

溶血磷脂酰胆碱诱导内皮细胞表达血管内皮生长因子及丹酚酸 B 的抑制作用

张黎¹, 芮耀诚¹, 邱彦¹, 李铁军¹, 张卫东²

(第二军医大学药学院 1. 药理学教研室; 2. 天然药物化学教研室, 上海 200433)

[关键词] 溶血磷脂酰胆碱; 丹酚酸 B; 血管内皮生长因子; 酶联免疫吸附试验; 免疫组织化学

[摘要] 研究溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞中血管内皮生长因子表达的影响以及丹酚酸 B 的保护作用。在人脐静脉内皮细胞株 ECV304 培养基中加入溶血磷脂酰胆碱或溶血磷脂酰胆碱+丹酚酸 B, 用酶联免疫吸附试验检测各组内皮细胞培养上清液中血管内皮生长因子蛋白含量; 用原位杂交检测血管内皮生长因子 mRNA 的表达。结果显示, 培养的 ECV304 中未见血管内皮生长因子 mRNA 的表达, 溶血磷脂酰胆碱刺激后可见血管内皮生长因子 mRNA 的高表达, 加入丹酚酸 B 后阳性反应明显低于溶血磷脂酰胆碱组。酶联免疫吸附试验结果显示, 溶血磷脂酰胆碱可使 ECV304 细胞条件培养基中血管内皮生长因子蛋白表达明显增加, 丹酚酸 B 可明显降低其含量。以上结果提示, 溶血磷脂酰胆碱能诱导 ECV304 表达高水平的血管内皮生长因子, 丹酚酸 B 可明显降低其含量。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

Effects of Lysophosphatidylcholine on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in ECV304 and the Inhibitory Effect of Salvianolic Acid B

ZHANG Li, RUI Yao-Cheng, QIU Yan, LI Tie-Jun, and ZHANG Wei-Dong¹

(Department of Pharmacology, 1. Department of Medical Chemistry of Natural Products, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

MeSH Lysophosphatidylcholine; Salvianolic Acid B; Vascular Endothelial Growth Factor; Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Immunohistochemistry

ABSTRACT **Aim** To study the effect of lysophosphatidylcholine (LPC) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human umbilical vein endothelial cell line (ECV304) and the inhibitory effect of salvianolic acid B (Sal B) in vitro. **Methods** Exposed to 5 mg/L LPC or LPC + Sal B for 24 h, VEGF protein in ECV304 cells conditioned media of each group were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Meanwhile, VEGF mRNA expression in ECV304 was examined by in situ hybridization. **Results** LPC upregulated VEGF protein and VEGF mRNA expression in the ECV304 cells. Sal B could markedly inhibit the LPC-induced increasing of VEGF ($P < 0.001$). **Conclusions** LPC could induce a strong expression of VEGF in ECV304 cells and Sal B could inhibit it.

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块组织中的表达明显升高, 推测 VEGF 可能在动脉粥样硬化早期发展中起重要作用^[1,2]。目前溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 对血管内皮细胞 VEGF 的表达是否有影响尚未见报道。丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 是从丹参水溶性成分丹酚酸中提取出来的有效单体, 体内、体外研究表明丹酚酸 B 有较强的抗氧化能力, 对心脑血管系统有

一定的保护作用^[3]。本实验旨在研究丹酚酸 B 对 LPC 所致的 VEGF 分泌增加是否具有抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 内皮细胞的培养及分组

ECV304 细胞 (购于北京科恩公司) 用含 10% 小牛血清 (华美生物工程公司) 的 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Gibco) 培养基培养, 待细胞长成致密单层后, 用 0.1% 的胰酶 (Sigma) 消化, 调整细胞数为 1×10^8 个/L, 按每瓶 5 mL 接种于培养瓶中, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育 48 h 后, 可汇合成单层细胞, 换无血清培养基, 静息 24 h, 以消除血清的影

[作者简介] 张黎, 女, 1976 年出生, 北京人, 博士研究生, 主要研究方向为心脑血管药理学。芮耀诚, 女, 1941 年出生, 北京人, 教授, 主要研究方向为心脑血管药理学。

响。将准备好的细胞单层换以含 2×10^{-5} mol/L LPC(Sigma) 的无血清 DMEM 培养基刺激 24 h, 取其上清液, 离心 5 min, 用酶联免疫吸附试验(ELISA) 方法检测 VEGF 的表达。LPC 损伤组加入 2×10^{-5} mol/L LPC, Sal B 组同时加入 2×10^{-5} mol/L LPC 和 Sal B(1.35×10^{-9} 、 1.35×10^{-8} 和 1.35×10^{-7} mol/L) 共同孵育, 对照组只加无血清 DMEM 培养基。

1.2 酶联免疫分析

在兔抗鼠 IgG-HRP (SABC) 包被的 96 孔酶标板相应位置加入 100 μ L 不同浓度的 VEGF 标准品(0、0.0239、0.0597、1.531、6.125 和 25 μ g/L) 及 100 μ L CM, 与 4 mg/L 鼠抗人 VEGF 抗体(Santa Cruz) 室温孵育 3 h 后, 加入 25 μ L 兔抗鼠 IgG-HRP (1:1000), 室温孵育 30 min。缓冲液洗板 5 次, 加入 100 μ L 含 0.01% H_2O_2 的邻苯二胺盐酸盐, 室温显色 25 min, 50 μ L 2 mol/L 氢氧化钠终止反应。以酶标仪测定 492 nm 处吸光度值(Absorbance)。

1.3 原位杂交

在 24 孔培养板内放置盖玻片, 调整 ECV304 细胞数为 5 mL, 待细胞长满后弃去培养基, 换以无血清 DMEM 继续培养 24 h。加入含 LPC(2×10^{-5} mol/L) 的 DMEM 培养基 0.5 mL。Sal B 组加入 Sal B(1.35×10^{-9} 、 1.35×10^{-8} 和 1.35×10^{-7} mol/L), 对照组只加 DMEM 培养基 0.5 mL。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中培养 24 h, 取出盖玻片, 15% 甲醛固定 15 min。加入含 0.25% 乙酸酐的 0.1 mmol/L 的 TEA 缓冲液, 乙酰化处理 10 min。37 $^{\circ}$ C 预杂交 15 min 后加入含地高辛标记 cRNA 探针(Santa Cruz) 的杂交缓冲液, 切片加盖后于 42 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育过夜。PBS 洗涤后以含 20 mg/L RNase 的 NTE 缓冲液去除未杂交的探针, 用地高辛检测试剂盒(Boehringer Mannheim) 显色, 脱水, 封片。

1.4 统计学方法

所得数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式, 并进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞血管内皮生长因子蛋白表达的影响

以已知 VEGF 浓度为横坐标, 以相应吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到一条拟合的直线方程 $Y = -0.0383X + 0.124$ ($R^2 = 0.9871$, $n = 3$)。从图 1(Figure 1) 可见 ECV304 细胞中 VEGF 蛋白含量为 1.11 ± 0.06 μ g/L, 当 ECV304 细胞暴露于 LPC 后,

VEGF 蛋白含量显著增加(2.43 ± 0.04 μ g/L)。加入 Sal B 后, VEGF 蛋白含量明显降低, 当丹酚酸 B 为 1.35×10^{-9} mol/L 时, VEGF 蛋白含量为 0.64 ± 0.04 μ g/L, 当丹酚酸 B 为 1.35×10^{-7} mol/L 时, VEGF 蛋白含量为 0.27 ± 0.08 μ g/L, 与 LPC 组相比降低 9 倍($P < 0.001$, $n = 3$)。

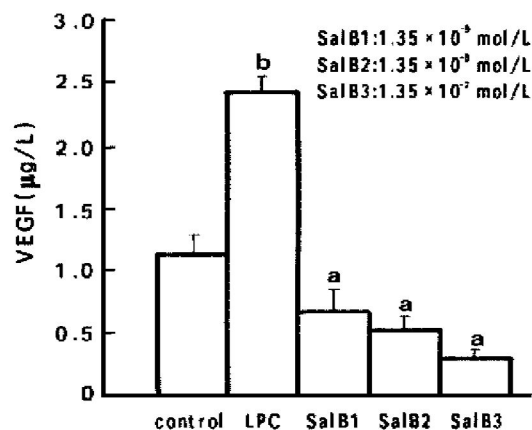


图 1. 上清液中血管内皮生长因子的蛋白含量

Figure 1. VEGF secreted by ECV304 exposed to LPC or LPC + Sal B. a: $P < 0.001$, compared with LPC; b: $P < 0.001$, compared with control.

2.2 丹酚酸 B 和溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响

正常培养的 ECV304 细胞中未见 VEGF mRNA 的表达, LPC 刺激后可见 VEGF mRNA 的高表达, 在胞浆内及核周呈棕色颗粒(图 2, Figure 2), 丹酚酸 B 可使 VEGF mRNA 的表达明显降低(图 3, Figure 3)。

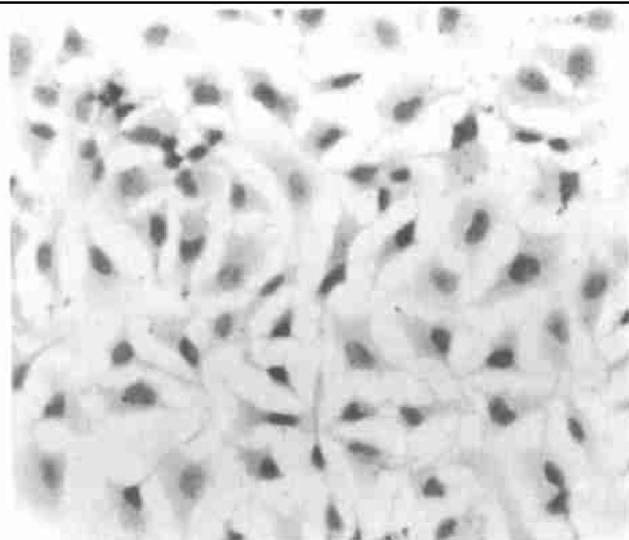


图 2. 溶血磷脂酰胆碱对血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响($\times 200$)

Figure 2. The Photomicrograph of VEGF mRNA after stimulation with 2×10^{-5} mol/L LPC ($\times 200$)

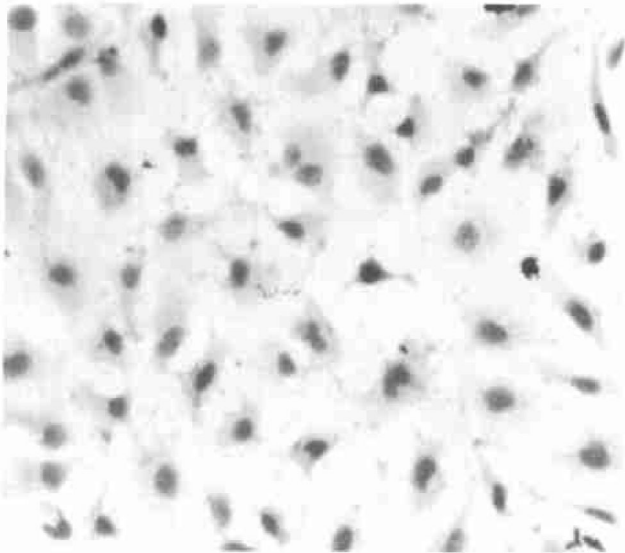


图 3. 丹酚酸 B (1.35×10^{-7} mol/L) 对血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响 ($\times 200$)

Figure 3. The Photomicrograph of VEGF mRNA after stimulation with LPC (2×10^{-5} mol/L) + Sal B (1.35×10^{-7} mol/L) ($\times 200$)

3 讨论

目前普遍认为内皮细胞损伤,使动脉壁通透性增加,脂蛋白易通过内皮,沉积在内皮下,与 As 的早期发展有密切关系^[4]。在诸多引起内皮损伤的有害刺激中,低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白是引起内皮功能紊乱的重要物质^[5,6]。溶血磷脂酰胆碱是氧化型低密度脂蛋白的主要成分。近年来研究发现,溶血磷脂酰胆碱具有细胞毒性,使内皮细胞变性、坏死、脱落,据报道,溶血磷脂酰胆碱引起的细胞损伤与其氧化性有关,维生素 E 可拮抗溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞的损伤作用^[7]。溶血磷脂酰胆碱还可激活血管内蛋白激酶 C 而进一步氧化修饰低密度脂蛋白,使其生成氧化型低密度脂蛋白。

在低密度脂蛋白氧化过程中 40% 磷脂酰胆碱可转变成溶血磷脂酰胆碱。此外,在喂食致 As 饲料的动物模型中发现动脉损伤处测得的溶血磷脂酰胆碱浓度明显升高。因此研究溶血磷脂酰胆碱对内皮细胞表达血管内皮生长因子的影响对于阐明 As 的形成机制有一定的意义。本实验表明,溶血磷脂酰胆碱不仅增加 ECV304 细胞血管内皮生长因子蛋白的表

达,而且能促使血管内皮生长因子 mRNA 高表达,提示在动脉粥样硬化的发生发展过程中,溶血磷脂酰胆碱与血管内皮生长因子可能共同发挥作用。丹酚酸 B 是从丹参水溶性成分丹酚酸中提取出来的有效单体。应用电子自旋共振、电子顺磁共振以及高压液相-电化学检测技术研究表明,丹酚酸 B 在体外自由基生成系统中,对超氧阴离子和羟基自由基有很强的清除作用,其作用比维生素 E、维生素 C 和 Egb761 强^[8,9]。

本实验发现,丹酚酸 B 可明显抑制血管内皮生长因子蛋白及血管内皮生长因子 mRNA 的高表达,提示在预防和治疗动脉粥样硬化的药物中,丹酚酸 B 具有良好的发展前景,其作用机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1998, **98**(20): 2 108-016
- [2] Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**(7): 1 188-196
- [3] 黄诒森, 张均田. 丹参中三种水溶性成分的体外抗氧化作用 [J]. *药学学报*, 1992, **27**(2): 96-100
- [4] Kaneko M, Hayashi J, Saito I, et al. Probecol downregulates E-selectin expression on cultured human vascular endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb*, 1996, **16**: 1 047-051
- [5] Steinberg D, Witatum JZ. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts [J]. *JAMA*, 1990, **264**: 3 047-052
- [6] Steinberg D, Parthasarathy S, Larcw TE, et al. Beyond cholesterol: Aification of low-density lipoprotein that increase it's atherogenicity [J]. *N Engl J Med*, 1989, **320**: 915-924
- [7] Scott M, Colles, Guy MC. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events [J]. *J Lipid Res*, 2000, **41**(8): 1 188-198
- [8] 杜冠华, 张均田. 丹参水溶性成分丹酚酸药理研究进展 [J]. *中国药理学学会通讯*, 1999, **16**(3): 14-16
- [9] 吴兰, 祝其锋, 陈瑗, 等. 丹酚酸 B 对 Cu^{2+} 介导的 LDL 氧化修饰的抑制作用 [J]. *中国老年学杂志*, 1996, **16**(4): 239-242

(此文 2000-10-23 收到, 2001-07-10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)