

文章编号 1006-8147(2015)02-0105-04

论 著

氧化低密度脂蛋白对体外血管内皮细胞损伤的剂量反应关系

王鹏燕¹, 崔杉杉¹, 常红^{1,2}, 李文¹, 黄国伟¹, 高玉霞³

(1.天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,天津 300070;2.天津医科大学康复与运动医学系,天津 300070;3.天津医科大学总医院心内科,天津 300052)

摘要 目的:研究氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)造成的损伤效应。方法:分别用不同浓度的 ox-LDL 作用于对数生长期的 HUVEC 细胞 24 h,进行细胞形态学观察比较,采用四唑盐(MTT)比色法测定细胞活力,计算细胞生长抑制率,并测定细胞中丙二醛(MDA)含量。结果:随着 ox-LDL 浓度的增加,细胞形态发生明显变化,变得结构松散,ox-LDL 高浓度时甚至出现细胞破碎、死亡。MTT 实验的吸光度值(OD)在 ox-LDL 浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,与对照组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$)。不同浓度干预 24 h 后细胞中 MDA 含量与 MTT 实验结果一致。当 ox-LDL 浓度为 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞抑制率分别达到 23.2%、45.2%、62.0%。结论:当 HUVEC 细胞暴露于 ox-LDL 24 h 后,干预浓度越大细胞活力越低,细胞生长抑制率越大,细胞中 MDA 含量增加。ox-LDL 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 以内时,ox-LDL 对 HUVEC 细胞可造成较明显的氧化损伤且呈现剂量效应关系。

关键词 氧化低密度脂蛋白;血管内皮细胞;氧化损伤

中图分类号 R543.5

文献标志码 A

Dose-response relationship of oxidized low density lipoprotein on human umbilical vein vascular endothelial cells damage *in vitro*

WANG Peng-yan¹, CUI Shan-shan¹, CHANG Hong^{1,2}, LI Wen¹, HUANG Guo-wei¹, GAO Yu-xia³

(1.Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Rehabilitation and Sports Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3.Department of Cardiology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To explore the dose-response relationship of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on human umbilical vein vascular endothelial cells (HUVEC) damage *in vitro*. **Methods:** HUVEC were treated with different concentrations of ox-LDL for 24 h. Morphological change was observed. And then cell viability was measured by MTT and growth inhibition ratios were calculated. The content of MDA in endothelium cells was measured. **Results:** With the increase of the concentration of ox-LDL, cells morphology of HUVEC was deteriorated. Cells became loose, broken and eventually dead. When cells were exposed to different doses of ox-LDL for 24 h, compared with control group, cell viabilities of 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ groups were decreased respectively and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The statistical result of MDA concentration in cells after 24 h was consistent with MTT. The growth inhibition ratios for 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ group were 23.2%, 45.2%, 62.0%. **Conclusion:** When HUVEC are exposed to ox-LDL for 24 h, the cell viability decreases with the rise of the ox-LDL concentration while the cell growth inhibition rate and MDA content in the cells increase. When the concentration of ox-LDL is below 200 $\mu\text{g/mL}$, the HUVEC suffer marked oxidation damage and present dose effect relationship.

Key words oxidized low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cells; oxidized injury

血管内皮细胞损伤是发生多种心血管疾病的病理生理改变,是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发生的重要环节之一^[1],保护血管内皮细胞对于防治 AS 相关疾病有着重要的意义^[2]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是内皮细胞和血管损伤过程中的起始因子,具有细胞毒

性,可以从多方面、多途径损伤血管内皮细胞,作为氧自由基的携带者,可加速泡沫细胞形成、内皮细胞紊乱、平滑肌细胞增殖等损伤进展,不仅能够直接影响内皮细胞通透性、分泌调节及炎症反应等功能,也可以通过某些信号通路诱导内皮细胞凋亡并导致内皮功能障碍^[3-4]。本实验利用不同浓度的 ox-LDL 作用于体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein vascular endothelial cells, HUVEC) 24 h,研究其对血管内皮细胞的氧化损伤作用

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81373002)

作者简介 王鹏燕(1989-),女,硕士在读,研究方向:营养与疾病;

通信作者:高玉霞, E-mail: gaoyuxia@medmail.com.cn。

的剂量反应关系。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC 购自吉妮欧生物科技有限公司; ox-LDL 购自广州奕源生物科技有限公司; DMEM 培养液、胰蛋白酶-DETA、四唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS) 购自 Gibco 公司。细胞丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物公司。Ⅷ因子相关抗原免疫组化测试盒购自中山生物工程公司。其它试剂均为国外或国产分析纯试剂。

1.2 细胞培养与鉴定 冻存 HUVEC 复苏后,用含 10% FBS,100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素的 DMEM 接种于培养皿中,置于 37 ℃、5% CO₂、95% 空气、饱和湿度培养箱中培养。当细胞培养皿中的细胞长成单层,倾去培养液,用 PBS 液洗 2 遍,换新细胞培养液培养;细胞生长融合成致密单层,用 0.25% 的胰蛋白酶-DETA 消化,以 1:3 传代,反复轻轻吹打均匀后将细胞均匀接种于培养皿中。实验采用生长融合成单层的内皮细胞,传代细胞 3 到 5 代用于实验,在培养板中按实验分组剂量加入 ox-LDL,孵育 24 h,倒置显微镜观察细胞形态,HUVEC 鉴定采用Ⅷ因子相关抗原免疫组化测试盒进行鉴定。

1.3 实验分组 实验分为正常对照组(未添加 ox-LDL)、ox-LDL-10 μg/mL、ox-LDL-20 μg/mL、ox-LDL-50 μg/mL、ox-LDL-100 μg/mL、ox-LDL-200 μg/mL 共 6 组,细胞置于 37 ℃、5% CO₂、95% 空气、饱和湿度培养箱中培养 24 h。

1.4 观察指标与测定方法

1.4.1 形态学观察 倒置显微镜观察各组细胞形态变化,观察细胞生长状况、细胞密度,并进行拍照。对比对照组与 ox-LDL 各干预组细胞形态学差异。

1.4.2 MTT 比色法测定细胞活性 将体外培养的 HUVEC 制成单细胞悬液,用自动细胞计数仪,采用台盼兰排斥法进行细胞计数,以含 10% 胎牛血清的培养液调整细胞密度至 1×10^4 /mL,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL 细胞悬液,待细胞贴壁后更换无血清培养液培养,再按上述分组方法加入相应终浓度的 ox-LDL,空白孔加入等体积的磷酸盐缓冲液。每个浓度组做 6 个复孔,继续培养 24 h。细胞终止培养后,每孔加入 20 μL MTT,MTT 终浓度为 0.5 mg/mL,孵育 4 h 后小心吸出细胞培养液,每孔加入 150 μL DMSO,震荡溶解甲瓖蓝颗粒,于 490 nm 处用酶标仪测定吸光度值(OD),结果以各组 OD 均值±

标准误表示(实验重复 3 批细胞)。根据 MTT 数据计算各干预组细胞的抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{OD_{\text{对照}} - OD_{\text{测定}}}{OD_{\text{对照}}} \times 100\%$$

1.4.3 血管内皮细胞中 MDA 含量的测定 利用硫代巴比妥酸(TBA)法,操作步骤按 MDA 测定试剂盒说明进行,在 530 nm 处用酶标仪测定细胞裂解液(超声破碎法)离心后上清液吸光度值,结合 BCA 蛋白定量测定的胞浆蛋白浓度,计算细胞内的 MDA 含量。BCA 蛋白定量采用 BCA 蛋白质定量试剂盒,微孔板法在 562 nm 处用酶标仪测定光度值,根据标准曲线计算出蛋白浓度。结果以各组 MDA 含量均值±标准误表示(实验重复 3 批细胞)。

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/mL}) = \frac{(OD_{\text{测定}} - OD_{\text{空白}}) \times 10}{(OD_{\text{标准}} - OD_{\text{空白}}) \times c}$$

其中标准品浓度为 10 nmol/mL, c 为待测样品蛋白浓度

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件包处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 的形式表示,进行方差齐性检验,方差齐进行多组间比较采用单因素方差分析,若组间差别有统计学意义,各组间两两比较采用 SNK- q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血管内皮细胞的鉴定和形态学观察

2.1.1 HUVEC 的鉴定 Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色,在倒置荧光显微镜下观察,绝大多数细胞浆内可见棕褐色斑块,即Ⅷ因子抗原染色结果阳性(图 1)。免疫细胞化学结果提示体外培养的细胞为 HUVEC,可用于进一步实验。

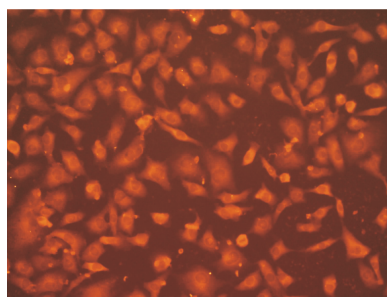
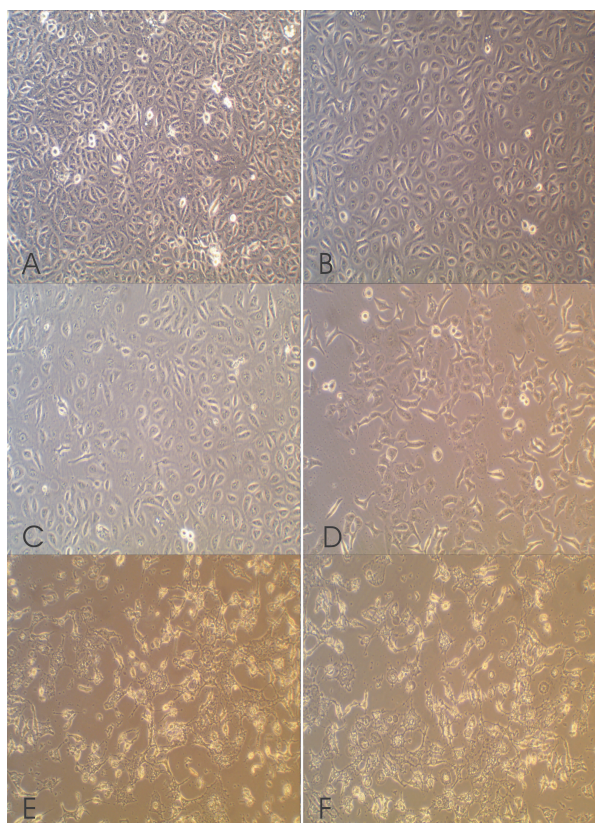


图 1 倒置相差荧光显微镜下Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色观察 ($\times 100$)

Fig 1 Ⅷ factor related antigen immunohistochemical staining under the inverted fluorescence microscope ($\times 100$)

2.1.2 HUVEC 形态学观察 倒置显微镜下观察对照组细胞数量较多且排列密集,细胞贴壁生长,为多角形或短梭形,边缘清晰,大小均匀,胞核圆形或椭圆形,位于细胞中央,胞质清亮,可见少量空泡颗粒。细胞汇合后呈典型单层铺路石样镶嵌排列。经

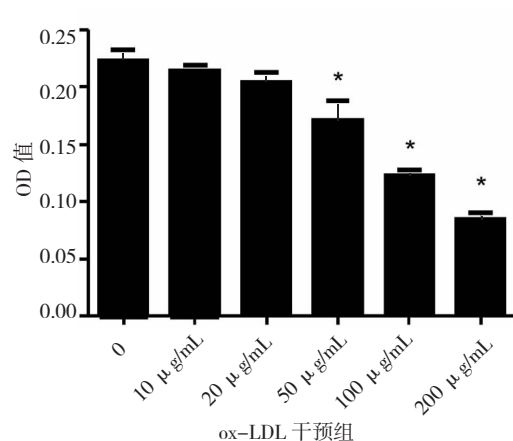
ox-LDL 干预后细胞数目显著减少,排列疏松,胞内颗粒物质增多。ox-LDL 10、20 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞形态与对照组基本相同,差异不大。ox-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$ 组镜下可见细胞收缩、分离,细胞间隙增宽,多数细胞变成椭圆形,少数细胞变成圆形,轮廓不清,细胞结构松散,但细胞彼此仍然相连,细胞脱落现象较少。ox-LDL 100 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞收缩,细长如柳叶,细胞间隙进一步扩大,胞核模糊,胞膜损伤破裂,可见细胞破碎、坏死及脱落现象,细胞排列紊乱,失去典型的单层铺路石状排列形态。ox-LDL 200 $\mu\text{g/mL}$ 组损伤进一步加重,细胞胞膜不完整,甚至损伤破裂,有较多细胞脱落,并形成部分脱失区(图2)。



A: ox-LDL 0 $\mu\text{g/mL}$; B: ox-LDL 10 $\mu\text{g/mL}$; C: ox-LDL 20 $\mu\text{g/mL}$;
D: ox-LDL 50 $\mu\text{g/mL}$; E: ox-LDL 100 $\mu\text{g/mL}$; F: ox-LDL 200 $\mu\text{g/mL}$
图2 倒置显微镜下 HUVEC 形态学观察($\times 100$)

Fig 2 Morphology of HUVEC under inverted microscope ($\times 100$)

2.2 ox-LDL 对血管内皮细胞活力的影响 随着 ox-LDL 的增加 (ox-LDL 浓度分别为 0、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$), 各组细胞 MTT 实验吸光度值分别为 (0.223 ± 0.009); (0.214 ± 0.045); (0.204 ± 0.082); (0.171 ± 0.016); (0.122 ± 0.006); (0.085 ± 0.007)。当 ox-LDL 为 50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其细胞活力水平分别与对照组相比, 均差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图3)。



* 与对照组相比 $P < 0.05$

图3 ox-LDL 对 HUVEC 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s_x$)

Fig 3 The influence of ox-LDL on HUVEC cell viability($\bar{x} \pm s_x$)

2.3 HUVEC 生长抑制率 随着 ox-LDL 浓度的升高, 各干预组细胞抑制率分别为 (0.039 ± 0.020); (0.085 ± 0.037); (0.232 ± 0.073); (0.452 ± 0.025); (0.620 ± 0.029) (ox-LDL 浓度分别为 10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$)。当 ox-LDL 为 50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞生长抑制率较明显, 分别为 23.2%、45.2%、60.0% (图4)。

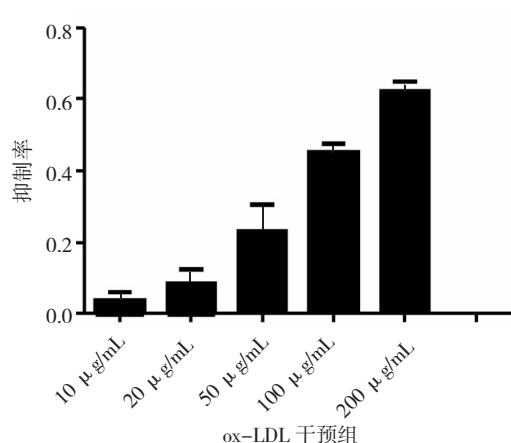
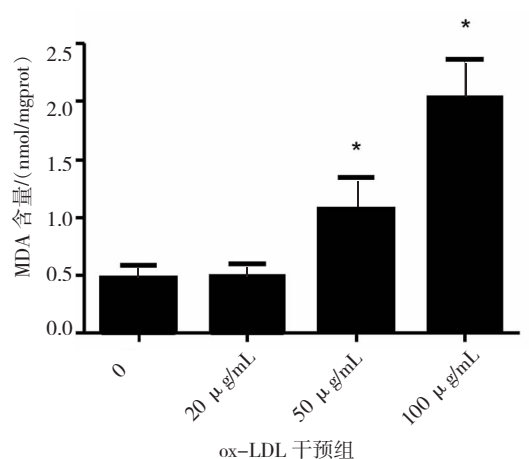


图4 ox-LDL 对 HUVEC 生长抑制率的影响($\bar{x} \pm s_x$)

Fig 4 The influence of ox-LDL on cell growth inhibition rate($\bar{x} \pm s_x$)

2.4 内皮细胞 MDA 含量 根据 MTT 结果 10 $\mu\text{g/mL}$ 组对细胞损伤较轻, 而当 ox-LDL 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时光镜下可直接观察到细胞破碎、死亡, 损伤过重, 故未测定该浓度下细胞中 MDA 含量。对照组细胞中 MDA 表达量为 (0.480 ± 0.103) nmol/mg prot, ox-LDL 作用后 (ox-LDL 浓度分别为 20、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$) 细胞中 MDA 含量分别为: (0.487 ± 0.108); (1.070 ± 0.275) 和 (2.031 ± 0.333) nmol/mg prot。当 ox-LDL 浓度为 50 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 与对照组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图5)。



* 与对照组相比 $P < 0.05$

图 5 ox-LDL 对 HUVEC 中 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s_x$)

Fig 5 The influence of ox-LDL on MDA content in HUVEC ($\bar{x} \pm s_x$)

3 讨论

血管内皮细胞活力的高低可以反映细胞的代谢与增殖,实验结果表明 ox-LDL 干预浓度越大细胞活力越低,细胞生长抑制率越大,细胞中 MDA 含量越高,反应细胞氧化损伤程度加重。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物(如醛基 MDA),引起细胞损伤。测试 MDA 的含量常常可反映出细胞损伤的程度。本实验表明当 ox-LDL 为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时对血管内皮细胞已产生了明显的损伤作用。

AS 形成是一个多因素多途径协同作用的过程,发病机制复杂,在各独立危险因素中脂代谢异常是首要因素,尤其是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是 AS 的主要危险因素,LDL 经氧化修饰后其致 AS 作用大为加强。血液中病理性 LDL 特别是 ox-LDL 是 LDL 致动脉粥样硬化的关键步骤,透过其细胞毒性引起内皮细胞功能损害,促动脉粥样硬化基因表达引起 AS^[5]。ox-LDL 存在于人类血浆及动脉斑块中,可加速泡沫细胞形成、内皮细胞紊乱、平滑肌细胞增殖等损伤的进展^[6]。因此在关于 AS 的研究中,ox-LDL 对内皮细胞的损伤作用的研究具有重要意义。在现有关于 HUVEC 氧化损伤的研究中,部分研究选用了 ox-LDL 孵育细胞的方法建立细胞氧化损伤模型,探讨某一物质对于 ox-LDL 氧化损伤细胞的作用或关于 ox-LDL 损伤机制的研究,但是此类研究中并未详细阐述选取相应浓度建立氧化损伤模型的依据及 HUVEC 在不同浓度 ox-LDL 下的受损伤程度。而现有研究中选取的损伤作用浓度也有所不同,王茂山等^[7]在研究桔

梗皂苷 D 对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞氧化损伤的作用中,使用浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 作用 24 h 建立 HUVEC 氧化损伤模型。Yu 等^[8]和刘秀玲等^[9]的研究中均使用浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 ox-LDL 作用 24 h 建立 HUVEC 氧化损伤模型。Liu 等^[10]和汪志华等^[11]研究中均通过 200 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 损伤血管内皮细胞建立模型。细胞氧化损伤模型的合理建立是进一步研究的坚实基础,因此本实验试图明确 ox-LDL 对血管内皮细胞的氧化损伤作用的剂量反应关系,为不同研究中 ox-LDL 合理浓度的选取提供参考。

本文通过不同浓度 ox-LDL 干预 HUVEC 细胞 24 h 后,发现 ox-LDL 干预浓度越大细胞活力越低,细胞生长抑制率越高,细胞中 MDA 分泌量越大。ox-LDL 浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 以内时,ox-LDL 对 HUVEC 细胞可造成较明显的氧化损伤且呈现剂量效应关系。

参考文献:

- [1] 张泉三,董果雄,张社华. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 225
- [2] Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications[J]. Am J Cardiol, 2002, 90(10): 40
- [3] 韩建科. 氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞研究进展[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(2): 317
- [4] Xu Y. Transcriptional regulation of endothelial dysfunction in atherosclerosis: an epigenetic perspective[J]. J Biomed Res, 2014, 28(1): 47
- [5] Orem C L, Orem A, Uydu H A, et al. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status[J]. Coron Artery Dis, 2002, 13(1): 65
- [6] Fang F, Yang Y, Yuan Z, et al. Myocardium-related transcription factor A mediates oxLDL-induced endothelial injury[J]. Circ Res, 2011, 108(7): 797
- [7] 王茂山, 吴敬涛. 桔梗皂苷 D 对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞氧化损伤的作用[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 293
- [8] Yu W, Ying H H, Tong F D, et al. Protective effect of the silkworm protein 30Kc6 on human vascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL)[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e68746
- [9] 刘秀玲, 李伟娟, 俞芳, 等. 尼莫地平对氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 中国实验诊断学, 2011, 6(15): 968
- [10] Liu Y X, Han G Z, Wu T, et al. Protective effect of α -lipoic acid on oxidized low density lipoprotein-induced human umbilical vein endothelial cell injury[J]. Pharmacol Rep, 2011, 63(5): 1180
- [11] 汪志华, 邵俊清, 赵德强, 等. 银杏提取物对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的抑制作用[J]. 中药材, 2010, 33(12): 1916

(2014-10-17 收稿)