

丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白损伤内皮的保护作用

沈成兴 罗俊^① 刘乃丰 陈日新

(南京铁道医学院附属第一医院心内科, 南京 210009)

Probucol Prevents the Cultured Endothelial Cells from Injury Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

SHEN Chen-Xing, LUO Jun, LIU Nai-Feng and CHEN Ri-Xin

(Cardiovascular Division, The First Affiliated Hospital, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT

Aim Endothelial cells injured by free radicals is a crucial step in the development of many diseases. We investigated the protective effect of probucol, an antiatherosclerosis drug, to the cultured human endothelial cells.

Methods The oxidized low density lipoprotein (OLDL) were used as free radical resources and ³H-TdR incorporation of the cells was estimated as DNA synthesis. The microstructure change was studied by using the scanning electron microscope.

Results At 24 hours interval, the ³H-TdR incorporated into the cells in OLDL group was 48% as that of nLDL group or 56% as that of probucol + OLDL group ($P < 0.001$). The scanning electron microscopic study showed that the intercellular junctions diminished and the cellular outline changed in the OLDL treated cells but not the probucol treated cells.

Conclusions Probucol is an useful antioxidant in preventing the cultured cells from injury by free radicals and perhaps thus contributes to the antiatherogenesis effect.

KEY WORDS Low density lipoprotein; Probucol; Endothelial cell; Antioxidant

摘要 用培养的人脐静脉内皮细胞为对象,用³H-TdR掺入法,观察了抗氧化剂丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白作用下的内皮细胞DNA合成的保护作用,并用扫描电子显微镜观察其对培养细胞形态结构的影响。结果发现,在作用24h后,氧化型低密度脂蛋白组的³H-TdR掺入量是天然低密度脂蛋白组的48%,是丙丁酚组的56%($P < 0.001$),超微结构显示丙丁酚组的细胞结构保持正常,而氧化型低密度脂蛋白组则受到破坏。本实验显示丙丁酚对内皮细胞的氧自由基损伤有明显的保护作用。

关键词 低密度脂蛋白; 丙丁酚; 内皮细胞; 抗氧化剂

内皮细胞衬覆于血管内表面,功能极为活跃,内皮细胞的氧化损伤是启动多种疾病发生发展的关键步骤之一^[1],也是当前国内外医学研究的一个热点。富含胆固醇的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)经Cu²⁺氧化修饰变成氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, OLDL)后毒性明显增加,抗氧化剂可抑制这种毒性作用。本文观察了具有降脂作用的抗氧化剂丙丁酚对培养的人内皮细胞的抗氧化保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

胶原酶Ⅰ(Sigma),小牛血清(上海第二医科大学提供),胰蛋白酶(Difco),丙丁酚(Sigma),氘标胸腺嘧啶核苷(³H-thymidine, ³H-TdR,上海原子能研究所),24孔培养板(Gibco),6孔培养板(Nuclon),液体闪烁仪(Beckman, 5800),扫描电镜(Leica, S-360),相差显微镜(尼康,日本),CO₂培养箱(Queue),超速离心机(Scp85H)。

1.2 天然低密度脂蛋白分离、鉴定及氧化

① 现在南京市立一医院心内科工作

按本实验室方法^[1],取正常人空腹 12 h 新鲜混合静脉血, 0.1% EDTA 抗凝, 分离血浆后用固体溴化钾调节密度形成单个不连续密度梯度, 在日立 SCP85H 超速离心机上(10℃, 16 000×g)离心 150 min, 收集 LDL 区带。用 50 倍 LDL 体积的 PBS(10 mmol/L, pH7.4, 含 0.01% EDTA)透析 36 h, 每 4~6 h 换液一次, 最后三次无 EDTA, 过滤除菌 4℃ 保存, 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度, Lowery 法测蛋白含量。LDL 氧化中的 CuSO_4 终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$, 本实验所需的 OLDL 为孵育 16 h 的 LDL。

1.3 内皮细胞分离、培养及鉴定

内皮细胞分离于健康胎儿脐静脉, 参照 Jaffe 方法^[2], 扫描电镜下呈均匀卵石状排列, 荧光检查呈 VII 因子抗原阳性。

1.4 丙丁酚对低密度脂蛋白氧化的抑制

蛋白含量为 0.1 g/L 的 LDL 与 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuSO_4 在 37℃ 孵育 24 h, 分别测其在各时间点的硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)量; 实验组加入浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的丙丁酚; 另将丙丁酚配制浓度为 5、10、15、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度, 测其浓度效应。

1.5 丙丁酚对内皮细胞 DNA 合成的影响

将生长融合成单层的内皮细胞分成三组, 采用 ^3H -TdR 掺入法观察丙丁酚对内皮细胞的 DNA 合成的影响: (1)天然 LDL(nLDL)组: 除 RPMI-1640 培养液外, 加入浓度为 0.1 g/L 的 nLDL。 (2)OLDL 组: 除 RPMI-1640 培养液外, 加入浓度为 0.1 g/L 的 OLDL。 (3)OLDL+丙丁酚组: 除 OLDL 组液体外, 加入终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的丙丁酚。

1.6 丙丁酚对内皮细胞保护的电镜观察

将分离、计数的内皮细胞均分加入 6 孔培养板, CO_2 培养箱中静置培养, 孔中预先置入灭菌的盖玻片。培养融合成单层后, 分别加入 OLDL、nLDL 和 OLDL+丙丁酚, 丙丁酚浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 24 h 后, 取出, 按电镜制片常规固定、脱水后, CO_2 临界干燥器内干燥, 真空下喷金, Leica S-360 扫描电镜观察。

1.7 数据处理

所有数据均为计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验其显著性。 $P < 0.05$ 为显著。

2 结果

2.1 丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白氧化修饰的抑制

如图 1 (Figure 1) 所示, 与对照组比较, 丙丁酚浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时可明显抑制其 TBARS 的生成; 具有显著性差异抑制的最低浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 抑制 TBARS 50% 浓度 (IC_{50}) 为 3.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

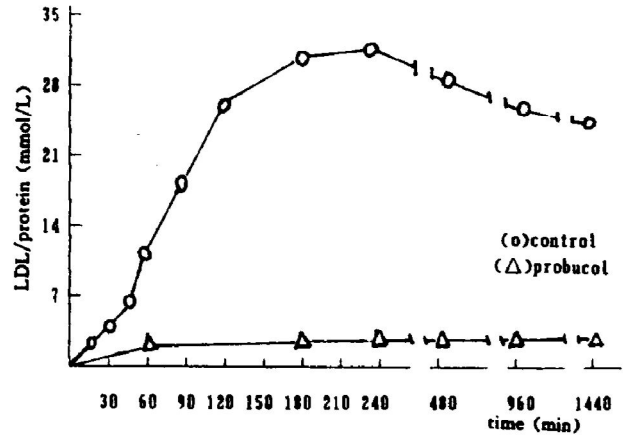


Figure 1. Effect of probucol on the kinetics of the Cu^{2+} induced LDL oxidation studied by TBARS ($n=3$).

2.2 丙丁酚对内皮细胞 DNA 合成的影响

如图 2 (Figure 2) 所示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的丙丁酚组与天然 LDL 组相比无明显差异, 与 OLDL 组相比, 差异具有极高度显著性 ($P < 0.001$)。

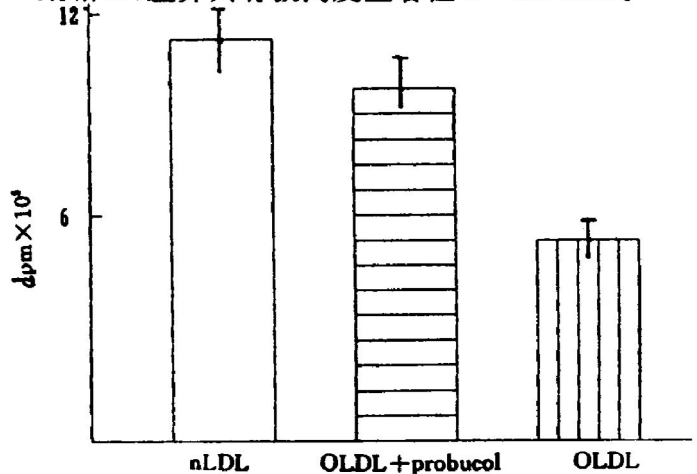


Figure 2. Effect of probucol on the ^3H -TdR incorporation to DNA of cultured human umbilical endothelial cells at confluence for 24 hours ($n=6$).

2.3 电镜观察结果

正常细胞呈单层卵石样排列, 胞间突起清晰 (图 3, Figure 3), OLDL 组细胞生长受抑,

死亡较多,部分有剥脱样死亡。细胞形态结构改变,明显不规则,微绒毛减少甚至消失,胞间连接减少(图4, Figure 4);丙丁酚组细胞结构正常,无明显异常改变(图5, Figure 5)。



Figure 3. Scanning electron micrograph of normal endothelial cell. ($\times 2\,200$)



Figure 4. Scanning electron micrograph of endothelial cell incubated with oxidized low density lipoprotein. ($\times 3\,300$)



Figure 5. Scanning electron micrograph of endothelial cell incubated with OLDL and probucol. ($\times 2\,800$)

3 讨论

大量研究表明富含胆固醇的 LDL 对培养的细胞包括内皮细胞有明显的毒性作用^[4]。我们在用 Cu^{2+} 催化氧化的 LDL 与内皮细胞一起孵育时,细胞 DNA 合成较对照组明显减少,并且呈时间效应(数据待整理);在同一种情况下,浓度越大时,抑制也越明显,高浓度时(0.15 g/L)细胞出现死亡,倒置显微镜下可见部分细胞浮起,培养板底单层细胞成片样剥脱。丙丁酚是一种脂溶性强的抗氧化剂,动物实验和临床观察均表明其具抗动脉粥样硬化作用^[5]。本实验中低浓度的丙丁酚($5\text{ }\mu\text{mol/L}$)就可抑制 Cu^{2+} 对 LDL 的氧化修饰,浓度越大,抑制作用越强,加入内皮细胞中后,可显著抑制 OLDL 对内皮细胞的 DNA 合成的毒性作用($P < 0.01$),与国外其它作者报道的结果一致^[6]。扫描电镜发现,OLDL 可明显损害内皮细胞的表面结构,胞间连接也明显减少,间隙增大,活体时这种损伤有利于 LDL 等物质沉积于此间隙中,渗透到内膜下,被单核细胞摄取、氧化,形成恶性循环,丙丁酚减少了这种损伤,从而发挥一系列生物学效应,这也许是抗动脉粥样硬化的机理之一。

参考文献

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 263: 881~889.
2. 罗骏, 刘乃丰, 陈日新, 等. 及莫地平、维拉帕米、卡托普利、普罗布可的体外抗脂质过氧化作用. *南京铁道医学院学报*, 1996, 2: 77~79.
3. Eric AJ, Ralph LN, Carl GB, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest*. 197; 52: 2 745.
4. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Modification of LDL that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320: 916~924.
5. Kita T, Nagano Y, Yokode M, et al. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in WHHL rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 5 928~931.
6. Michitaka N, Masafumi K, Akihisa I. Mechanism of endothelial cell injury induced by oxidatively modified LDL. *动脉硬化*. 1994; 22: 252~262.

(1996-12-17 收刊, 1997-03-04 修回)