

纳米细菌对人脐静脉内皮细胞的损伤及超氧化物歧化酶分泌的影响

王佑权¹, 刘国文¹, 黄果¹, 胡野荣², 李永国³

(1. 南华大学附属第二医院肿瘤外科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中南大学湘雅医学院附属第二医院心胸外科实验室, 湖南省长沙市 410008; 3. 湖南旺旺医院肝胆外科, 湖南省长沙市 410016)

[关键词] 纳米细菌; 人脐静脉内皮细胞; 乳酸脱氢酶; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨纳米细菌对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的损伤及超氧化物歧化酶(SOD)分泌的影响。**方法** 用含有不同浓度纳米细菌的培养液培养 HUVEC, 采用四甲基偶氮唑盐法检测细胞活力; 用浓度为 0.5 Mcfarland 纳米细菌攻击 HUVEC, 分别于 0、6、12、24、48、72 h 检测培养液上清中乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和 SOD 水平。**结果** 与对照组比较, 纳米细菌(吸光度值为 0.001、0.005 和 0.02)处理 HUVEC CRL2480 细胞 48、72 h 后, 细胞活力显著降低($P < 0.05$); 与对照组比较, 纳米细菌处理组细胞培养液中 LDH 和 SOD 浓度显著增高($P < 0.05$), 而 MDA 含量无显著变化($P > 0.05$)。**结论** 纳米细菌能损伤 HUVEC, 同时增加 HUVEC 中 SOD 活性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Nanobacteria on the Injury of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and the Secretion of Superoxide Dismutase

WANG You-Quan¹, LIU Guo-Wen¹, HUANG Guo¹, HU Ye-Rong², and LI Yong-Guo³

(1. Surgical Oncology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Laboratory of Cardiothoracic Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 3. Hepatobiliary Surgery, Hunan Wangwang Hospital, Changsha, Hunan 410016, China)

[KEY WORDS] Nanobacteria; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Lactate Dehydrogenase; Malondialdehyde; Superoxide Dismutase; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of nanobacteria on the injury of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and the secretion of superoxide dismutase (SOD). **Methods** HUVECs were treated with the different concentration nanobacteria, and the cell viability was tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) analysis. HUVECs were attacked with a concentration of 0.5 Mcfarland of nanobacteria. The lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and SOD levels were detected in the supernatant of culture medium at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively.

Results Compared with the control group, the cell viabilities were significantly decreased by treatment with nanobacteria (the absorbance values were 0.001, 0.005 and 0.02) for 48 and 72 h ($P < 0.05$). Compared with the control group, the concentrations of LDH and SOD in cell culture solution were significantly increased in nanobacteria treatment group ($P < 0.05$), while the content of MDA was not significantly changed ($P > 0.05$). **Conclusion** Nanobacteria can injure HUVEC, and increase the activity of SOD in HUVEC.

感染因素在动脉粥样硬化的发生发展过程中起着重要的作用, 肺炎衣原体、幽门螺旋杆菌、巨细胞病毒、立克次体等多种微生物感染被认为与动脉

粥样硬化有关^[1-3]。纳米细菌是目前发现的唯一具有矿化功能的微生物, 同时在动脉粥样斑块中也发现纳米细菌的存在^[4]。采用可以杀灭纳米细菌的

[收稿日期] 2016-04-08

[修回日期] 2016-08-03

[基金项目] 教育部重大项目基金(教技司[2001]171); 湖南省教育厅项目(08C733)

[作者简介] 王佑权, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为肿瘤外科, E-mail 为 youqw@163.com。通讯作者刘国文, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为肿瘤外科, E-mail 为 lgw8318@aliyun.com。黄果, 硕士研究生, 医师, 研究方向为肿瘤外科, E-mail 为 cos19880303@163.com。

特殊配制的抗生素对动脉粥样硬化患者进行治疗,取得了一定的临床疗效^[5-6]。血管内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化的始动环节^[7-8],因此本研究拟用纳米细菌处理体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),观察纳米细菌对内皮细胞的损伤及自由基水平的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

纳米细菌单克隆抗体(芬兰 Kajander 教授惠赠),高糖 DMEM(Gibco,美国),胎牛血清和兔血清(天津 TBD),胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma,美国),酶标仪(Ladysystems Dragon,芬兰),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 纳米细菌的培养

纳米细菌菌株 Se90 由芬兰 Kajander 教授惠赠。取纳米细菌 Se90 菌液 1 mL,加入 9 mL 含 10%胎牛血清培养基,置于带滤膜瓶盖的培养瓶中,然后放入培养箱中进行培养,培养箱设置为 37℃、5%CO₂和 95%空气,培养 3~4 周,培养箱的托盆的蒸馏水中按照 5:1 的比例加入 0.1%新洁尔灭。常规每周在光镜下观察细菌生长情况及有无污染出现,将可疑污染者剔除。

1.3 纳米细菌的鉴定

取培养 4 周后的纳米细菌菌液 0.5 mL,常温离心,转速 13200 r/min,时间 5 min,吸除上清液,沉淀物用 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 2 次,弃上清液,将沉淀用少量 PBS 稀释后涂片,防尘自然风干,75℃烤箱烤 10 min,4℃冰箱保存。将细菌涂片用 250 μL PBS 湿化 5 min,吸干水分,用 150 μL 3%的脱脂奶粉液封片 10 min,阳性片加 150 μL 一抗应用液,阴性片加 150 μL 一抗稀释液,防尘保存 1 h,吸干,250 μL PBS 洗 3 次,每次 3 min,吸干,转入暗室操作,加二抗应用液 150 μL,染色 30 min,吸干, PBS 洗 3 次,在蒸馏水中漂洗 5 s,滤纸吸干,荧光显微镜观察。在紫外光(ultraviolet ray, UV)下找到观察平面,然后转到激发波长下,发绿色荧光即为纳米细菌,在观察到纳米细菌荧光后,取同一视野分别在 UV 光和荧光下用数码相机拍片。

1.4 纳米细菌浓度的测定

取培养后收获的纳米细菌,用完全培养基稀释后,分别按照每孔 200 μL 加入 96 孔板,然后成倍数稀释,以不含纳米细菌的完全培养基调零,用酶联免疫吸附法在 650 nm 波长下测吸光度(absorbance, A)值,每种浓度测定 6 孔,其平均值为不同浓度时的 A 值,根据测出的值再调整稀释倍数直到最后得出所需浓度的稀释倍数。A 值为 0.02 时其细菌浓度定为 0.5 Mcfarland。

1.5 HUVEC 株 CRL2480 的培养

将复苏的 CRL2480 细胞接种至含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,然后转入培养箱中进行培养,培养箱设置为 37℃、5%CO₂和 95%空气,培养过程中需每日显微镜下观察细胞生长情况,每 2 天换液 1 次。当细胞汇合至 80%时进行传代。

1.6 MTT 比色试验

将 CRL2480 细胞接种 96 孔板,培养 24 h,使细胞进入对数生长期,然后加入 A 值分别为 0.001、0.005 和 0.02 含纳米细菌的培养基继续培养 48、72 h。在培养板中每孔加 MTT 溶液(5 g/L)20 μL,37℃继续培养 4 h,终止培养,小心弃去孔内培养上清液。每孔加入二甲基亚砷 150 μL,振荡 10 min 至 MTT 完全溶解。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔 A 值。对照组为不含纳米细菌的培养液。

1.7 细胞培养液上清中 LDH、MDA 和 SOD 水平检测

细胞消化后按照 4000 个/孔接种 96 孔板,24 h 后加入含 0.5 Mcfarland 细菌浓度(波长为 650 nm 时 A 值为 0.02)的完全培养基 200 μL,分别于 0、6、12、24、48、72 h 吸取孔内培养液,收集于 Ep 管中,0 h 设为对照组。按试剂盒说明分别检测细胞培养液上清中 LDH、MDA 和 SOD 水平。

1.8 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用方差分析及 *t* 检验,用 SPSS 18.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米细菌的单克隆抗体荧光染色鉴定结果

免疫荧光染色结果显示:在 UV 光下可以看到灰色背景下有些白色或浅色的不规则光点,这些光点是一些杂质和涂片的小缺损,同一视野阴性片被激发后未见荧光颗粒,阳性片可以见到黑色背景下

许多的绿色亮点,即为纳米细菌(图 1)。

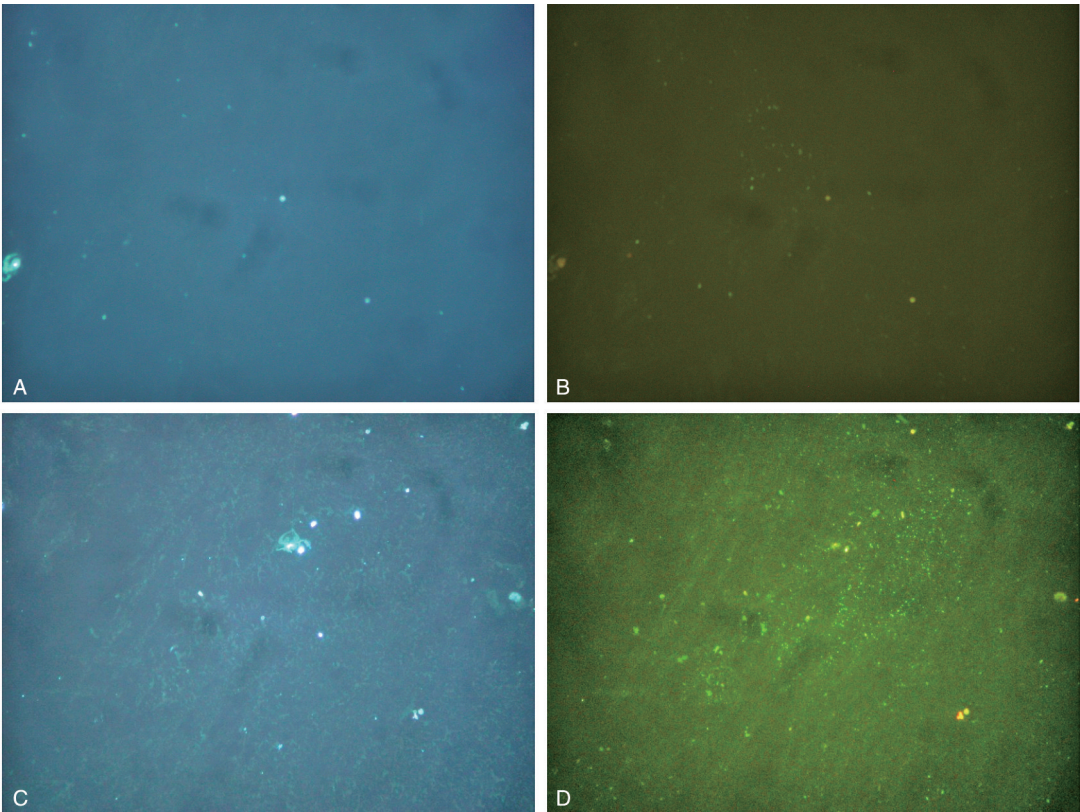


图 1. 纳米细菌荧光染色鉴定结果(40×10) A 为 UV 光下纳米细菌阴性片,B 为相同视野荧光片;C 为 UV 光下纳米细菌阳性片,D 为相同视野荧光片。

Figure 1. The identification results of nanobacteria by fluorescence staining (40×10)

2.2 纳米细菌对 CRL2480 细胞活力的影响

与对照组比较,纳米细菌(A 值为 0.005 和 0.02)处理 CRL2480 细胞 48 h 后,细胞活力显著降低(均 $P<0.05$);纳米细菌(A 值为 0.02)处理 CRL2480 细胞 72 h 后,细胞活力与对照组比较显著降低($P<0.05$;表 1)。

表 1. 纳米细菌对 CRL2480 细胞活力的影响($n=5$)
Table 1. The effect of nanobacteria on the viability of CRL2480 cells ($n=5$)

分 组	A 值	
	48 h	72 h
对照组	0.56±0.07	1.10±0.15
纳米细菌(0.001)组	0.53±0.04	1.10±0.06
纳米细菌(0.005)组	0.49±0.03 ^a	1.01±0.04
纳米细菌(0.02)组	0.43±0.05 ^a	0.67±0.12 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

2.3 纳米细菌对 CRL2480 细胞培养液中 LDH、MDA 和 SOD 水平的影响

LDH 为细胞内酶,当细胞受损后释放到细胞外,它是监测细胞受损程度的一项重要指标。结果显示:随时间延长,细胞培养液中 LDH 活性水平逐渐升高,与对照组比较,差异具有显著性(均 $P<0.05$;表 2)。MDA 作为过氧化脂质的一种重要分解产物,常被作为脂质过氧化程度的检测指标。结果显示纳米细菌 Se90 处理 HUVEC CRL2480 不同时间后,培养液中 MDA 含量在各时间点差异无显著性(均 $P>0.05$;表 2)。SOD 属于金属酶,主要功能是催化超氧阴离子的歧化反应,目前被看作为活性氧防御的第一线。结果显示:随处理时间的延长,细胞培养液中 SOD 的浓度逐渐升高,与对照组比较,差异具有显著性(均 $P<0.05$;表 2)。

表 2. 纳米细菌对 CRL2480 细胞培养液中 LDH、MDA 和 SOD 水平的影响

Table 2. The effect of nanobacteria on the level of LDH, MDA and SOD in CRL2480 cells culture fluid

分 组	LDH(U/L)	MDA(μmol/L)	SOD(kU/L)
对照组	106.77±4.77	4.90±0.50	22.24±0.99
6 h 组	243.39±10.22 ^a	5.90±0.60	24.52±0.81
12 h 组	326.60±6.98 ^a	6.00±0.73	26.74±1.19 ^a
24 h 组	428.87±12.87 ^a	5.10±1.15	28.37±0.35 ^a
48 h 组	602.23±15.64 ^a	5.30±0.89	30.82±0.47 ^a
72 h 组	723.98±9.93 ^a	5.90±1.05	34.68±1.09 ^a

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

动脉粥样硬化的病因和致病机制一直是医学界研究的热点,但其确切机制目前仍未阐明。动脉粥样硬化炎症假说自提出以来,逐渐成为当前的主要学说,该学说认为动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,是起屏障作用的内皮受到损伤,这是病灶形成的始动环节。研究炎症的始动因素时认为微生物感染在其中扮演了重要的角色。这些可疑的感染因子的研究现大都集中在肺炎衣原体、幽门螺旋杆菌、多种病毒及最近发现的纳米细菌。以前的那些微生物不能解释动脉硬化斑块中钙化形成,所以最近发现的纳米细菌因其特殊的矿化功能而得到人们的重视。

纳米细菌是 1988 年芬兰科学家 Kajander 等进行哺乳动物细胞培养时发现的^[9]。纳米细菌是一种革兰阴性菌,呈球状或球杆状,细胞壁厚,无荚膜与鞭毛结构,体积极小,约 50~500 nm,可通过 0.1~0.4 μm 的滤菌膜,通过电子显微镜和其他的高分辨率显微镜可发现^[10]。纳米细菌具有独特的矿化能力,在 pH 7.4 和生理性钙磷浓度中能形成羟磷灰石碳酸盐结晶,从而形成坚硬的矿化圆顶外壳覆盖于菌体周围,使其在高温强酸等许多微生物难以生存条件下仍然能够存活。由于这种特性纳米细菌成了众多学者的研究热点,并认为它与动脉粥样斑块、乳腺肿瘤钙化、泌尿系统结石等许多硬化性疾病有关^[11-13]。有学者^[14]已经在患者的动脉粥样斑块中发现纳米细菌。Maniscalco 等^[15]使用复方依地酸钙钠(一种体外使用证明对纳米细菌有效的制剂)来治疗已经确诊的冠心病病人,经过 4 个月治疗,44 例纳米细菌血清抗原检测阳性者冠状动脉钙化计分明显下降,与实验初比较,平均下降 14%(P

$=0.001$);33 例阴性者冠状动脉钙化计分没变化或升高;19 例有心绞痛的患者中 16 例症状减轻或完全稳定^[15]。以上研究说明纳米细菌与动脉粥样硬化有密切的关系。

本实验的结果显示,纳米细菌处理 HUVEC CRL2480 细胞 48、72 h 后,与对照组比较细胞活力显著降低($P<0.05$);该项结果说明:一定浓度的纳米细菌对体外培养的 HUVEC CRL2480 细胞生长活力有明显的抑制作用。为进一步证实纳米细菌能对血管内皮细胞造成损伤,实验中还检测了 LDH,结果显示:随时间延长,细胞培养液中 LDH 活性水平逐渐升高,与对照组比较,差异具有显著性(均 $P<0.05$)。LDH 是胞浆标志酶,在细胞膜受损后被释放到细胞外,因此细胞外的 LDH 活性的变化可以反映细胞膜受损的程度,在观测细胞损伤时 LDH 成为一常用敏感指标。以上两项结果可以证实:纳米细菌能对血管内皮细胞造成损伤。而现代研究认为血管内皮受损、血管内皮功能减退是促发动脉粥样硬化发生发展的最重要的始动因素;这主要与内皮细胞损伤后,分泌内皮素、血管紧张素 II 等物质及促血栓形成有关^[16-17]。

自由基损伤目前被认为是组织损伤的主要分子机制之一^[18]。人体内氧自由基的生成导致膜脂质发生过氧化损伤,生成大量 MDA,使细胞进一步遭到损害。MDA 是体内重要的脂质自由基,为不饱和脂肪酸代谢产物,毒性强,可通过一系列手段造成细胞损伤。在纳米细菌对内皮细胞的损伤过程中,如果有氧自由基的损伤参与,作为氧自由基对组织细胞损伤过程中的中间产物 MDA 必然会升高^[19]。然而本实验的结果显示:HUVEC 在纳米细菌处理后,其 6、12、24、48、72 h 上清液中 MDA 含量与对照组(0 h)比较无显著性差异。提示氧自由基可能并未参与纳米细菌对体外培养的 HUVEC CRL2480 的损伤过程。

在研究氧自由基时,不可避免地要考虑到对其防御。因为需氧生物离不开氧,也就不得不面对活性氧的威胁和损伤,因此,需氧生物都具备各自的抗氧化防御机制。SOD 属于金属酶,主要功能是催化超氧阴离子的歧化反应,目前被看作为活性氧防御的第一线^[20]。自从 1969 年 SOD 被发现以来对其理化特性、催化机制等已进行了广泛而深入的研究。SOD 是机体内存在的一类抗氧化酶,组织细胞在外来不良刺激时活性可升高,其功能是清除细胞生命活动中产生的超氧离子^[21]。通过 SOD 的检测发现:随处理时间的延长,细胞培养液中 SOD 的浓

度逐渐升高,与对照组比较,差异具有显著性($P < 0.05$)。说明 HUVEC CRL2480 在受到纳米细菌 Se90 攻击时,内皮细胞可能启动自身防御机制分泌了 SOD 来抵御外来损伤。SOD 是用来清除氧自由基的,在对抗氧自由基的同时自身被消耗,所以在有氧自由基参与细胞损伤时 SOD 浓度呈下降趋势;由此推论在纳米细菌损伤内皮细胞的过程中,可能只有很少量的氧自由基参与,甚至没有氧自由基的参与。综合 MDA 和 SOD 的变化,可以认为:在纳米细菌损伤 HUVEC 的时候可能没有氧自由基的参与,但可能增加了内皮细胞分泌具有自身保护功能的 SOD。

总之,纳米细菌可损伤 HUVEC,同时促进了内皮细胞中具有自身保护功能的 SOD 的分泌。

[参考文献]

- [1] Grayston JT, Belland RJ, Byrne GI, et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* as a cause of coronary heart disease: the hypothesis is still untested[J]. *Pathog Dis*, 2015, 73(1): 1-9.
- [2] Karbasi-Afshar R, Khedmat H, Izadi M. *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis: a systematic review[J]. *Acta Med Iran*, 2015, 53(2): 78-88.
- [3] Rabczyński M, Fiodorenko-Dumas, Mastej K, et al. A relationship between serological markers of chronic *C pneumoniae* and CMV infection and hsp60 in patients with atherosclerotic carotid stenosis[J]. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62(1): 89-95.
- [4] Hunter LW, Charlesworth JE, Yu S, et al. Calcifying nanoparticles promote mineralization in vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 2 689-698.
- [5] Karagkiozaki V, Logothetidis S, Pappa AM. Nanomedicine for atherosclerosis: Molecular imaging and treatment[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(2): 191-210.
- [6] Eby G. Is gallium nitrate an effective kidney stone, calcified uterine fibroid, atherosclerosis and cataract anti-nanobacteria treatment--A case history and hypothesis[J]. *Med Hypotheses*, 2010, 74(2): 393-394.
- [7] Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [8] Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, et al. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7): 1 231-244.
- [9] Kutikhin AG, Brusina EB, Yuzhalin AE. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(1): 339-350.
- [10] Guo Y, Zhang D, Lu H, et al. Association between calcifying nanoparticles and placental calcification[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7(1): 1 679-686.
- [11] Fredman G, Kamaly N, Spolitu S. Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(275): 1-19.
- [12] 李涛, 潘晓燕, 陈海鸣, 等. 乳腺肿瘤微钙化与纳米细菌的关系[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(8): 896-898.
- [13] Abrol N, Panda A, Kekre NS, et al. Nanobacteria in the pathogenesis of urolithiasis: Myth or reality? [J]. *Indian J Urol*, 2015, 31(1): 3-7.
- [14] Sinha A, Shaporev A, Nosoudi N, et al. Nanoparticle targeting to diseased vasculature for imaging and therapy[J]. *Nanomedicine*, 2014, 10(5): 1 003-012.
- [15] Maniscalco BS, Taylor KA. Calcification in coronary artery disease can be reversed by EDTA-tetracycline long-term chemotherapy [J]. *Pathophysiology*, 2004, 11(2): 95-101.
- [16] Cheng SL, Shao JS, Behrmann A, et al. Dkk1 and MSX2-wnt7b signaling reciprocally regulate the endothelial-mesenchymal transition in aortic endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1 679-689.
- [17] Ikhaphoh IA, Pelham CJ, Agrawal DK. Synergistic effect of angiotensin II on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 4.
- [18] Storr SJ, Woolston CM, Zhang Y, et al. Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(18): 2 399-408.
- [19] Swaminathan K, Clemens DL, Dey A. Inhibition of CYP2E1 leads to decreased malondialdehyde-acetaldehyde adduct formation in VL-17A cells under chronic alcohol exposure[J]. *Life Sci*, 2013, 92(6-7): 325-336.
- [20] Liu N, Wang LH, Guo LL, et al. Chronic restraint stress inhibits hair growth via substance P mediated by reactive oxygen species in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1-11.
- [21] Singer G, Stokes KY, Neil Granger D. Reactive oxygen and nitrogen species in sepsis-induced hepatic microvascular dysfunction[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(2): 155-164.

(此文编辑 曾学清)