

牡蛎糖胺聚糖对血管内皮细胞损伤的保护作用研究

王海桃 刘 赛 鞠传霞 于 因

(青岛大学医学院 山东 青岛 266012)

摘要 目的:探讨牡蛎糖胺聚糖(O-GAG)对血管内皮细胞损伤的保护作用,观察它对损伤的血管内皮细胞内一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)含量及乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响。方法:采用人脐静脉内皮细胞株 ECV304 体外培养的方法,建立过氧化氢(H₂O₂)诱导的内皮细胞损伤模型,噻唑蓝(MTT)比色法观察牡蛎糖胺聚糖对血管内皮细胞增殖活性的影响,硝酸还原酶法、硫代巴比妥酸法和硝基苯酚法分别检测细胞内 NO 的含量、细胞培养液内 MDA 的含量和 LDH 的活性。结果:模型组较正常对照组细胞增殖活性明显降低(P<0.01)。与模型组相比,经牡蛎糖胺聚糖预处理的各保护组(除 10μg/ml)细胞增殖活性明显增加(P<0.05, P<0.01),NO 的含量增加,MDA 的含量和 LDH 的活性降低(P<0.01)。牡蛎糖胺聚糖(100、200μg/ml)对于正常的内皮细胞有促增殖作用(P<0.05)。结论:牡蛎糖胺聚糖对氧化损伤的血管内皮细胞具有保护作用,其作用机制可能与增加细胞 NO 含量、减少 MDA 生成和 LDH 释放有关。牡蛎糖胺聚糖对正常血管内皮细胞在一定剂量范围内有促增殖作用。

关键词:牡蛎糖胺聚糖;内皮细胞;过氧化氢;一氧化氮;丙二醛;乳酸脱氢酶

中图分类号:R972 **文献标识码:**A

Study in the protection effects of oyster glycosaminoglycan on vascular endothelial cell injury

WANG Hai - tao, LIU Sai, JU Chuan - xia, YU Nan

(Department of pharmacology, Medical College Qingdao University, Qingdao, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the protective action of oyster glycosaminoglycan (O-GAG) on the injured vascular endothelial cells (VECs), and investigate the effects of O-GAG on the expression of Nitric Oxide (NO), Maleic Dialdehyde (MDA), Lactate Dehydrogenase (LDH) in human VECs. **Methods:** The endothelial cell strain of human umbilical vein was cultured in vitro, and a model of VECs injured by hydrogen peroxide (H₂O₂) was established. The influence of O-GAG on the proliferative activity of VECs was observed by means of MTT assay. The levels of NO, MDA and LDH in culture medium were measured. **Results:** Compared with the normal control group, the proliferative activity of VECs in model group remarkably decreased (P<0.01), while in each protective group pretreated by O-GAG (except 10μg/ml), the proliferative activity of VECs obviously increased (P<0.05, P<0.01). O-GAG could increase the level of NO and decreased the levels of MDA and LDH in a concentration-dependent manner (P<0.01). The O-GAG control groups (100μg/ml, 200μg/ml) could increase the proliferative activity of normal VECs (P<0.05). **Conclusion:** O-GAG can protect the VECs from H₂O₂-induced injury. The mechanism may be related with the increase of NO levels and decrease of MDA generation and LDH release. O-GAG can proliferate the normal VECs in a certain dosage.

Key Words: Oyster glycosaminoglycan; Endothelial cells; Hydrogen peroxide; Nitric Oxide; Maleic Dialdehyde; Lactate Dehydrogenase

血管内皮细胞(VECs)的损伤在动脉粥样硬化的形成中起着重要的作用,它与脂质沉积、炎症反应以及平滑肌细胞的增殖、迁移作为动脉粥样硬化的主要病理改变,成为众多心血管疾病的直接原因。牡蛎体内含有多钟活性成分,如不饱和脂肪酸、牛磺酸、多种氨基酸、糖类、维生素、微量元素等^[1]。研究表明,牡蛎提取物具有抗菌、抗病毒、增强免疫功能的作用,对高血糖小鼠还具有保护作用^[2]。近年来研究报道,牡蛎提取物对在体的动物模型具有调血脂、抗动脉粥样硬化作用^[3]。本文采用体外细胞培养的方法,用过氧化氢诱导 VECs 损伤,研究牡蛎糖胺聚糖(O-GAG)对 VECs 损伤的保护作用及可能机制。

1 材料与方 法

作者简介:王海桃,女,(1981-),硕士在读,研究方向为心血管药理学。

通讯作者:刘赛,女,(1951-),教授,研究方向,心血管药理学。

E-mail: liusai5151@126.com

(收稿日期:2006-06-10 接受日期:2006-07-23)

1.1 实验材料

O-GAG(青岛大学医学院药理学教研室提供);H₂O₂(山东高密制药厂);一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)及乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(南京建成生物研究所);酶标仪(英国 Tecan 公司);721B 型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)

1.2 细胞培养

本实验中所用的细胞株为 ECV304,用 DMEM 含高糖培养基(含 10% 胎牛血清)在含 5% CO₂ 的细胞培养箱中,37℃ 常规培养,实验采用传代细胞。

1.3 O-GAG 对氧化损伤及正常的 VECs 增殖活性的影响

1.3.1 实验分组:实验共 12 组:正常对照组、损伤模型组(过氧化氢 50μg/ml)、肝素对照组(200μg/ml,过氧化氢 50μg/ml) O-GAG 保护组(O-GAG 分别为 10、50、100、200、400、800μg/ml,过氧化氢 50μg/ml)、O-GAG 对照组(O-GAG 分别为 100、200、400μg/ml)

1.3.2 条件培养:将传代的 VECs 按 105/ml 接种于 96 孔板至汇合状态时,换成无血清的 DMEM 培养基,同时肝素组、O-GAG 保护组和 O-GAG 对照组分别加入相应浓度给予处理,

培养 24 小时后,模型组、肝素组和 O-GAG 保护组分别加入含 H₂O₂(终浓度为 50 μ g/ml)的培养基,12 小时后终止培养。

1.3.3 MTT 测定:终止培养后加入 MTT20 μ l,继续孵育 4 小时后,每孔加入 200 μ l 的二甲亚砷,振荡,置于酶标仪 570nm 处测定各孔吸光度值,以分析细胞的增殖活性。

1.4 O-GAG 对氧化损伤的 VECs 内 NO、MDA 和 LDH 表达的影响

1.4.1 实验分组:分为正常对照组、损伤模型组(过氧化氢 50 μ g/ml)、肝素对照组(肝素 200 μ g/ml,过氧化氢 50 μ g/ml)、O-GAG 保护组(O-GAG 分别为 50、100、200 μ g/ml,过氧化氢 50 μ g/ml)、O-GAG 对照组(O-GAG 100、200、400 μ g/ml)。

1.4.2 条件培养:同上,收集培养液-20℃保存备用,Hank's 液洗涤细胞 3 次,调整细胞数为 10⁶/ml,超声细胞粉碎仪粉碎细胞。

1.4.3 一氧化氮浓度测定:亚硝酸/硝酸根离子为 NO 的稳定代谢产物,已经被证实为指示 NO 的优良指标,分别收集各组粉碎的细胞,测定亚硝酸/硝酸根离子的含量。

1.4.4 MDA 的测定:采用 TBA(硫代巴比妥酸)显色法,过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)发生缩合反应,生成红色产物。通过比色法测定各组细胞培养液中的 MDA 含量。

1.4.5 LDH 的测定:LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,后者与 2,4-二硝基苯肼反应生成的物质在碱性中呈棕红色。通过比色求出各组细胞培养液中 LDH 的活力。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个均数间比较采用方差分析,然后进行两两比较的 q 检验。采用 SPSS10.0 软件操作, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 O-GAG 对氧化损伤的 VECs 增殖活性的影响

与正常对照组比较,给予 H₂O₂ 后,VEC 的增殖活性明显降低($P < 0.01$,表 1,Table 1)。与模型组比较,除 O-GAG 最低剂量组(10 μ g/ml)外,O-GAG 各浓度保护组及肝素对照组的内皮细胞活性均有所增高,且随着 O-GAG 浓度的增加,细胞活性逐渐增高(图 1,figure1),与模型组间有显著性差异($P < 0.05$,表 1,Table1),且 O-GAG 各实验组间也有显著性差异($P < 0.05$)。此外,各 O-GAG 对照组与正常对照组相比,200 μ g/ml 与 100 μ g/ml 都可以使细胞活性增强($P < 0.05$),而 400 μ g/ml 组细胞与对照组相比,没有明显差异($P > 0.05$,表 1,Table 1; 图 2,figure 2)

2.2 O-GAG 对氧化损伤的 VECs 内 NO、MDA 和 LDH 表达的影响

与模型组相比,O-GAG 保护组随着 O-GAG 浓度的增加,VEC 产生 NO 的量逐渐增加,产生 MDA 和渗出的 LDH 的量逐渐降低,各实验组与正常对照组间均有显著性差异($P < 0.01$),且各实验组间也有显著性差异($P < 0.05$)。除此之外,O-GAG 对照组与正常对照组相比,产生 NO 的量明显增加,而 MDA 和 LDH 的量明显降低了,且均有显著性差异($P < 0.01$,表 2,Table 2)。

表 1 O-GAG 对氧化损伤及正常的 VECs 增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 The effects of O-GAG on the proliferative activity of normal and injured VECs.

分组	OD 值
正常对照组	0.959 + 0.260
损伤模型组	0.067 + 0.018
O-GAG 保护组	
10 μ g/ml	0.083 + 0.011
50 μ g/ml	0.199 + 0.005 ^a
100 μ g/ml	0.334 + 0.006 ^b
200 μ g/ml	0.483 + 0.031 ^b
400 μ g/ml	0.915 + 0.058 ^b
800 μ g/ml	1.199 + 0.066 ^b
O-GAG 对照组	
100 μ g/ml	1.329 + 0.109 ^c
200 μ g/ml	1.568 + 0.155 ^c
400 μ g/ml	1.022 + 0.168
肝素组	0.259 + 0.057 ^b

a: $P < 0.05$,与模型组比较;b: $P < 0.01$,与模型组比较,c: $P < 0.05$,与正常对照组比较。

a: Compared with model group, $P < 0.05$; b: Compared with model group, $P < 0.01$; c: Compared with normal control group, $P < 0.05$.

表 2 O-GAG 对氧化损伤的 VECs 的 MDA、LDH 和 NO 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 The effects of O-GAG plus H₂O₂ on the expression of NO, MDA and LDH.

分组	NO (μ mol/L)	MDA (nmol/ml)	LDH (U/L)
正常对照组	24.513 + 0.760	1.066 + 0.099	1697 + 99
损伤模型组	8.126 + 1.626 ^a	3.371 + 0.207 ^c	8632 + 58 ^c
O-GAG 保护组			
低浓度组	13.631 + 0.545 ^b	2.480 + 0.124 ^b	5130 + 81 ^b
中浓度组	16.306 + 0.733 ^b	1.962 + 0.050 ^b	4551 + 40 ^b
高浓度组	19.819 + 0.489 ^b	1.202 + 0.195 ^b	3667 + 27 ^b
O-GAG 对照组	24.688 + 1.255	0.933 + 0.060	1534 + 72
肝素组	20.633 + 1.473 ^b	1.674 + 0.159 ^b	3901 + 155 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$,与模型组相比;c: $P < 0.01$,与对照组比较。

Compared with model group, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$. Compared with control group, c: $P < 0.01$.

3 讨论

近年研究已证明 MTT 比色法可用于研究 VECs 的活性。MTT 参与活细胞线粒体的能量代谢,它的形成量反映了线粒体的代谢活力^[4]。过氧化氢是活性氧,可促进自由基生成。生物体内过氧化氢如不及时被过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶消除,它可透过细胞膜,在膜外与 Fe²⁺ 或 Cu²⁺ 生成羟自由基 OH·,从而引发脂类过氧化而导致细胞损伤^[5]。本实验中发现,H₂O₂ 使 VECs 活性降低,表明 H₂O₂ 可损伤 VECs 的线粒体,而预先加入 O-GAG,VEC 的增殖活性明显增加,说明 O-GAG 可减少 H₂O₂ 对 VECs 损伤。此作用可能对 VECs 损伤时的修复具有重要作用。另外在正常的 VEC 生长过程中加入一定浓度的 O-GAG,细胞的增殖活性与对照组相比明显增加,在 200 μ g/ml 时作用最强,说明 O-GAG 有促进 VECs 增殖的作用。该作用具有明显的量效关系:随着药物浓度的增加,其保护作用越明显,达 400 μ g/ml 时细胞的增殖活性与对照组

相同。

乳酸脱氢酶(LDH)是细胞损伤的重要标志之一。当内皮细胞膜脂质发生过氧化时,膜结构遭受破坏,细胞通透性就会明显增加,因此细胞 LDH 渗出增加;若进一步加重,可导致细胞代谢功能减退直至死亡。本实验结果显示,过氧化氢使细胞释放 LDH 增加。当预先加入 O-GAG 后,可使 LDH 释放减少,表明 O-GAG 可保护 VECs 的完整性。

丙二醛(MDA)是细胞氧化损伤的代表性产物,它是在氧自由基攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化反应形成的,它可以使细胞膜的稳定性和通透性发生改变;MDA 还可以增强血小板活性,使血小板花生四烯酸的释放及代谢活跃,结果 TXB₂ 产生增多, TXB₂ 产生过程中也可产生大量 MDA,形成恶性循环。已知脂质过氧化物的产生增加与动脉粥样硬化形成密切相关,因此检测 MDA 含量的高低可以间接的反映细胞损伤的程度。本实验结果显示:O-GAG 可降低过氧化氢诱导的 VECs 生成 MDA,且存在剂量依赖性,提示 O-GAG 具有抗过氧化反应性损伤的能力。这可能与牡蛎提取物具有抑制活性氧的形成或直接清除已形成的活性氧有关,从而拮抗过氧化氢对 VECs 的脂质过氧化而保护 VECs。以上结果均提示 O-GAG 可通过对抗 VECs 损伤从而保护其完整性。

一氧化氮(NO)主要由血管内皮细胞产生,具有广泛的生物学效应,它不仅可以舒张血管平滑肌、参与机体的免疫反应,还有抗血小板凝集、抗血小板和血细胞粘附、抗血管平滑肌细胞增生等作用^[6]。NO 在体内由 L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)的催化作用下生成,主要以局部弥散的方式激活靶细

胞的可溶性鸟苷酸环化酶(CG)生成 cGMP,再经蛋白激酶 G(PKG)磷酸化效应蛋白而发挥其作用。本实验结果显示:过氧化氢可使内皮细胞释放的 NO 明显减少,而预先加入了三种浓度的 O-GAG 之后均可以对抗 H₂O₂ 导致的血管内皮细胞损伤,对血管内皮细胞合成分泌 NO 的功能具有保护作用,增加 NO 的释放,有利于 NO 挥发,从而产生舒张血管,抗血小板和血小板聚集、黏附等作用。

本实验研究说明,牡蛎糖胺聚糖(O-GAG)在一定剂量范围内对正常血管内皮细胞有促增殖作用,可以对抗 H₂O₂ 诱导的内皮细胞脂质过氧化损伤,对血管内皮细胞产生保护作用,其机理可能与其抗脂质过氧化作用有关。

参考文献

- [1] 谭桂利,李瑞声.牡蛎的化学成分和药用价值[J].中国海洋药物,1993,12(4):26-31
- [2] 徐静,于红霞.牡蛎提取物的生物活性研究进展[J].中国公共卫生,2004,20(11):1395-1397
- [3] 刘赛,仲伟珍,张健,等.牡蛎提取物对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用及机制[J].中国动脉硬化杂志,2002,10(2):97-100
- [4] Guang HM, Zhang XM, Li YQ, et al. Protection of vascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidant injury by pycnosides saponins of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Yao Xue Xue Bao, 2005, 40(3):200-204
- [5] 林蓉,刘俊田,李旭,等.槲皮素对血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国循环杂志,2000,15(5):304-305
- [6] 姚瑞,党瑜华,张非斐.非对称性二甲基精氨酸对人脐静脉内皮细胞功能的影响[J].中国动脉硬化杂志,2005,13(4):471-474

(上接第 32 页)

4 讨论

实验结果表明当日给药组和肿瘤直径 0.3cm 组与空白对照组比较,肿瘤生长速度显著减缓,生存时间明显延长;而肿瘤直径 0.6cm 组小鼠肿瘤的生长速度及小鼠的生存时间与空白对照组比较则无统计学意义,说明在肿瘤生长的一定期单独应用当归补血汤有明显抑制肿瘤生长的作用。

当归补血汤以补益为主,可能无直接祛邪的作用。有研究证明,补气养血方剂对有增殖能力的肿瘤细胞没有直接抑制作用^[4]。本研究结果提示:①在接种肿瘤的当天应用当归补血汤可延长小鼠成瘤时间并延缓肿瘤的生长②在肿瘤生长的早期也可以显著抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长,③预防及肿瘤早期应用可显著延长小鼠生存时间④肿瘤长到一定大小单独应用当归补血汤无明显抑制肿瘤生长的作用。研究表明补益中药的抗癌作用可能在不同环节、不同程度上增强机体的抗肿瘤免疫反应,通过增强免疫细胞和免疫因子的活性,而达到间接抗肿瘤的目的^[5]。我们的研究证明,当归补血汤对荷瘤小鼠的 T 细胞及巨噬细胞等的功能均有明显的促进作用,这

方面的工作将另有文章发表。临床大都用加味当归补血汤对放、化疗肿瘤患者进行辅助治疗,但中医药抗癌的传统思维认为,应慎用或不用养血药,唯恐引起肿瘤细胞的迅速增殖,所以养血药能否应用于肿瘤患者以改善其正气不足,至今尚无统一论^[6],因此对肿瘤晚期单独应用传统当归补血汤作为辅助性用药是否合适还将有待研究探讨。

参考文献

- [1] 郭乃燕.补益类中药与抗癌[J].时珍国药研究,1998,9(2):191
- [2] 陈达理,黄涛.四君子汤对荷瘤小鼠抑制和诱导肿瘤细胞凋亡的实验研究[J].山东中医杂志,2004,23(4):228-229
- [3] 陈陵际,丁健.用人癌裸小鼠移植瘤模型进行抗癌新药评价——NC1 和 EORTC 临床前体内药效学研究方法和原则[J].上海实验动物科学,2001,21(4):247-250
- [4] 徐瑞荣,顾振东,黄文玉,等.复方补益药对白血病小鼠 CFU-GM 及 CFU-L 的影响[J].中国中医药科技,1995,2(2):23-25
- [5] 吴雪卿.补益中药抗癌作用研究进展[J].湖南中医药导报,1999,5(9):10-13
- [6] 张荣芹.中药抗肿瘤过程中应用养血药的探讨[J].世界感染杂志,2004,4(1):61