

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0097-03

•实验研究•

血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞内 Ca^{2+} 及线粒体膜电位的影响

朱庆均, 郑广娟, 张文高, 杨勇, 张丹, 王显刚, 季旭明

(山东中医药大学基础医学院, 山东省济南市 250014)

[关键词] 中药学; 血脂康对肝细胞内 Ca^{2+} 及线粒体膜电位的影响; 荧光染色; 细胞培养; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 线粒体膜电位; 钙离子

[摘要] 目的 观察血脂康胶囊对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞内 Ca^{2+} 浓度及线粒体膜电位的影响。方法 采用胶原酶消化法分离载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞, 体外原代培养 8 天后, 加入含 10% 血脂康血清的培养基, 48 h 后以 Flour 3/AM 和 JC-1 为探针, 应用激光共聚焦显微镜测量肝细胞内 Ca^{2+} 浓度和线粒体膜电位。结果 血脂康可明显降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞内 Ca^{2+} 浓度, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 同时, 血脂康可明显提高载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞线粒体膜电位 ($P < 0.05$)。结论 血脂康可降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞内 Ca^{2+} 浓度, 提高线粒体膜电位, 这可能是血脂康对抗高脂血症发生和发展的重要机制之一。

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

Effects of Xuezhikang on Ca^{2+} and Mitochondrial Membrane Potential in Hepatocytes of Apolipoprotein E Gene Knock Out Mice

ZHU Qing-Jun, ZHENG Guang-Juan, ZHANG Wen-Gao, YANG Yong, ZHANG Dan, WANG Xiarr-Gang, and JI Xu-Ming
(College of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Cell Culture; Hepatocyte; Mitochondrion Membrane Potential; Ca^{2+} ; Xuezhikang Capsule; Confocal Microscope; Apolipoprotein E Gene Knock Out Mice

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of Xuezhikang on Ca^{2+} concentration and mitochondrial membrane potential in hepatocytes of apolipoprotein E gene knock out mice. **Methods** The hepatocytes of ApoE^{-/-} mice were separated with collagenase and cultured in RPMI1640 with 10% fetal bovine serum for 8 days. Then the hepatocytes were incubated in culture medium with 10% Xuezhikang-containing rat serum for 48 hours. Finally, after stained with flour 3/AM and JC-1, the Ca^{2+} concentration and the mitochondrial membrane potential in hepatocytes were detected with laser scanning confocal microscope.

Results Xuezhikang could decrease Ca^{2+} concentration in hepatocytes and there was significant difference between Xuezhikang group and control group ($P < 0.01$). Xuezhikang could also improve mitochondrial membrane potential in hepatocytes ($P < 0.05$). **Conclusion** Xuezhikang can decrease the Ca^{2+} concentration and improve mitochondrial membrane potential in hepatocytes. This may be important mechanisms of Xuezhikang in anti hyperlipemia.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 结构和功能异常会导致脂蛋白代谢紊乱, 与动脉粥样硬化、冠心病及早发性痴呆的发病关系密切^[1]。肝脏与脂代谢的关系非常密切, 线粒体在肝脏的脂质氧化中起重要作用^[2], 线粒体尤其是线粒体活性氧体系 (reactive oxygen species, ROS) 与脂代谢和脂肪肝的发生密切相关^[3]。线粒体膜因脂质过氧化作用受损, 导致对 Ca^{2+} 的通透性增加, 线粒体膜电位下降。而

Ca^{2+} 作为细胞信号转导通路上的重要信使, 广泛参与细胞内的各种生理和代谢活动。血脂康胶囊有降脂和抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的作用, 本研究利用细胞培养技术在体外观察血脂康胶囊对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠肝细胞的线粒体膜电位和细胞内游离钙变化的影响, 以探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及含药血清的制备

健康 Wistar 大鼠 15 只, 均为雄性, 体重 180 ± 20 g, 普通饲料预饲 1 周, 随机分为 3 组, 每组 5 只。空白对照组给予生理盐水每天 4 mL/只; 洛伐他汀组给予洛伐他汀粉每天 2.48 mg/kg (临床等效剂量); 血脂康组给予血脂康胶囊 (北京北大维信生物科技

[收稿日期] 2005-05-06

[修回日期] 2005-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30472275) 和山东省自然科学基金资助项目 (Y2001C14)

[作者简介] 朱庆均, 硕士, 讲师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管病及肿瘤的分子生物学机制, E-mail 为 zhuqi@sdutcm.edu.cn。郑广娟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管病及肿瘤。张文高, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心脑血管病。

有限公司出品并提供) 每天 0.15 g/kg(临床等效剂量); 均给药 7 天, 末次给药 1 h 后麻醉, 无菌条件下于静脉取血 10 mL, 离心取血清, 56 °C 灭活 30 min, -20 °C 冷冻备用。

1.2 试剂

D-Hank's 液; 基础培养基为 RPMI1640 培养基, 内含碳酸氢钠 2 g、Hepes 粉(Sigma 公司) 2.38 g、10% 胎牛血清(杭州四季青公司) 和庆大霉素 50 kU/L。消化液: ①型胶原酶(Washington biochemical 公司), 200 kU/L, 用无血清 RPMI1640 配制; Fluor-3/AM 与 JC-1 购于 Molecular Probes, Inc。

1.3 原代载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠肝细胞单层培养

2 周龄载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠由北京大学医学院动物科技部提供。载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠颈椎脱臼处死, 在无菌条件下解剖取出肝脏, 在 D-Hank's 液中洗净血污, 剥除包膜及纤维成分, 将肝组织切成约 1 mm³ 小块, 用 D-Hank's 液漂洗 3 遍, 尽量去除残留血污, 加入肝组织体积 5 倍量的 ①型胶原酶, 4 °C 消化过夜, 然后去除消化液, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 用滴管吹打成细胞悬液, 经 200 目尼龙筛网过滤后用 D-Hank's 液洗 2 遍, 800 r/min 离心 4 min, 收集肝细胞, 台盼蓝活细胞计数 > 85%, 用基础培养基制备成 1.5 × 10⁸/L 密度细胞悬液, 在 48 孔培养板每孔中加入 0.5 mL 细胞悬液, 于 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.4 加药后形态学观察

原代培养 8 天后, 细胞进入对数生长期, 去除原培养基, 48 孔板中每个孔加入 0.5 mL 含 10% 不同含药大鼠血清的 RPMI1640 培养基, 每 1 组做 3 个复孔, 在倒置相差显微镜下进行形态学观察。

1.5 细胞内 Ca²⁺ 及线粒体膜电位检测

原代培养 8 天后, 细胞进入对数生长期, 去除原培养基, 48 孔板中每个孔加入 0.5 mL 含 10% 不同

含药大鼠血清的 RPMI1640 培养基, 每 1 组做 3 个复孔, 分别加入 10% 含药血清, 于 48 h 后应用 Fluor-3/AM 染色检测细胞内 Ca²⁺, 应用 JC-1 染色检测细胞内线粒体膜电位, 用共聚焦激光扫描显微镜观察, 计算机采集图像荧光值, 计算每百个细胞的平均荧光值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件, 两样本均数间差异用 *t* 检验, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学显著性。

2 结果

2.1 各组加药前后肝细胞形态学观察

各组加药前后肝细胞生长状态及数量均无明显变化。

2.2 各组肝细胞内 Ca²⁺ 水平的比较

结果发现, 培养的肝细胞在加药 48 h 后, 给药各组与生理盐水组比较, 肝细胞内钙的荧光强度均明显下降, 血脂康组优于洛伐他汀组(表 1)。

表 1. 各组加药 48 h 后肝细胞内 Ca²⁺ Fluor-3/AM 荧光值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	图像	荧光值/图	细胞数/图	荧光值 (100 个细胞)
生理盐水组	5	7.98 ± 2.73	147.6 ± 54.37	5.46 ± 0.57
洛伐他汀组	5	6.07 ± 2.52	148.5 ± 91.83	4.31 ± 0.87 ^a
血脂康组	5	5.44 ± 4.13	193.0 ± 67.77	2.77 ± 1.96 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与生理盐水组比较。

2.3 各组肝细胞线粒体膜电位的比较

结果发现, 培养的肝细胞在加药 48 h 后, 各给药组与生理盐水组比较, 肝细胞内线粒体膜电位 JC-1 红色荧光/绿色荧光强度比值均明显升高 ($P < 0.05$)(表 2)。

表 2. 各组加药 48 h 肝细胞内线粒体膜电位 JC-1 红色荧光/绿色荧光比值的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	图像	细胞数/图	红色荧光值/图	绿色荧光值/图	红/绿荧光比值(100 个细胞)
生理盐水组	5	299.0 ± 109.3	17.03 ± 10.68	8.58 ± 8.12	0.95 ± 0.58
洛伐他汀组	5	243.5 ± 45.9	13.20 ± 5.72	3.43 ± 1.52	1.63 ± 0.35 ^a
血脂康组	5	147.3 ± 55	23.48 ± 4.15	12.05 ± 5.17	1.51 ± 0.14 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与生理盐水组比较。

3 讨论

血脂康是我国自行研发的, 以洛伐他汀含量为

质量标准的降脂中成药制剂, 其主要组分为特制降脂红曲, 红曲中含有莫纳可林(Monacolin) 系列物质和黄酮酚等天然的抗氧化剂, 具有抑制脂质过氧化

和防治动脉粥样硬化的作用^[4]。实验研究发现红曲能减轻高脂鹌鹑肝脏的脂肪变性,还能降低高脂家兔的血脂,减轻动脉粥样硬化^[5]。以红曲为主要成分的血脂康可对抗载脂蛋白 E 敲除引发的高血脂动脉粥样硬化^[6]。临床研究显示,血脂康能够降低高血脂患者血中总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平,具有抗氧化和改善肱动脉内皮依赖性舒张功能的作用^[7]。

我们研究发现,原代培养 8 天的肝细胞分别加入生理盐水、洛伐他汀和血脂康含药大鼠血清干预 48 h 后,洛伐他汀组和血脂康组肝细胞内钙的荧光强度均明显下降,说明血脂康及洛伐他汀均可降低载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠肝细胞内的钙负荷,从而促进线粒体氧化磷酸化,促进能量代谢,减少细胞内氧自由基的产生,同时减少了由于钙超载而引起的线粒体膜通透性转换孔(PTP)的通透性改变,维持线粒体正常膜电位,保护肝细胞的功能。且血脂康的作用明显优于洛伐他汀。其作用机制可能为血脂康的活血祛瘀化浊之功,使肝细胞内蕴藏的瘀血浊毒得以疏布排泄于外,从而使其形态结构的损害尤其是膜损害得以修复,膜通道正常开放,减轻细胞内的钙负荷,以恢复细胞内外的钙平衡。

原代培养 8 天的肝细胞分别加入生理盐水、洛伐他汀和血脂康含药大鼠血清干预 48 h 后,洛伐他汀组和血脂康组 JC-1 红色荧光/绿色荧光强度比值均明显升高,说明血脂康及洛伐他汀均可升高载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠肝细胞内线粒体膜电位,促进肝细胞

线粒体膜的去极化,从而增强线粒体的功能,促进肝细胞的代谢,以利于降低血脂,其作用机制可能为血脂康的活血祛瘀化浊之功,使肝细胞内蕴藏的瘀血浊毒得以疏布排泄于外,遏制了线粒体损伤与 ROS 增加形成的恶性循环,从而使其形态结构的损害尤其是线粒体的损害得以修复,膜电位得以恢复,膜通道正常开放,线粒体的功能得到改善,从而促进脂代谢,以对抗高脂血症的发生和发展。

综上所述,血脂康可以通过降低肝细胞内 Ca²⁺ 浓度,促进线粒体氧化磷酸化,减少细胞内氧自由基的产生,同时促进肝细胞线粒体膜去极化,保护线粒体功能,从而提高肝细胞对脂类的代谢,以对抗高脂血症的发生和发展。

[参考文献]

- [1] 陈定章. 载脂蛋白 E 基因多态性与心血管疾病的关系[J]. 心功能杂志, 1999, 11 (2): 109-110
- [2] 樊丽琳, 陈东风, 赵春艳. 线粒体与非酒精性脂肪肝[J]. 现代医药卫生, 2003, 19 (5): 541-542
- [3] 周作荣, 彭向欣. 线粒体反应氧体系与脂肪肝[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11 (2): 123-124
- [4] 王银叶, 韦薇, 李长龄. 特种红曲对鹌鹑实验性脂肪肝的治疗作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2002, 7 (4): 293-295
- [5] 余艳辉, 瞿湘萍, 李智, 郭兆贵. 云南红曲粉调血脂作用及抗动脉粥样斑块形成作用[J]. 中国药理学通报, 2000, 16 (5): 587-588
- [6] 郑广娟, 张文高, 张亚同, 张云凤, 马学盛. 血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (5): 408-410
- [7] 程训民, 余宗梅, 骆合德, 邱一华, 陈敏雄. 血脂康对高血脂患者血管内皮功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (3): 235-237

(此文编辑 朱雯霞)