

异亚丙基莽草酸对 H_2O_2 损伤血管内皮细胞的保护作用

马 怡, 孙建宁*, 徐秋萍, 郭亚健

(北京中医药大学 中药学院 药理教研室, 北京 100102)

摘要: 目的 研究异亚丙基莽草酸(ISA)对血管内皮细胞损伤的保护作用。方法 倒置显微镜下观察细胞形态学改变, MTT比色法检测细胞活性, 用硝酸还原酶法测定细胞培养液中 NO的含量。放射免疫法测定细胞培养液中前列环素代谢物 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$) 含量, 比色法测定培养液及细胞裂解液的乳酸脱氢酶(LDH)活性并计算 LDH的释放率。结果 ISA可明显改善 H_2O_2 所致的内皮细胞变形、皱缩等损伤表现。1~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ISA可浓度依赖性的减轻 H_2O_2 引起的细胞活性降低和 LDH释放, 并促进 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞释放 NO和前列环素。结论 异亚丙基莽草酸对 H_2O_2 损伤血管内皮细胞具有保护作用。

关键词: 异亚丙基莽草酸; 内皮细胞; 细胞损伤; 过氧化氢

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)12-0897-03

Protective effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on vascular endothelial cell injured by hydrogen peroxide

MA Yi, SUN Jian-ning*, XU Qiu-ping, GUO Ya-jian

(Department of Pharmacology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: **Aim** To study the effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid (ISA) on H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 h) injured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Morphological change was observed under microscope. Cell viability was assessed by MTT assay. The release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) and NO was assessed by colorimetry. Radioimmunoassay was used to assess 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$). **Results** Pretreatment with ISA for 6 h alleviated the morphological damage of H_2O_2 induced HUVECs. At the concentration of 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ISA prevented the inhibitory effect on cell viability induced by H_2O_2 in dose-dependent manner, but increased the ratio of cell viability from 60.4% to 84.3%. ISA reduced LDH release and increased the level of NO and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ in H_2O_2 induced HUVECs. **Conclusion** ISA exerted protective effect on H_2O_2 injured HUVEC.

Key words: 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid; endothelial cell; cell injury; hydrogen peroxide

血管内皮细胞是血管壁组织和血液间的第一道通透性屏障,许多因素如激活的白细胞、活性氧、细胞因子等都可损伤内皮细胞,造成内皮细胞的功能障碍,由此而导致血栓形成、动脉粥样硬化、高血压

等心脑血管疾病的发生。内皮细胞损伤是血管损伤的初始阶段,因此保护内皮细胞功能是预防血管性疾病发生的关键。另一方面,由于内皮细胞分泌多种活性物质,参与多种生理及病理过程,它的损伤是血管性疾病发生和发展的原因之一。

异亚丙基莽草酸(ISA)是从中药木兰科植物八角茴香中提取的有效成分莽草酸的衍生物。前期的研究表明:ISA可明显抑制实验性血栓形成,抑制血小板聚集^[1],并在整体实验中显示出对血管内

收稿日期: 2002-12-28.

基金项目: 国家科技部“十五”科技攻关项目(2001BA701A07-14).

* 通讯作者 Tel: 86-10-64711199-6084, Fax: 86-10-64721442, E-mail: jn_sun@sina.com

皮的保护作用。本研究以体外培养的人脐静脉内皮细胞,观察 ISA 对内皮细胞损伤的保护作用,进一步探讨 ISA 抗血栓形成的机理。

材料与方法

主要药品及试剂 异亚丙基莽草酸($C_{10}H_{14}O_3$, 分子量 214), 由本校药化教研室郭亚健教授提供, 为无色细片状结晶, 纯度 $>98\%$, 溶于适量超纯水。内皮细胞生长因子 (ECGF), 德国 Roche 公司; 乳酸脱氢酶、NO 测定试剂盒, 购自南京建成公司; $[^{125}I]$ 6-酮-前列腺素 ($6\text{-keto prostaglandin } F_{1\alpha}$, $6\text{-keto PGF}_{1\alpha}$) 放免试剂盒购自北京福瑞生物工程公司; 其余试剂为国产分析纯。

人脐静脉内皮细胞的体外培养及鉴定 参照 Jaffe 等^[2]的方法, 在无菌条件下取健康新生儿脐带 25 ~ 30 cm, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗干净后, 灌入 0.1% I 型胶原酶约 10 mL, 37 °C 孵育 10 min, 离心收集内皮细胞, 用完全 M199 (含 20% 胎牛血清, 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ECGF), 接种细胞于底面积为 25 cm^2 的培养瓶中, 置 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养。当细胞融合成单层时, 0.125% 胰酶-0.02% EDTA 消化传代, 实验用第 1 ~ 3 代。根据相差显微镜 (日本 Leica 公司) 下细胞呈单层铺路石样排列, 免疫组化链霉卵白素-生物素-酶复合物法检测 VIII 因子相关抗原阳性, 鉴定为内皮细胞。

MTT 法检测内皮细胞活性 参照文献^[3]方法, 内皮细胞接种到 96 孔板上, 每孔 2×10^4 个细胞, 培养成单层后, 加入含不同浓度 ISA 的培养液继续培养 6 h, 再加入终浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 刺激细胞 4 h。用 PBS 小心洗涤细胞后, 加入含 0.1% MTT 的 M199 培养液 100 μL , 37 °C 孵育 4 h 后移出培养液, 每孔加入二甲基亚砷 100 μL , 37 °C 振荡 10 min, 30 min 内在酶标仪 (芬兰 Thermo Labsystems 公司产品, Multiskan MK3 型) 上, 570 nm 处测吸光度 (A), 计算细胞存活率。

培养液中 NO 及 6-keto PGF_{1 α} 含量的测定 NO 测定采用硝酸还原酶法, 按试剂盒说明操作, 以总硝酸盐 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) 含量表示 NO 浓度。用放射免疫法测细胞培养液中前列腺素代谢物 6-keto PGF_{1 α} 含量。

乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的测定 按试剂盒说明操作, 分别测定细胞培养液和细胞裂解液中 LDH 活性, 计算乳酸脱氢酶释放率。

统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 t

检验进行显著性检验。

结果

1 ISA 对 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 形态学的影响

倒置显微镜下见正常 HUVEC 融合, 单层铺路石样生长, 细胞呈短梭形或多角形镶嵌排列; ISA 组的细胞形态与正常组相似; H_2O_2 组内皮细胞排列紊乱, 细胞间隙增宽, 细胞变形、皱缩, 胞内颗粒增多。 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ISA } 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ISA } 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞形态基本保持正常, 有轻微的变形收缩。上述形态学观察结果显示: H_2O_2 能明显损伤 HUVEC, 而 ISA 组细胞在整个培养过程中形态基本保持与对照组相似, 表明 ISA 对 H_2O_2 致 EC 损伤有一定的保护作用。

2 ISA 对 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞活性的影响

H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 刺激 HUVEC 4 h 后明显抑制细胞活性。而 ISA 可浓度依赖性减轻 H_2O_2 引起的细胞活性降低, ISA (10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可使细胞存活率由 H_2O_2 组的 60.4% 增加至 75.4% 和 84.3%, 见表 1。

Table 1 Effect of 3, 4-oxo-isopropylidene shikimic acid (ISA) on the viability of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) injured by H_2O_2

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{570\text{nm}}$	Cell viability/ %
Control	0	$0.134 \pm 0.006^{***}$	
Vehicle	0	0.081 ± 0.006	60.4
ISA	0.1	0.083 ± 0.004	61.9
	1	0.088 ± 0.005	65.7
	10	$0.101 \pm 0.009^{**}$	75.4
	100	$0.113 \pm 0.011^{***}$	84.3

HUVECs were treated with ISA for 6 h, then were incubated with 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 for another 4 h. Cell viability was measured with MTT method. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle

3 ISA 对 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞释放 NO 和前列环素的影响

H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可引起内皮细胞 NO 和前列环素释放减少。而预先加入 ISA (10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育细胞 6 h 后, 再加入 H_2O_2 , 其培养液中 NO 和 6-keto PGF_{1 α} 浓度明显高于 H_2O_2 组 (表 2)。

4 ISA 对 H_2O_2 损伤的人脐静脉内皮细胞释放乳酸脱氢酶的影响

H₂O₂ (200 μmol·L⁻¹) 刺激 HUVEC 4 h, 可显著增加 LDH 的释放率。预先加入 ISA (10 ~ 100 μmol·L⁻¹) 可降低 LDH 释放率, 与 H₂O₂ 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$) (表 2)。

Table 2 Effect of ISA on the release of NO, 6 keto-PGF_{1α} and LDH in H₂O₂ injured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

Group	Concentration / μmol·L ⁻¹	NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻ / μmol·L ⁻¹	6-Keto-PGF _{1α} / μg·L ⁻¹	LDH release / %
Control	0	60 ± 4 ^{***}	12 ± 0.6 ^{***}	14.8 ± 1.9 ^{***}
Vehicle	0	397 ± 6	7.7 ± 0.9	37 ± 4
ISA	1	42 ± 4	7.8 ± 0.8	31 ± 5
	10	47 ± 6 [*]	9.4 ± 0.6 ^{**}	29 ± 3 ^{**}
	100	51 ± 6 ^{**}	11.8 ± 1.1 ^{***}	26 ± 4 ^{**}

HUVEC were treated with ISA for 6 h, then were incubated with 200 μmol·L⁻¹ H₂O₂ for another 4 h. 6-Keto-PGF_{1α} was measured by radioimmunoassay. NO and LDH were measured by colorimetric assay. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle

讨论

内皮细胞损伤是心血管疾病发生的首要环节, 在引起内皮细胞结构及功能障碍的诸多因素中, 有关氧化应激、氧化损伤的作用正受到广泛的关注。H₂O₂ 是活性氧, 可透过细胞膜进入细胞内, 导致 ADP 磷酸化的糖酵解或线粒体途径的某些酶失活, 使细胞能量代谢障碍; 也可在亚铁离子存在的条件下发生 Fenton 反应, 生成毒性更强的羟基; 还可和蛋白酶协同作用促进超氧阴离子的产生, 这 3 种作用使 H₂O₂ 对血管内皮细胞产生损伤^[4]。MTT 为一种黄色化合物, 活细胞线粒体中的脱氢酶可将其还原成蓝色的甲胺。而不进行线粒体代谢的死细胞不能将 MTT 还原成甲胺^[3]。因此, 它的形成量反映了线粒体的代谢活力, 又能间接反映细胞的增殖与存活情况。本实验发现, H₂O₂ 使 HUVEC 的甲胺形成量减少, 细胞内 LDH 释放增加, 表明 H₂O₂ 对 HUVEC 产生损伤作用。预先加入 ISA 可促进甲胺的形成, 说明 ISA 具有抗 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤的作用, 可能是由于保护了 HUVEC 的线粒体所致。并且 ISA 可减少 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 释放 LDH, 说明 ISA 可能促进 VEC 修复和保护 VEC 的完整性。

PGI₂ 和 NO 主要由 VEC 合成和分泌的具有扩张血管和抑制血小板聚集作用的物质。本实验中, H₂O₂ 使内皮细胞的 PGI₂ 和 NO 释放减少, 这与一些

文献^[5,6]报道的基本一致。ISA 可浓度依赖性升高 PGI₂ 和 NO 水平, 提示 ISA 可能促进损伤的功能恢复。

关于 H₂O₂ 对内皮细胞 NO 释放的影响也有相反报道, Gupta 等^[7]的研究结果显示 H₂O₂ 引起内皮障碍不是通过影响精氨酸-NO 通路导致的。Shimizu 等^[8]报道 H₂O₂ 引起内皮细胞 NO 释放增加。这些研究结果不一致的原因可能与内皮细胞类型, H₂O₂ 使用剂量以及与细胞孵育时间不同等有关。由于 NO 是以 L-精氨酸 (L-Arg) 为底物在 NO 合酶 (NOS) 催化下生成, ISA 促 NO 生成是通过 L-Arg 转运功能增加或者 NO 合成酶活性升高以及 NOS 的基因表达变构而改变 NOS 表现型, 还是通过影响 VEC 数量, 使 NO 释放增加, 而导致 HUVEC 内 NO 水平升高, 有待进一步证实。

References:

- [1] Wang HT, Jin HT, Sun JN, *et al.* Experimental studies on the anti-thrombosis effect of 3,4-oxo isopropylidene-shikimic acid [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, **37**(4): 245 - 248.
- [2] Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, **52**(11): 2745 - 2756.
- [3] Hussain RF, Nouri AME. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay [J]. *J Immunol Methods*, 1993, **160**(1): 89 - 96.
- [4] Ward PA. Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils [J]. *Am J Med*, 1991, **91**(30C): 89s - 94s.
- [5] Lin R, Liu JT, Li X, *et al.* Protective effect of tetramethylpyrazine on vascular endothelial cell injured by hydrogen peroxide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2000, **14**(6): 425 - 429.
- [6] Lin R, Liu JT, Li X, *et al.* Effect of quercetin on cell cycle and nitroxide in hydrogenperoxide-induced of endothelial cells [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, **17**(2): 211 - 213.
- [7] Gupta MP, Steinberg HO, Hart CM. H₂O₂ causes endothelial barrier dysfunction without disrupting the arginine-nitric oxide pathway [J]. *Am J Physiol*, 1998, **274**(4 Pt 1 Mol Physiol 18): L508 - L516.
- [8] Shimizu S, Saitoh Y, Yamamoto T, *et al.* Stimulation by hydrogen peroxide of L-arginine metabolism to L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cells [J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1994, **84**(3): 315 - 329.