

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0225-03

• 实验研究 •

# 维生素 C 对脂质过氧化损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用

张泉三, 董果雄, 张社华

(青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003)

[主题词] 脂质过氧化物; 维生素 C; 内皮细胞; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 乳酸脱氢酶

[摘要] 为探讨维生素 C 对脂质过氧化损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用及其可能的分子作用机制, 在铜离子诱发的低密度脂蛋白氧化修饰的基础上, 造成内皮细胞的脂质过氧化损伤模型, 测定细胞上清液中和细胞内乳酸脱氢酶的活性及其乙酰胆碱诱发的内皮型一氧化氮合酶活性及一氧化氮的生成量。结果发现, 脂质过氧化物明显增加上清液中乳酸脱氢酶活性 ( $P < 0.01$ ), 增加细胞死亡率 ( $P < 0.01$ ); 同时它也抑制内皮型一氧化氮合酶的活性 ( $P < 0.01$ ), 具有剂量-依赖效应。应用不同剂量的维生素 C (浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, 该效应明显减弱; 内皮型一氧化氮合酶活性与一氧化氮生成量之间呈正相关,  $r$  值分别为 0.9844 ( $P < 0.01$ ) 和 0.8802 ( $P < 0.05$ )。由此提示, 脂质过氧化物能直接损伤内皮细胞, 抑制内皮型一氧化氮合酶活性; 维生素 C 对脂质过氧化损伤有保护作用。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

## Protective Effects of Vitamin C on the Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell Injured by Lipid Peroxidation

ZHANG Quarr San, DONG Guo Xiong, and ZHANG She Hua

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[MeSH] Lipid Peroxides; Vitamin C; Endothelial Cells; Nitric Oxide Synthase; Nitric Oxide; Lactate Dihydrogenase

[ABSTRACT] **Aim** To explore the protective effect of Vitamin C on the human umbilical vein endothelial cell (hUVECs) injured by lipid peroxidation and its probable mechanism. **Methods** Confluent hUVECs were incubated with Vitamin C for 24 h and consequently exposed to lipid peroxides induced by high concentration of Copper ions. Lactate dihydrogenase (LDH) activity was measured in cell medium and lysate. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and nitric oxide (NO) production induced by acetylcholine were assessed by endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide kits. **Results** Lipid peroxides enhanced markedly LDH activity and decreased nitric oxide bioavailability via the inhibited eNOS activity ( $P < 0.01$ ). These effects were attenuated by administration of different dose Vitamin C (100  $\mu\text{mol/L}$ , 300  $\mu\text{mol/L}$ ); the correlation between eNOS activity and NO production was significant ( $r = 0.9844$ ,  $P < 0.01$ ;  $r = 0.8802$ ,  $P < 0.05$ , respectively). **Conclusions** Lipid peroxides could injury hUVECs and inhibit eNOS activity directly. Vitamin C might play a protective role in hUVECs injured by lipid peroxidation.

近年来研究证明, 血管内皮细胞损伤是发生多种心血管疾病的共同病理生理改变, 是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 发生的重要环节。尽管损伤内皮细胞的因素较多, 但脂质过氧化损伤在动脉粥样硬化中的作用已倍受人们的关注。本研究是在铜离子诱发的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 氧化修饰的基础上, 造成内皮细胞的脂质过氧化损伤模型, 观察不同浓度的维生素 C 对细胞上清液中和细胞内乳酸脱氢酶(lactate dihydrogenase, LDH) 的活性及其乙酰胆碱诱发的内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 活性及

一氧化氮(nitric oxide, NO) 生成量的影响, 以期探讨维生素 C 对脂质过氧化损伤人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVECs) 的保护作用及其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

低密度脂蛋白(购自中国协和医科大学生物化学实验室); 小牛血清, DMEM 培养基(Hyclone 公司); 胰蛋白酶(GIBCO 公司); 一氧化氮合酶测试盒, 一氧化氮测试盒, 低密度脂蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所); 乙酰胆碱和维生素 C(均为国产试剂)。VU-260 紫外分光光度计(日本津岛公司); 可调微量移液器(法国 Gilson 公司); 恒温培养箱, 细

[收稿日期] 2001-10-16 [修回日期] 2002-04-20

[作者简介] 张泉三, 男, 1966 年出生, 主治医师, 硕士研究生, 研究方向主要为动脉粥样硬化发病机制的研究。董果雄, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

胞粉碎仪和超净工作台等(均为国产仪器)。

## 1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰及鉴定

将正常低密度脂蛋白放入 0.01 mol/L PBS 中透析,以去除离心制备过程中所加的抗氧化剂;然后用 PBS 溶液将低密度脂蛋白稀释至蛋白浓度为 0.5 g/L;加入新鲜配制的含 10  $\mu$ mol/L 硫酸铜的 PBS 中 37℃氧化 12 h;然后在 4℃含 100 mg/L EDTA 的 PBS 中透析 24 h,以终止氧化修饰反应。将制好的 ox-LDL 以 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌,置 4℃保存备用。低密度脂蛋白氧化修饰程度用硫代巴比妥酸反应物质的含量来鉴定。经测定,氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)产生的丙二醛是低密度脂蛋白的 4.1 倍。

## 1.3 人脐静脉内皮细胞株的培养

人脐静脉内皮细胞株购自北京医科大学肿瘤防治研究所。用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液在 37℃培养箱内培养 3~5 天,待细胞融合后,用 0.05% 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,加入培养液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  $3 \times 10^8$  个细胞/L 接种于 24 孔板上培养。待细胞融合后,换用无血清无酚红 DMEM 培养液,然后即可进行试验。

## 1.4 实验分组

实验共分为 3 组。对照组;④ox-LDL 组:根据 ox-LDL 浓度(25 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L)不同分为 3 个亚组;④维生素 C 组:根据维生素 C 浓度(0  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L 和 300  $\mu$ mol/L)不同分为 3 个亚组,在每个亚组中先加入维生素 C 预处理 24 h,然后再加入 50 mg/L 的 ox-LDL。

以上各组在测试前 1 h 均加入 1  $\mu$ mol/L 的乙酰胆碱。

## 1.5 一氧化氮的测定

亚硝酸/硝酸根离子为一氧化氮的稳定代谢产物,已经被证实为指示一氧化氮产生水平的优良指标。分别收集各组细胞培养液,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。

## 1.6 一氧化氮合酶活性的测定

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:每毫升培养液中每分钟生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。操作按说明书进行。

## 1.7 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=培养液 LDH 活性÷(细胞内 LDH 活性+培养液 LDH 活性)×100%。

## 1.8 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。相关性采用直线回归分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 氧化型低密度脂蛋白对乳酸脱氢酶活性以及细胞死亡率的影响

应用不同浓度的 ox-LDL 作用于人脐静脉内皮细胞 24 h 后,细胞培养液中 LDH 活性以及细胞死亡率明显增加( $P < 0.01$ ),呈剂量-一依赖效应(表 1, Table 1)。由此说明随着 ox-LDL 浓度的增加,内皮细胞损伤逐渐加重。

## 2.2 氧化型低密度脂蛋白对内皮型一氧化氮合酶活性和一氧化氮生成量的影响

从表 1 (Table 1) 中可以看出应用不同浓度的氧化型低密度脂蛋白(25、50 和 100 mg/L)作用于人脐静脉内皮细胞 24 h 后,随着 ox-LDL 浓度的增加,eNOS 活性逐渐减弱( $P < 0.01$ ),NO 含量逐渐减少( $P < 0.01$ )。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白对一氧化氮、内皮型一氧化氮合酶活性、乳酸脱氢酶活性以及细胞死亡率的影响。

Table 1. Effects of different doses of ox-LDL on NO production, eNOS activity, LDH activity, and mortality of hUVECs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ).

Groups	eNOS( $10^3$ u/L)	NO( $\mu$ mol/L)	LDH( u/L)	Mortality( % )
Control	93.4 $\pm$ 6.8	107.2 $\pm$ 9.3	59 $\pm$ 7.2	7.3 $\pm$ 0.2
ox-LDL <sub>25</sub>	78.0 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	92.7 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	8.9 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
ox-LDL <sub>50</sub>	59.9 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	81.8 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	99 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>
ox-LDL <sub>100</sub>	42.8 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	53.6 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	129 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 2.3 维生素 C 对内皮型一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量、乳酸脱氢酶活性和细胞死亡率的影响

从表 2 (Table 2) 可见,用不同浓度的维生素 C 对内皮细胞进行预处理 24 h,然后再加入 ox-LDL(50 mg/L) 共同孵育,结果发现应用维生素 C 后,eNOS 活性及一氧化氮生成量增加,二者呈正相关, $r$  值分别为 0.9844( $P < 0.01$ ) 和 0.8802 ( $P < 0.05$ );而 LDH 活性和细胞死亡率降低,且随着 L-抗坏血酸浓度的

增加, 该效应增强( $P < 0.05$ )。

表 2. 维生素 C 对内皮型一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量、乳酸脱氢酶活性和细胞死亡率的影响。

Table 2. Effects of different doses of Vitamin C on eNOS activity, NO production, LDH activity, and mortality of hUVECs ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ ).

Groups	eNOS( $10^3$ u/L)	NO( $\mu$ mol/L)	LDH( u/L)	Mortality( % )
VitC <sub>0</sub>	42.8 $\pm$ 5.4	53.6 $\pm$ 4.5	99.2 $\pm$ 8.9	10.8 $\pm$ 1.3
VitC <sub>100</sub>	75.8 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>	94.5 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	77.5 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>
VitC <sub>300</sub>	82.4 $\pm$ 4.4 <sup>ac</sup>	102.8 $\pm$ 7.8 <sup>ac</sup>	84.7 $\pm$ 5.3 <sup>ac</sup>	9.0 $\pm$ 1.3 <sup>ac</sup>

a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , compared with VitC<sub>0</sub> group; c:  $P < 0.05$ , compared with VitC<sub>100</sub> group.

### 3 讨论

在高浓度铜离子的作用下, 低密度脂蛋白发生氧化修饰而生成大量的脂质过氧化物。已证明脂质过氧化物在动脉粥样硬化的发生发展过程中起着重要的作用。尽管其详细机制不清, 但至少与以下有关: 氧化型低密度脂蛋白及其代谢产物对内皮细胞有直接毒害作用, 从而改变其形态结构而破坏其完整性; ④能直接或间接地调节一氧化氮的生物活性<sup>[1]</sup>。近来研究发现, 氧化型低密度脂蛋白与存在于内皮细胞上的特异性受体(血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体, LOX-1)结合, 激活第二信息途径而产生一系列生物学效应<sup>[2,3]</sup>, 其中氧化型低密度脂蛋白引起细胞内游离钙升高是造成细胞损伤的主要机制之一; 另外, 氧化型低密度脂蛋白的代谢产物丙二醛对细胞也有直接毒害作用。另有研究认为<sup>[4]</sup>, 氧化型低密度脂蛋白能降低内皮细胞内皮型一氧化氮合酶活性及其基因表达, 从而减少内皮源性一氧化氮的生成。本研究是在培养人脐静脉内皮细胞的基础上, 观察了氧化型低密度脂蛋白及维生素 C 对内皮型一氧化氮合酶的活性、乳酸脱氢酶活性及一氧化氮生成的影响。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞呈浓度依赖性抑制内皮型一氧化氮合酶活性, 增加细胞上清液中乳酸脱氢酶活性及细胞死

亡率, 说明氧化型低密度脂蛋白及其代谢产物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。

维生素 C 是一水溶性强氧化剂。业已证明, 大剂量的维生素 C 能清除细胞外超氧阴离子, 减轻细胞的脂质过氧化损伤; 同时, 它以时间依赖性方式进入细胞内, 改善细胞内的氧化还原状态, 增加生物四氢喋呤(BH<sub>4</sub>)的利用度或/和增加 BH<sub>4</sub> 和内皮型一氧化氮合酶的亲和力<sup>[5,6]</sup>, 改善内皮型一氧化氮合酶的解偶联状态<sup>[7]</sup>, 从而增加内皮型一氧化氮合酶活性。维生素 C 对内皮型一氧化氮合酶的基因表达无影响<sup>[5]</sup>。该研究发现, 应用不同剂量的维生素 C 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增加, 一氧化氮生成也相应增加, 二者呈正相关, 由此间接说明氧化型低密度脂蛋白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。

总之, 氧化型低密度脂蛋白不但对内皮细胞有直接毒害作用, 而且能直接抑制内皮型一氧化氮合酶活性, 减少一氧化氮生成。维生素 C 能减弱该效应, 但具体的分子机制有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Zhao B, Zhang Y, Lin B, et al. Endothelial cells injured by oxidized low density lipoprotein. *Am J Hematol*, 1995, **49** (3): 250-252
- [2] Sawamura T, Kurne N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for low density lipoprotein. *Nature*, 1997, **386** (6): 73-76
- [3] Mabille L, Fitoussi G, Periquet B, et al.  $\alpha$ -Tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 1995, **19**: 177-187
- [4] Liao JK, Shin WS, Lee WY, et al. Oxidized low density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 319-324
- [5] Heller R, Munscher F, Grabner R, et al. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (12): 8 254-260
- [6] Huang A, Vita JA, Venema RC, et al. Ascorbic acid enhances endothelial nitric oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem*, 2000, **275** (23): 17 399-406
- [7] Stroses ESG, Van Faassen EE, Yo M, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *J Circ Res*, 2000, **83**: 1 129-134

(此文编辑 朱雯霞)