

· 论 著 ·

银杏黄酮苷元对氧化低密度脂蛋白所致内皮细胞功能的影响*

何 艳,付永昕,吴立荣,方 颖,李 屏,李安敏

(贵州省贵阳医学院附属医院心内科,贵阳 550005)

摘要:目的 探讨银杏黄酮苷元(GA)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导脐静脉内皮细胞株 ECV304 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和植物血凝素样低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)表达的调节作用。方法 应用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、酶联免疫吸附反应(ELISA)、SP 免疫组化法等,探讨 ox-LDL 诱导下内皮细胞表达 MCP-1、LOX-1 及银杏黄酮苷元的干预作用。结果 6.25~25 mg/L 银杏黄酮苷元与脐静脉内皮细胞株 ECV304 共同培养 6~48 h 可显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 MCP-1、LOX-1mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),具有浓度、时间效应关系($P<0.05$)。LOX-1 拮抗剂 PIA 可抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1、MCP-1mRNA 和蛋白表达($P<0.05$)。结论 银杏黄酮苷元可显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞黏附因子 MCP-1 表达,该作用可能通过抑制 LOX-1 的表达来实现。

关键词:银杏黄酮苷元;氧化低密度脂蛋白;单核细胞趋化蛋白-1;植物血凝素样低密度脂蛋白受体-1

中图分类号:R365.543

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)06-0645-03

Effects of ginkgo aglycone on ox-LDL induced endothelial dysfunction*

HE Yan, FU Yong-xin, WU Li-rong, et al.

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550005, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ginkgo aglycone(GA) on ox-LDL induced gene and protein expression of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) and lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1(LOX-1) in human umbilical vein endothelial cells 304. **Methods** RT-PCR, ELISA assay, SP immunohistochemistry assay was used to detect the effect of ox-LDL and GA on expression of MCP-1, LOX-1 in endothelial cells. **Results** 6.25-25 mg/L GA could inhibit the expression of MCP-1 and LOX-1 induced by ox-LDL significantly($P<0.05$), and to some extent, its effect appeared dependent on the drug concentration and its action time($P<0.05$). LOX-1 receptor inhibitor could inhibit the expression of LOX-1 and MCP-1 induced by ox-LDL($P<0.05$). **Conclusion** GA could inhibit significantly the expression of MCP-1 induced by ox-LDL, while GA might implement its anti-adhesive function by inhibiting expression of LOX-1.

Key words: ginkgo aglycone; oxidized low density lipoprotein; monocyte chemoattractant protein; lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)导致内皮功能障碍在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)病理过程中起关键作用^[1],植物血凝素样低密度脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)作为近期发现的主要在内皮细胞表达的 ox-LDL 特异性受体,介导了 ox-LDL 对内皮细胞的损伤作用^[2]。银杏黄酮苷元(ginkgo aglycone, GA)是通过酸水解-重结晶法去除单糖后获得的新型银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE),与传统 GBE 比较,具有较强的脂溶性和体内生物效价高的特点,目前国内外对 GBE 防治动脉粥样硬化的实验研究和临床应用很多,但对 GA 的研究却很少。本研究在培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV304 上观察了不同浓度 GA、作用不同时间对 ox-LDL 所致的内皮细胞表面单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和 LOX-1 异常表达的干预,以期 GA 进一步用于临床防治 AS 性疾病提供实验依据。

1 材料与方

1.1 试剂与仪器 人脐静脉内皮细胞株 ECV304(中国典型培养物保藏中心提供)。ox-LDL(中山大学谢志忠博士提供)。DMEM 培养基(Gibco)、聚肌苷酸(Polynosinic acid, PIA, Sigma 公司生产)。新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究

所提供)。总 RNA 提取 Trizol 试剂及逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(北京天根生化科技有限公司生产)。MCP-1 酶联免疫吸附反应(ELISA)试剂盒(Boshide); LOX-1 兔抗人多克隆抗体(Sata Cruz);染色体图像分析仪(Leica);梯度 PCR 仪(Eppendorf 公司 AG22331 型);凝胶图像分析系统(Eppendorf 公司 AG22331 型)。上海捷瑞生物工程有限公司合成引物序列如下, MCP-1mRNA (177 bp)上游引物:5'-AGG AAG ATC TCA GTG CAC AGA GG-3',下游引物:5'-AGT CTT CGG AGT TTG GGT TTG-3'; LOX-1mRNA (193 bp)上游引物:TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC,下游引物:AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC; β -actin mRNA (295 bp)上游引物:5'-TCA CCC ACA ATG TGC CCA TCT ACG A-3',下游引物:5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'。GA 由贵州省生化中心何照范教授惠赠(主要成分:槲皮素 25.75%、山奈酚 15.26%、异鼠李素 1.77%、总黄酮苷元占总成分含量 42.79%)。其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 培养 将所购的人脐静脉内皮细胞株 ECV304 用含 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素和 100 u/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养液继续培养,置于 37 °C、

* 基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字(2005)225 号]。

5%CO₂ 培养箱中孵育,当细胞生长至 80%融合以上时,用体积分数 0.25%胰酶消化后,以 1:2 或 1:3 传代,传代后第 2 天换液 1 次,以后每 2~3 天换液 1 次,约 3~4 d 可长成单层细胞。实验分组:取对数生长期细胞,随机分为对照组(培养基),ox-LDL 组(培养基中加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 后继续培养 24 h),银杏黄酮苷元浓度效应组(GA6.25、12.5、25、50 mg/L 预先培养 48 h,然后加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 培养 24 h),银杏黄酮苷元时间效应组(GA 25 mg/L 预先分别作用 6、12、24 h 后,加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 培养 24 h),LOX-1 拮抗剂组(PIA 250 mg/L 预先作用 2 h 后,加入终浓度为 50 mg/L 的 ox-LDL 培养 24 h)。

1.3 内皮细胞形态学观察 相差显微镜观察各组细胞形态变化。

1.4 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 测定 样品总 RNA 提取采用 Trizol 试剂盒,操作按试剂盒说明进行。A260/A280 测定 RNA 浓度和纯度。采用二步法逆转录试剂盒,将 RNA 逆转录成 cDNA 作为模板进行扩增。PCR 反应条件均为 94 °C 预变形 5 min,94 °C 变性 30~40 s,55.4~60.5 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 1 min,循环 40 次,最后 72 °C 延伸 10 min,反应终产物立即进行电泳跑胶,用凝胶图像分析扫描,电泳结果并照相,测定各条带吸光度值。以恒定表达的 β -actin mRNA 作为内参进行校正,计算相对表达量。实验重复 3 次。

1.5 MCP-1 蛋白表达测定 采用 ELISA 法检测。常规消化细胞,将等量细胞悬液分别接种于 24 孔培养板上,调整细胞浓度为 5×10^5 个/孔,待细胞长成单层贴壁后,按上述试验分组,达作用时间之后,取细胞培养上清液离心,再收集上清液置于 -20 °C 保存,然后按试剂盒说明操作。置于酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值,并记录结果(每组设 6 个复孔)。

1.6 LOX-1 蛋白表达测定 采用 SP 免疫组化法检测。用特异性兔抗人 LOX-1 多克隆抗体进行细胞免疫组化鉴定,以 PBS 代替一抗作阴性对照,于显微镜下观察并计数,以胞浆和胞膜着色为棕黄或棕褐色颗粒为 LOX-1 蛋白表达阳性细胞,计数阳性细胞数和染色强度累积积分,结果以均数表示。

1.7 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计学软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较进行方差齐性检验和单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

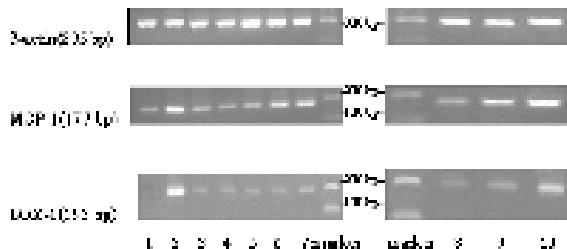
2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 细胞形态观察 与对照组比较,银杏黄酮苷元(≤ 50 mg/L)对 ECV304 生长无影响,细胞贴壁生长,黏附紧密,呈典型的铺路石样分布。

2.2 银杏黄酮苷元对 ox-LDL 诱导的脐静脉内皮细胞株 ECV304 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 表达的影响 通过 RT-PCR 方法检测各组内皮细胞上 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 水平的表达,结果(图 1~3)显示:与对照组比较,ox-LDL 可明显上调 MCP-1 和 LOX-1 的 mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。用 GA 预处理 48 h 后,在 6.25~50 mg/L 浓度范围内,均可显著抑制 ox-LDL 诱导内皮细胞 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 表达;且此效应 25 mg/L 组大于 12.5 mg/L 组及 6.25 mg/L 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示此效应有一定浓度依赖性。

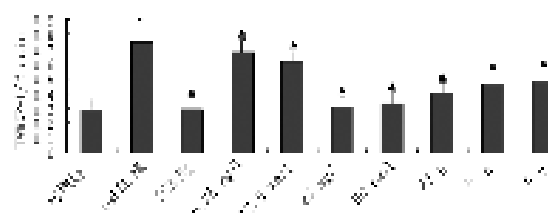
以 25 mg/L GA 预处理细胞 6~24 h,均可显著抑制 ox-LDL 诱导细胞 MCP-1、LOX-1 mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物效应 24 h 组大于 12 h 和 6 h 组,差异有统

计学意义($P < 0.05$),而 12 h 和 6 h 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 GA 与细胞作用 6 h 后即可发挥抑制 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 表达的作用,该作用在 24 h 时较强。用 LOX-1 阻断剂 PIA 对细胞进行预处理 2 h,可显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 MCP-1 和 LOX-1 mRNA 表达。



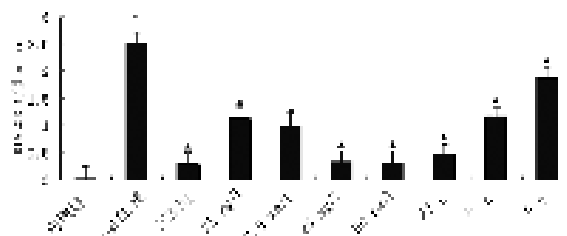
1:对照组;2:ox-LDL 组;3:PIA 组;4、5、6、7:分别表示 50 mg/L、25 mg/L、12.5 mg/L、6.25 mg/L 浓度的 GA 作用 48 h 组;8、9、10:表示 25 mg/L GA 分别作用 24 h、12 h、6 h 组。Marker:标准分子量参照(100~600 bp)。

图 1 各组 MCP-1 和 LOX-1 基因的 RT-PCR 结果



*:与对照组比较, $P < 0.05$;▲:与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 GA 对 ox-LDL 诱导内皮细胞 MCP-1 表达的影响



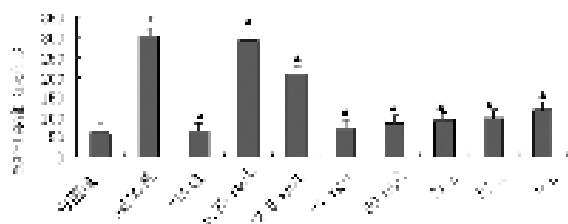
*:与对照组比较, $P < 0.05$;▲:与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 GA 对 ox-LDL 诱导内皮细胞 LOX-1 基因表达的影响

2.3 银杏黄酮苷元对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 MCP-1 蛋白表达的影响 ELISA 法检测各组细胞 MCP-1 蛋白表达量,结果(图 4)显示,ox-LDL 作用后,细胞上清液 MCP-1 的表达量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。用 GA 预处理 48 h 后,在 6.25~50 mg/L 终浓度范围内,可显著抑制 ox-LDL 引起的内皮细胞 MCP-1 的分泌,效应有一定的浓度依赖关系,差异有统计学意义($P < 0.05$);用终浓度 25 mg/L 的 GA 预处理 6~24 h,可显著抑制 ox-LDL 引起的 MCP-1 分泌,呈时间依赖关系,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 银杏黄酮苷元对 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 蛋白表达的影响 通过 SP 免疫组化法检测各组细胞 LOX-1 蛋白表达量,结果(封 2 图 5、表 1)表明:经 ox-LDL 作用后,内皮细胞 LOX-1 蛋白被大量地诱导表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。分别用终浓度 25 mg/L GA 预处理 48 h 和 250 mg/L LOX-1 受体阻断剂 PIA 预处理 2 h,均可完全阻断

ox-LDL 诱导内皮细胞 LOX-1 蛋白过量表达与 ox-LDL 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



*: 与对照组比较, $P < 0.05$; ▲: 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 GA 对内皮细胞 oxLDL 诱导内皮细胞 MCP-1 蛋白表达的影响

表 1 GA 对 ox-LDL 诱导内皮细胞 LOX-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 组别 | LOX-1 蛋白含量 |
|-------------|----------------|
| 对照组(0 mg/L) | 7.6 ± 0.8944 |
| ox-LDL | 14.6 ± 1.6733* |
| PIA | 7.6 ± 1.5166b# |
| GA(25 mg/L) | 8.2 ± 0.8367b# |

*: 与对照组比较, $P < 0.01$; #: 与 ox-LDL 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

MCP-1 作为一种强有力的趋化因子, 促进循环中的单核细胞聚集于血管内皮间隙, 并促进单核细胞清道夫受体表达, 进而摄取脂质, 转变为泡沫细胞, 成为 AS 发生的早期事件。ox-LDL 是目前公认的致 AS 的重要危险因素, 导致血管内皮细胞功能紊乱, 合成和分泌大量黏附分子和趋化因子^[3]。研究认为内皮细胞通过其表面受体 LOX-1 吞噬和降解 ox-LDL 是其功能发生障碍的主要原因。

近年来 GBE 在 AS 防治方面的基础研究取得了一定的进展。研究发现 GBE 增加循环内皮祖细胞端粒酶活性, 抑制过氧化氢所致内皮细胞凋亡蛋白 3 活性, 促进内皮祖细胞增殖, 从而促进内皮细胞增殖和修复^[4-5]; 干预内皮细胞损伤后一氧化氮合酶的表达, 改善内皮功能^[6-7]; 对 AS 大鼠致炎细胞因子白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 表达显著抑制, 对抗炎细胞因子白细胞介素-10 及其受体表达显著上调^[8]。

本研究发现, GA 可显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 MCP-1 表达, 且该效应在 6.25~25 mg/L 范围内, 具有一定的浓度和时间效应关系。提示 GA 可能通过影响内皮细胞 MCP-1 表达, 减少或预防 ox-LDL 所致的内皮细胞黏附功能紊乱。而 GA 和 LOX-1 受体阻断剂 PIA 干预 LOX-1 表达的同时, 阻断了 MCP-1 的异常合成和分泌, 提示 LOX-1 可能作为一种信号分子参与 ox-LDL 诱导的内皮细胞 MCP-1 表达的调节过程。LOX-1 的表达受多种因素包括 ox-LDL、TNF、高同型半胱氨酸等调节, 这些物质均与体内氧化应激相关。核因

子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 是调节真核生物氧化还原反应的重要转录蛋白, 在 AS 氧化应激病理过程中发挥重要作用。研究表明, LOX-1 基因启动子上存在 NF- κ B 和 AP-1 结合位点, 而本研究中 GA 黄酮含量高达 42.79%, 黄酮类物质是天然抗氧化物家族中的重要成员之一, 能有效清除超氧阴离子、羟自由基、一氧化氮等。Chen 等^[9] 研究显示, GBE 可以下调内皮细胞中活性氧簇生成, 抑制 NF- κ B、AP-1 表达。提示 GA 可能通过干预氧化应激造成的内皮细胞 LOX-1 上调而抑制 MCP-1 表达。

因此, 银杏黄酮苷元作为一种新型银杏叶提取物, 能够显著下调 ox-LDL 诱导的内皮细胞 LOX-1 表达, 从而抑制 MCP-1 的异常合成和分泌, 改善内皮细胞黏附功能, 发挥抗动脉粥样硬化作用。

参考文献:

- [1] Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risks? [J]. Circulation, 2002, 106(6): 640.
- [2] Mehta JL, Li DY. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(9): 1429.
- [3] 高凌云, 何作云, 李福平. 心肺神口服液对氧化型低密度脂蛋白介导的内皮细胞 ICAM-1 表达变化的影响 [J]. 重庆医学, 2003, 32(1): 6.
- [4] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 581.
- [5] Dong XX, Hui ZJ, Xiang WX. Ginkgo biloba extract reduces endothelial progenitor-cell senescence through augmentation of telomerase activity [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 49(2): 111.
- [6] 刘军须, 张敬各. 银杏叶提取物对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 52.
- [7] 张金霞, 胡涛, 田琼, 等. 银杏叶提取物对培养的人脐静脉内皮细胞结构型一氧化氮合酶的影响 [J]. 心脏杂志, 2001, 13(3): 214.
- [8] Jiao YB, Rui YC, Li TJ, et al. Expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in brain of atherosclerotic rats and effects of ginkgo biloba extract [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(7): 835.
- [9] Chen JW, Chen YH, Lin FY, et al. Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(9): 1559.

(收稿日期: 2009-08-01 修回日期: 2009-09-10)

《重庆医学》——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!