

普罗布考对溶血磷脂酰胆碱致培养人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

田庆印¹, 刘同涛¹, 李伯勤², 潘其兴¹, 朱 清¹

(山东大学 1. 齐鲁医院心内科; 2. 基础医学院超微结构室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理生理学; 普罗布考对内皮细胞的保护作用; 培养人脐静脉内皮细胞; 普罗布考; 溶血磷脂酰胆碱; 一氧化氮; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨普罗布考对溶血磷脂酰胆碱致培养人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用, 采用培养的人脐静脉血管内皮细胞, 观察溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞产生和分泌一氧化氮及其合酶、组织型纤溶酶原激活剂、纤溶酶原激活物抑制剂及乳酸脱氢酶活性的影响, 并观察普罗布考的保护作用。结果发现, 溶血磷脂酰胆碱明显增加乳酸脱氢酶活性(48.0 ± 4.1 比 28.0 ± 7.5 , $P < 0.05$), 增加细胞死亡率(9.9 ± 1.2 比 6.3 ± 0.9 , $P < 0.05$); 同时抑制内皮型一氧化氮合酶(48.0 ± 4.3 比 63.4 ± 6.8) 及组织型纤溶酶原激活剂活性(0.31 ± 0.05 比 0.43 ± 0.07 , $P < 0.05$), 增强纤溶酶原激活物抑制剂的活性(1.39 ± 0.21 比 0.97 ± 0.11 , $P < 0.05$), 具有剂量-依赖效应。预先应用不同剂量的普罗布考 (10~50 mmol/L) 后, 该效应明显减弱。以上提示, 溶血磷脂酰胆碱能直接损伤内皮细胞, 抑制组织型纤溶酶原激活剂及内皮型一氧化氮合酶活性, 增强纤溶酶原激活物抑制剂活性, 普罗布考对内皮细胞具有保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of Probucol on the Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell Injured by Lysophosphatidylcholine

TIAN Qing-Yin, LIU Tong-Tao, LI Bo-Qin, PAN Qi-Xing, and ZHU Qing

(Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Probucol; Endothelial Cell; Lysophosphatidylcholine; Nitric oxide; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the protective effect of probucol on the human umbilical vein endothelial cell (hUVECs) injured by lysophosphatidylcholine. **Methods** Confluent hUVECs were incubated with Probucol for 24 h and consequently exposed to lysophosphatidylcholine. Lactate dehydrogenase (LDH), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and tissue plasminogen activator (t-PA) activity was measured in cell medium and lysate. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and nitric oxide (NO) production were assessed by endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide kits. **Results** Lysophosphatidylcholine enhanced markedly PAI-1, LDH activity and decreased nitric oxide bioavailability via the inhibited eNOS activity ($P < 0.01$). These effects were attenuated by administration of different dose of probucol (10~50 mmol/L). **Conclusions**

Lysophosphatidylcholine could injure hUVECs and inhibit eNOS and t-PA activity directly. Probucol might play a protective role in hUVECs injured by lysophosphatidylcholine.

溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 是氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 的主要成分, 对血管内皮细胞有损伤作用, 从而在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 中发挥一定的作用^[1]。普罗布考 (probucol, PRB) 为临床上常用的血脂调节药, 同时也是一种强有力的抗氧化剂, 可以延缓食饵性高脂血症兔动脉粥样硬化的形

成^[2]。本文观察溶血磷脂酰胆碱对培养的人脐静脉内皮细胞产生和分泌一氧化氮 (nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、组织型纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, t-PA) 和纤溶酶原激活物抑制剂 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 的影响, 并观察普罗布考的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

普罗布考和溶血磷脂酰胆碱为美国 Sigma 产品; 小牛血清, DMEM 培养基, 胰蛋白酶 (Gibco 公司); 一氧化氮合酶测试盒, 一氧化氮测试盒 (南京建成生物工程研究所); 组织型纤溶酶原激活剂和纤溶

[收稿日期] 2002-08-28 [修回日期] 2003-04-29

[基金项目] 山东省卫生厅科研基金及山东省自然科学基金资助项目

[作者简介] 田庆印, 男, 1967 年出生, 山东省定陶县人, 硕士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化的基础与临床研究, 联系电话: 0531-6921941-5429, E-mail: tianqingyin@medmail.com.cn。刘同涛, 男, 1964 年出生, 山东省菏泽市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事高血压与动脉粥样硬化的基础与临床研究。李伯勤, 女, 1949 年出生, 山东省菏泽市人, 学士, 副教授, 主要从事细胞显微与亚显微结构研究。

酶原激活物抑制剂试剂盒由上海太阳生物技术公司提供; VU-260 紫外分光光度计(日本津岛公司); ACL200 型全自动血凝仪(美国库尔特公司); 恒温培养箱; 超净工作台等。

1.2 人脐静脉内皮细胞株的培养和分组

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 购自中科院上海细胞生物学研究所。用含 15% 小牛血清 DMEM 培养基在 37℃ 培养箱内培养 3~5 天, 待细胞汇合后, 用 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA 进行消化。镜下观察到细胞收缩变圆时弃去消化液, 加入培养基以终止胰蛋白酶作用。用滴管吹打壁上的细胞, 使其完全脱落及分离。按 3×10^6 个细胞接种于 24 孔板上培养。待细胞融合后, 换用无血清无酚红 DMEM 培养基即可进行实验。

实验共分为 3 组: 对照组; ④LPC 组: 根据 LPC 浓度(2.5、5 和 10 nmol/L)的不同分为 3 个亚组; ④PRB 组: 根据 PRB 浓度(10、20 和 50 mmol/L)的不同分为 3 个亚组, 在每个亚组中先加入 PRB 预处理 24 h, 然后再加入 5 nmol/L 的 LPC。以上各组均孵育 24 h。

1.3 一氧化氮和一氧化氮合酶活性的测定

分别收集各组细胞培养基, 测定亚硝酸/硝酸根离子的含量。测定方法按照一氧化氮测试盒说明书来操作。

一氧化氮合酶催化 L 精氨酸和分子氧反应生成 NO, NO 与亲和性物质生成有色化合物, 在 530 nm 波长下测吸光度, 根据吸光度的大小可计算出 NOS 活力。NOS 活力单位的定义: 每毫升培养基中每分

钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。操作按说明书进行。

1.4 乳酸脱氢酶活性测定

乳酸脱氢酶的活性采用 2,4-二硝基苯肼比色法。细胞死亡率 = 培养基乳酸脱氢酶活性 ÷ (细胞内乳酸脱氢酶活性 + 培养基乳酸脱氢酶活性) × 100%。

1.5 组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活物抑制剂活性测定

采用发色底物法按照试剂盒说明书来操作。

1.6 统计学分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较用方差分析, 组间比较用 q 检验作统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 溶血磷脂酰胆碱对乳酸脱氢酶活性以及细胞死亡率的影响

溶血磷脂酰胆碱组乳酸脱氢酶活性以及细胞死亡率较对照组明显增加 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖效应(表 1, Table 1)。

2.2 溶血磷脂酰胆碱对一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量及组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活物抑制剂活性的影响

随着 LPC 浓度的增加, 内皮型 NOS 及 t-PA 活性逐渐减弱 ($P < 0.01$), NO 含量逐渐减少 ($P < 0.01$), 而 PAI-1 活性增强 ($P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 溶血磷脂酰胆碱对内皮型一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量、乳酸脱氢酶活性、组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活物抑制剂活性以及细胞死亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Effects of different doses of LPC on NO, eNOS, t-PA, PAI-1 production, LDH activity, and mortality of hUVEC

组别	一氧化氮合酶(ku/L)	一氧化氮(μ mol/L)	乳酸脱氢酶(u/L)	细胞死亡率(%)	组织型纤溶酶原激活剂(kIU/L)	纤溶酶原激活物抑制剂(kAU/L)
对照组	63.4 \pm 6.8	70.2 \pm 10.3	28.0 \pm 7.5	6.3 \pm 0.9	0.43 \pm 0.07	0.97 \pm 0.11
LPC (2.5 nmol/L)	48.0 \pm 4.3 ^a	59.7 \pm 2.9 ^a	48.0 \pm 4.1 ^a	9.9 \pm 1.2 ^a	0.31 \pm 0.05 ^a	1.39 \pm 0.21 ^a
LPC (5 nmol/L)	39.0 \pm 4.8 ^a	34.8 \pm 4.4 ^a	79.0 \pm 8.9 ^a	13.8 \pm 1.3 ^a	0.26 \pm 0.06 ^a	2.01 \pm 0.56 ^a
LPC (10 nmol/L)	12.8 \pm 2.3 ^b	15.6 \pm 5.5 ^b	99.0 \pm 9.1 ^b	15.6 \pm 2.9 ^b	0.21 \pm 0.03 ^b	2.55 \pm 0.63 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

2.3 普罗布考对溶血磷脂酰胆碱引起的内皮型一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量、乳酸脱氢酶活性、组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活物抑制剂活性以及细胞死亡率改变的影响

普罗布考组 t-PA 活性、eNOS 活性及一氧化氮生成量增加, 而乳酸脱氢酶、PAI-1 活性和细胞死亡率降低, 且随着 PRB 浓度的增加, 该效应增强 ($P < 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 普罗布考对内皮型一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量、乳酸脱氢酶活性、组织型纤溶酶原激活剂和纤溶酶原激活物抑制剂活性以及细胞死亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2. Effects of different doses of probucol on eNOS, tPA, PAI-1 and LDH activity, NO production, mortality of hUVECs

组 别	一氧化氮 合酶 (10^3 u/L)	一氧化氮 (μ mol/L)	乳酸脱氢 酶 (u/L)	细胞死亡率 (%)	组织型纤溶酶原 激活剂 (IU/mL)	纤溶酶原激活物 抑制剂 (au/mL)
对照组	39 \pm 5	35 \pm 4	79 \pm 9	13.8 \pm 1.3	0.26 \pm 0.06	2.01 \pm 0.56
普罗布考 (10 mmol/L)	43 \pm 7 ^a	45 \pm 6 ^a	50 \pm 4 ^a	8.9 \pm 2.2 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a	1.59 \pm 0.11 ^a
普罗布考 (20 mmol/L)	48 \pm 5 ^a	50 \pm 11 ^a	43 \pm 5 ^a	8.3 \pm 0.5 ^a	0.35 \pm 0.07 ^a	1.35 \pm 0.11 ^a
普罗布考 (50 mmol/L)	53 \pm 5 ^b	66 \pm 9 ^b	38 \pm 6 ^b	7.2 \pm 1.1 ^b	0.38 \pm 0.13 ^b	1.15 \pm 0.23 ^b

与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 。

2.4 形态学指标

倒置显微镜下动态观察可见, 对照组细胞紧密贴壁, 呈铺路石状生长。LPC 组细胞折光度增强, 贴壁细胞逐渐变小、变圆, 可见细胞发泡现象, 最后细胞脱落或悬浮。HE 染色后光镜下观察可见, LPC 组细胞体积变小, 胞质收缩, 核染色质浓缩。透射电镜下观察可见, LPC 组细胞体积缩小, 胞膜完整, 核染色质浓聚, 边集于核膜下, 呈帽状或新月状, 核仁消失, 核呈均质无结构状态。部分细胞浆中有大小不一、数量不等的空泡形成。

3 讨论

研究表明, α -LDL 被巨噬细胞大量摄取是动脉粥样硬化形成的始动因子之一; 另外, α -LDL 还具有细胞毒性作用直接损伤血管内皮细胞和平滑肌细胞; 具有化学趋化作用使单核巨噬细胞粘附于动脉内膜上, 而 α -LDL 的这些作用大多与其主要成分 LPC 有关。本研究在培养人脐静脉内皮细胞的基础上, 观察了 LPC 对内皮细胞 tPA、PAI-1 活性、一氧化氮合酶的活性及一氧化氮生成的影响, 结果发现, LPC 对内皮细胞呈浓度依赖性抑制 tPA、NOS 活性, 增加内皮细胞死亡率, 说明 LPC 对细胞有直接毒害作用; 同时它对内皮型一氧化氮合酶活性也有抑制作用。PRB 可转移并渗入细胞膜作为一种捕捉自由基的抗氧化剂对抗氧化压力, 因此对内皮细胞具有保护功能。本研究应用不同剂量的 PRB 后, 细胞上清液中乳酸脱氢酶活性及细胞死亡率降低; 同时内皮型一氧化氮合酶活性和 tPA 活性增加, 一氧化氮生成也相应增加, 说明 LPC 可能通过直接改变内皮型一氧化氮合酶结构而影响其活性, 普罗布考则可以保护内皮细胞免受 LPC 的毒性作用。

组织型纤溶酶原激活剂和 PAI-1 是纤溶系统中重要的生理活性物质。tPA 是纤溶系统的始动因子之一, 其功能是裂解纤维蛋白(原)为降解产物(FDP), 此外也水解诸多凝血因子。PAI-1 是其主要的抑制剂, 两者的平衡对维持血液纤溶系统功能正常十分重要。Beaudeux 等^[3]应用培养的人脐静脉内皮细胞, Dichtl 等^[4]应用培养的血管平滑肌细胞为模型, 均发现 LPC 可增加细胞 PAI-1 活性而降低 tPA 活性, 表明 LPC 对凝血系统有一定的促凝活性^[5], 于本研究结果一致。此外, 本研究发现 PRB 对内皮细胞进行预处理, 然后再加入 LPC 共同孵育, 可以使 tPA 活性增加, 而 PAI-1 活性和细胞死亡率降低, 且具浓度依赖性, 提示作为一种强有力的抗氧化剂, PRB 可保护内皮细胞免受 LPC 的毒性作用, 间接地起着抗栓作用。

[参考文献]

- [1] 庾勤慧, 黄红林, 谢志忠, 郑兴, 廖端芳. 金粉蕨素对溶血性磷脂酰胆碱损伤血管内皮依赖性舒张功能的保护作用及机制. 中国动脉硬化杂志, 9(1): 27-30
- [2] Brasen JH, Koenig K, Bach H, Kontush A, Heinle H, Witting PK, et al. Comparison of the effects of alpha-tocopherol, ubiquinone-10 and probucol at therapeutic doses on atherosclerosis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis*, 2002, 163: 249-259
- [3] Beaudeux JL, Therond P, Bonnefont RD, Gardes AM, Legrand A, Delattre J, et al. Comparison of the effects of O_2^- /HO free radical and copper ions-oxidized LDL or lipoprotein(a) on the endothelial cell releases of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. *Life Sci*, 2001, 69: 2371-382
- [4] Dichtl W, Stiko A, Eriksson P, Goncalves I, Calara F, Banfi C, et al. Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 3025-3032
- [5] Kugiyama K, Sakamoto T, Misumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, et al. Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells. *Circ Res*, 1993, 73: 335-343

(此文编辑 朱雯霞)