细胞密度为 1×10⁵·mL⁻¹ 悬液,每孔 100 μL 接种于

96 孔细胞培养板上,周围加入 150 μL 的 PBS 溶液。加完后,摇晃 96 孔板,使细胞均匀落在每孔底壁上。

1.2.4 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的治疗作用 即先加 LPS 后加黄芩素,将 1.2.3 中细胞板置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 20 h 后,吸出每孔原有培养液弃去,对照组每孔加入 100 μL 维持培养基,试验组每孔加入 100 μL 的 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液;培养 4 h 后,吸出每孔原来培养液弃去,细胞对照组和空白对照组每孔加入 100 μL 维持培养基,LPS 阴性对照组每孔加入 100 μL 的 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液,试验组每组加入不同浓度的黄芩素溶液。

1.2.5 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的预防作用 先加黄芩素后加 LPS,将 1.2.3 中细胞板置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 20 h 后,吸出每孔原有培养液弃去,对照组每孔加入 100 μL 维持培养基,试验组分别加入浓度为 100、10、1 μg·mL⁻¹ 及 100、10、1 ng·mL⁻¹ 黄芩素溶液;培养 4 h 后,吸出每孔原来培养液弃去,细胞对照组和空白对照组每孔加入 100 μL 维持培养基,LPS 阴性对照组和试验组每孔加入 100 μL 的 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液;

1.2.6 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的保护作用 即同时加入黄芩素和 LPS,将 1.2.3 将细胞板置于 37℃,5% CO₂ 培养箱培养 20 h 后,吸出每孔原有培养液弃去,细胞对照组和空白对照组每孔加入 100 μL 维持培养基,LPS 阴性对照组每孔加入 100 μL 的 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液,试验组每孔分别加入不同的浓度的黄芩素溶液 90 μL 以及 10 μg·mL⁻¹ 的 LPS 溶液 10 μL;

1.2.7 MTT 法检测 RIMVECs 损伤 1.2.4、1.2.5、1.2.6 中的细胞培养 4 h 后,吸出每孔原来培养液弃去,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 溶液 100 μL,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱避光孵育 4 h 后,吸出原液弃去,每孔加入 150 μL 的 DMSO,振荡 10 min,在酶标仪波长为 490 nm 处测取 OD 值,计算各组细胞的存活率。

按照计算公式计算细胞毒性:细胞毒性百分比为(样品组 OD 值-空白对照 OD 值)/(细胞对照组 OD 值-空白对照 OD 值)×100%,其中空白对照为无细胞的培养基。计算细胞增殖率。

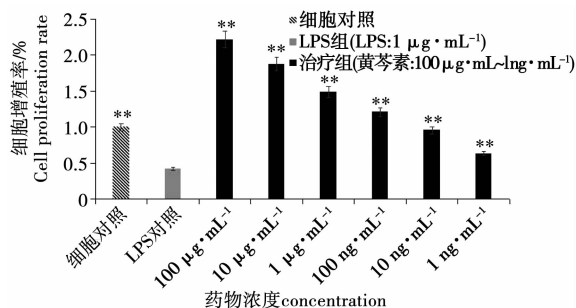
1.2.8 数据分析 试验数据采用 SPSS 13.0 软

件进行处理,采用 t 检验法进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的治疗作用

细胞对照组的细胞增殖率为 100%,浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 对照的细胞增殖率为 42.11%,对 RIMVECs 的增殖有抑制作用并且差异极显著 ($P < 0.01$)。不同浓度黄芩素对 LPS 诱导的 RIMVECs 损伤均有治疗作用,细胞增殖率升高,呈剂量依赖关系,并且差异极显著 ($P < 0.01$,图 1)。



与LPS对照组相比,细胞组 and 不同浓度治疗组的细胞增殖率均有显著升高。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $n=3$ 。下同。
Compared with the LPS in $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the cell proliferation of cell control group and treatment group significant increased. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $n=3$. The same below.

图 1 黄芩素对 LPS 损伤 RIMVECs 的治疗作用

Fig. 1 The therapeutic effect of scutellarin on cell proliferation of LPS-injured RIMVECs

2.2 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的预防作用

细胞对照组的细胞增殖率为 100%,浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 对照的细胞增殖率为 39.91%,对 RIMVECs 的增殖有抑制作用并且差异极显著 ($P < 0.01$)。不同浓度黄芩素对 LPS 诱导的 RIMVECs 损伤有一定的预防作用,细胞增殖率升高,呈剂量依赖关系,并且差异极显著 ($P < 0.01$,图 2)。

2.3 黄芩素对 LPS 诱导 RIMVECs 损伤的保护作用

细胞对照组的细胞增殖率为 100%,浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 对照的细胞增殖率为 40.54%,对 RIMVECs 的增殖有抑制作用并且差异极显著 ($P < 0.01$)。不同浓度黄芩素对 LPS 诱导的 RIMVECs 损伤有一定的保护作用,细胞增殖率升高,呈剂量依赖关系,并且差异极显著 ($P < 0.01$,图 3)。

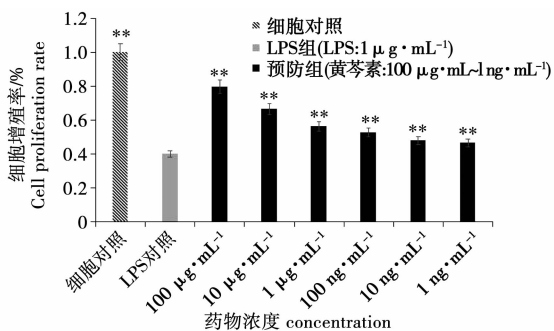


图 2 黄芩素对 LPS 损伤 RIMVECs 的预防作用

Fig. 2 The preventive effect of scutellarin on cell proliferation of LPS-injured RIMVECs

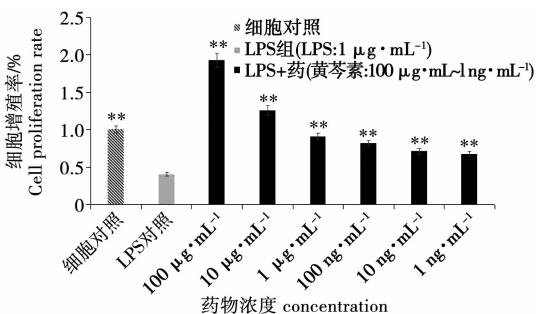


图 3 黄芩素对 LPS 损伤 RIMVECs 的保护作用

Fig. 3 The protective effect of scutellarin on cell proliferation of LPS-injured RIMVECs

3 结论与讨论

中药通过血液吸收、运行、分布全身及靶器官,微血管内皮细胞是中药接触的原始细胞或靶细胞,中药对微血管内皮细胞有重要的作用。中药能够影响血管内皮细胞的活性,曹燕明等^[6]应用中药复方骨炎定证明其对微血管内皮细胞增殖有促进作用;杨海贤等^[7]认为在内毒素性休克中,活血化瘀中药在超微结构水平上能够改善、修复受损的内皮细胞,证实对内皮细胞具有保护作用。

黄芩素是黄芩的主要药用成分之一,具有多种药理作用,如:抗菌、抗病毒、抗炎、抗变态反应、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗肿瘤、抗凝、抗血栓形成和保护肝脏、心脑血管、神经元等作用^[8]。研究证明,黄芩素有强大的氧自由基清除作用和黄嘌呤氧化酶的抑制作用,从而提高血管内皮的功能^[9],同样,兽医学(中医药)北京市重点实验室前期研究发现黄芩素对微血管内皮细胞的增殖也有促进作用^[2]。

本试验中,分别设置先加入药物再加入 LPS 组,先加入 LPS 再加入药物组以及将药物和 LPS 同时加入组处理细胞,观察不同浓度黄芩

素($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的抗细胞损伤作用。结果显示,不同浓度黄芩素均有显著的抗细胞损伤作用,黄芩素作用后的细胞增殖率显著高于 LPS 对照组,且呈浓度依赖性。在先加入 LPS 再加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 100\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩素的组别和同时加入 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的黄芩素和 LPS 的组别中,对损伤过的细胞还有显著的增殖作用,其细胞增殖率同时高于细胞对照组,说明黄芩素不仅对 LPS 损伤的 RIMVECs 有显著的治疗作用,而且黄芩素可能通过直接灭活 LPS 产生对 RIMVECs 的保护作用,而在先加入药物再加入 LPS 的组别中,细胞增殖率全部低于细胞对照组,推测黄芩素对 LPS 损伤的 RIMVECs 有一定的预防作用,但没有治疗作用效果明显。

本试验通过 MTT 法检测发现,中药有效成分黄芩素,对 RIMVECs 有一定程度的抗损伤和增殖作用并且均呈浓度依赖性关系,为进一步研究黄芩素对 LPS 的破坏机制奠定了基础。

参考文献:

[1] 董小青,王金兰,崔颖,等.内毒素致病机理与抗内毒素药物研究概况[J].天津药学,2003(4):51-53.
[2] 杨舒,张倩,冯波,等.黄芩水煎液中黄芩苷的 HPLC 测定及其抗内毒素作用[J].动物医学进展,2016(3):47-51.
[3] 王明明,杨舒,董虹,等.白头翁汤通过保护微血管内皮细胞的完整性及 PMNs 迁移杀菌功能的影响[J].畜牧兽医学报,2016(4):836-843.
[4] 马玲玲,孙燕.中药黄芩药理作用的研究进展[J].沈阳医学院学报,2016(2):115-117.
[5] 雷玲,胡竞一,余悦,等.黄芩的抗内毒素作用研究[J].中药药理与临床,2007(3):46-47.
[6] 曹燕明,徐海波,张薇,等.骨炎定促进血管内皮细胞增殖的血清药理学研究[J].广州中医药大学学报,2006(3):245-248.
[7] 杨舒,张倩,冯波,等.黄芩水煎液中黄芩苷的 HPLC 测定及其抗内毒素作用[J].动物医学进展,2016(3):47-51.
[8] 张瑜,武斌,许建卫.黄芩药理作用的研究进展[J].医学综述,2013(6):1091-1093.
[9] 许文杰,丁启龙.黄芩素的药理学研究进展[J].江苏药学与临床研究,2006,14(2):103-107.

Effect of Baicalein on LPS-induced RIMECs Injury

GAO Yang¹, MU Xiang²

(1. Huairou Agriculture Bureau of Beijing, Beijing 101400, China; 2. Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: In order to explore the anti-endotoxin effect of baicalein, in this study, MTT method was used to observed the effects of baicalein with different concentrations on injury of intestinal mucosal microvascular endothelial cells (RIMECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). The results showed that baicalin had some preventive and therapeutic effects on injury of RIMVECs induced by LPS, and the cell proliferation rate was increased in a dose-dependent manner.

Keywords: RIMVECs; LPS; baicalein

(上接第 74 页)

Plant Configuration and Maintenance Management of Wall Greening in Tianjin City

SUN Ning-ning

(Tianjin Jinghai District City Appearance and Garden Management Committee, Tianjin 301600, China)

Abstract: With the gradual reduction of the area of urban green space construction, three-dimensional greening is the inevitable trend of the development of modern garden, and the wall greening is an important form of three-dimensional greening. According to the current situation and practice of the wall greening in Tianjin, this paper preliminary analyzed of plant selection, configuration, planting form and maintenance management, and the principles and maintenance management methods of the wall greening plant were put forward so as to bring the greatest ecological benefits into play.

Keywords: Tianjin; wall greening; plant configuration; maintenance management