

车前子多糖对氧化型低密度脂蛋白致人脐静脉 内皮细胞损伤的保护作用

车文文^{1,2} 段丽红³ 张 宁¹ 冯 娜¹ 王素敏^{1*}

(¹ 河北医科大学药理教研室, 石家庄 050017; ² 济南 106 医院, 济南 250022;

³ 石家庄市妇产医院, 石家庄 050011)

摘要 利用 ox-LDL 对培养的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)造成脂质过氧化损伤模型, 探讨车前子多糖(PSP)对 HUVECs 的保护作用及其可能机制。用 MTT 和化学方法, 从细胞水平观察 ox-LDL 对细胞增殖活性、细胞上清液中一氧化氮(NO)含量、胞内一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)含量、SOD 活力; 用 ELISA 和 RT-PCR 技术, 从分子水平观察 ICAM-1 和凋亡相关基因 mRNA 的表达, 探讨不同浓度的 PSP (25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L)对上述指标的影响。结果表明 ox-LDL 导致 HUVECs 损伤, 而伴随 PSP 浓度的增加, HUVECs 增殖活性呈明显升高趋势($P<0.05$); 而 PSP 使 HUVECs MDA 含量显著下降($P<0.05$), SOD、NO 和 NOS 水平明显升高($P<0.05$), ICAM-1、c-myc mRNA 和 p53 mRNA 表达降低, 表明 PSP 对受损的内皮细胞具有保护作用, 其机制可能与抑制 ox-LDL 诱导的 ICAM-1、c-myc mRNA 和 p53 mRNA 的表达有关。

关键词 车前子多糖; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 动脉粥样硬化; 细胞黏附分子-1; c-myc mRNA; p53 mRNA

由动脉粥样硬化(AS)导致的心脑血管疾病已成为当今社会最主要的致死和致残原因, 针对 AS 发生的病理机制所采取的预防和控制研究是目前心血管疾病研究领域的热点和难点问题。高脂血症被认为是 AS 的高危因子之一, 其中氧化型低密度脂蛋白(oxidized Low Density Lipoprotein, ox-LDL)是致 AS 发生的始动因素, 它通过脂质过氧化作用导致内皮细胞受损、分泌多种细胞活性因子和生长因子, 促进平滑肌细胞增殖、单核细胞粘附、血小板聚集和泡沫细胞形成, 最终导致粥样斑块形成^[1,2]。因此, 抑制 ox-LDL 的生成或降低 ox-LDL 对机体的损伤是预防 AS 发生、发展的关键。

现今临床主要应用血管紧张素转换酶抑制剂(ACE-I)、 β -受体阻滞剂、降脂药、超氧化物歧化酶(SOD)等药物治疗, 以试图改善患者受损的内皮功能。但其治疗存在两个主要问题: 其一阻断正常生理功能运行所需的物质; 其二大部分药物对肝脏、肾脏有毒副作用。西方现代医学认为, AS 是属于病因未明的疾病, 最好采用缓解和抑制症状为主的医疗策略。中药作为人类维护健康体系的一个重要组成部分, 大多数是天然药物, 符合“返璞归真”、“回归自然”的潮流, 与生物-心理-社会医学模式相适应。中国药典记载, 车前子为车前科(Plantaginaceae)

植物车前的干燥成熟种子。现代药理研究表明车前子具有许多药理学功能, 我们前期研究发现^[3]车前子的有效成分车前子多糖(PSP)能够抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)的 c-myc mRNA 和 MCP-1 mRNA 表达。除此之外, 车前子多糖是否还能改善内皮功能尚不清楚, 因此, 本研究通过 ox-LDL 对培养的内皮细胞造成体外损伤模型, 探讨 PSP 对内皮细胞的保护作用及其可能机制, 为 AS 的防治提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

脐带由石家庄市妇产医院妇产科提供, ox-LDL 由中国协和医科大学基础医学研究所提供, MDA、SOD、NO、NOS 试剂盒为南京建成生物有限公司产品。胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司, 四甲基偶氮唑盐(MTT)及 DMEM 购自 Sigma 公司, ICAM-1 ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司; DNA

收稿日期: 2010-07-05 接受日期: 2010-10-15

河北省自然科学基金(No.C2007000822)和河北省重点科研(No.20090314)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-86266073, Fax: 0311-86057291, E-mail: wsm001@126.com

1.2.3 MTT 比色法测定 PSP 对 ox-LDL 致 HUVECs 损伤生长的影响 取对数生长期细胞按 5.0×10^5 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中, 置 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 24 h, 按以上分组方法加入终浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 ox-LDL 和不同浓度的 PSP, 继续培养 36 h 后, 加入 MTT 溶液 $20\text{ }\mu\text{l}$ (5 mg/ml) 孵育 4 h 后, 终止培养。吸弃上清液, 每孔加入二甲基亚枫 (DMSO) $150\text{ }\mu\text{l}$, 振荡 10 min 以充分溶解颗粒, 490 nm 波长处测定吸光值 A_{490} , 并计算细胞增殖率。

1.2.4 丙二醛(MDA)含量测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 含量。MDA 可与硫代巴比妥酸结合, 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰, 计算 MDA 含量。

1.2.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 采用黄嘌呤氧化酶 (XO) 法测定 SOD。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$), 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色。当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 测定 A 值, 通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活性。

1.2.6 NO 含量测定 利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 测定 550 nm 处 A_{550} 值, NO 含量用 NO_2^- 含量($\mu\text{mol/L}$)表示。

1.2.7 NOS 活性测定 在 NOS 的催化作用下, L-精氨酸(L-Arg)和分子氧结合生成 NO, 且 NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530 nm 处测定吸光值 A_{530} , 根据 OD 值的大小可计算出 NOS 活力。

1.2.8 ELISA 试剂盒检测 HUVECs 上清液 ICAM-1 的表达 用 Fluo-star 在波长 450 nm 处读取各孔的 A_{450} 值; 以测得的 A_{450} 值为纵坐标, 标准品的浓度为横坐标, 描制曲线图; 最后根据 A_{450} 值计算待测样品的浓度。

1.2.9 RT-PCR 检测各组细胞 c-myc 及 p53 的表达水平 用 TRNzol 一步法按说明书提取各组细胞的总 RNA, 溶于去 RNase 酶水中, 通过紫外透射光计算测定提取液 RNA 纯度 $=A_{260}/A_{280}$ 。选 A_{260}/A_{280} 比值为 $1.8\sim 2.0$ 的 RNA 用作反转录, 分别取总 RNA 各 $1\text{ }\mu\text{g}$, 采用 M-MLV 反转录酶将其反转录成 cDNA。取 cDNA $1\text{ }\mu\text{l}$ 进行 PCR 扩增, 参考 Genbank 上基因序列, 设计引物, 取 PCR 产物 $10\text{ }\mu\text{l}$, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外透射光下观察, 凝胶成像仪摄影, 并扫描灰度, 计算 c-myc/GADPH, p53/GADPH 的比值, 作为相对表达量 (其中 c-myc 上游引物: $5'\text{-tct caa cga}$

cag cag ctc-3' ; 下游引物: $5'\text{-tcg atg ttg ttt ctg tgg aa-3'}$; 扩增片段: 210 bp 。GADPH 上游引物: $5'\text{-cag cta cgg aac tct tgt gc-3'}$; 下游引物: $5'\text{-gat tac aca atg ttt ctc tgt a-3'}$; 扩增片段: 292 bp 。p53 上游引物: $5'\text{-cag tat gta gac aac caa t-3'}$; 下游引物: $5'\text{-ctc tgt ctt aaa tga gaa gta-3'}$; 扩增片段: 302 bp 。GADPH 上游引物: $5'\text{-tgc tcg cgt ccg cca ccg c-3'}$; 下游引物: $5'\text{-gtg gag agc cgt gcg agc-3'}$; 扩增片段: 220 bp)。

1.2.10 统计分析 实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SE}$) 表示, 采用 SPSS(16.0) 分析软件, 多组间差异比较用单因素方差分析, 组间比较用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 PSP 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 损伤细胞水平的影响

2.1.1 MTT 法检测内皮细胞增殖率 四唑盐比色实验 (MTT) 是一种检测细胞存活和生长的方法, 可间接反映活细胞数量, 在一定细胞数范围内, MTT 结晶物形成量与细胞数成正比。

用 MTT 法观察了不同浓度的 PSP 对 ox-LDL 致内皮细胞损伤生长的影响。在 ox-LDL 损伤条件下, 细胞的增殖率明显降低, 与空白对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 用低浓度的 PSP (25 mg/L) 处理的细胞增殖率为 $(9.65 \pm 0.89)\%$, 与 ox-LDL 损伤组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 中浓度 (50 mg/L) 和高浓度 (100 mg/L) 的 PSP 处理组, 其增殖率分别为 $(39.03 \pm 3.35)\%$ 、 $(54.78 \pm 4.03)\%$, 与 ox-LDL 损伤组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$), 并且呈明显的浓度依赖性, 但没有恢复到空白对照组水平 (表 1)。

2.1.2 对 MDA 含量的影响 空白对照组 MDA 含量为 $1.31 \pm 0.39\text{ nmol/ml}$, 在 ox-LDL 损伤的条件下, MDA 含量为 $5.07 \pm 0.78\text{ nmol/ml}$, 与空白对照组相比

Table 1 Effect of PSP on proliferation rate of HUVECs induced by ox-LDL 12 hours was detected by MTT assay ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	n	A_{490}	Proliferation rate (%)
Control	6	0.74 ± 0.10	—
Injury	6	$0.45 \pm 0.04^{**}$	—
PSP (25 mg/L)	6	$0.49 \pm 0.04^{\#}$	9.65 ± 0.89
PSP (50 mg/L)	6	$0.62 \pm 0.06^{##}$	39.03 ± 3.35
PSP (100 mg/L)	6	$0.69 \pm 0.08^{##}$	54.78 ± 4.03

$^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$ vs injury group; $^{##}P < 0.01$ vs injury group.

有显著性差异($P<0.01$); 用不同浓度的 PSP 处理后 MDA 含量分别为 4.61 ± 0.70 nmol/ml、 2.83 ± 0.48 nmol/ml、 1.29 ± 0.31 nmol/ml, 与 ox-LDL 损伤组相比差别显著($P<0.05$), 且有一定的剂量依赖性, 说明 PSP 具有一定的抗氧化作用(表 2)。

2.1.3 对 SOD 含量的影响 从表 2 可以看出, 空白对照组 SOD 活力为 21.65 ± 1.89 U/ml, ox-LDL 损伤组 SOD 活力为 13.97 ± 0.97 U/ml, 不同浓度的 PSP 组 SOD 活力分别为 15.76 ± 1.13 U/ml、 18.58 ± 1.64 U/ml、 20.92 ± 1.78 U/ml, 可见不同浓度的 PSP 组的 SOD 活力均高于 ox-LDL 损伤组 ($P<0.05$), 并无明显的剂量依赖性。

2.1.4 对 NO 含量的影响 PSP 可明显提高 NO 的释放, 并有一定的剂量依赖性, 空白对照组 NO 含量为 69.73 ± 3.35 μ mol/L, ox-LDL 损伤组 NO 含量为 31.71 ± 1.91 μ mol/L, 低浓度的 PSP 组 NO 含量为 46.41 ± 2.25 μ mol/L, 与 ox-LDL 损伤组相比有显著性差异($P<0.05$); 中、高浓度的 PSP 组中 NO 含量分别为 57.68 ± 3.03

μ mol/L、 65.51 ± 3.12 μ mol/L, 与 ox-LDL 损伤组相比有显著性差异($P<0.01$), 见表 3。

2.1.5 对 NOS 含量的影响 从表 3 可以看出, 空白对照组 NOS 活性为 0.99 ± 0.09 U/mg-pro, ox-LDL 损伤组 NOS 活性为 0.31 ± 0.02 U/mg-pro, 低浓度的 PSP 组 NOS 活性提高, 其活性为 0.55 ± 0.06 U/mg-pro, 与 ox-LDL 损伤组相比有显著性差异($P<0.05$); 中、高浓度的 PSP 组的 NOS 活性明显提高, 其活性分别为 0.71 ± 0.07 U/mg-pro、 0.98 ± 0.10 U/mg-pro, 与 ox-LDL 损伤组相比均有显著性差异($P<0.01$), 并呈一定的剂量依赖性。

2.2 PSP 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 损伤分子水平的影响

2.2.1 内皮细胞 ICAM-1 表达的检测 ELISA 试剂盒检测结果显示, 空白对照组 ICAM-1 的表达量为 4.35 ± 0.64 pg/ml, ox-LDL 损伤组 ICAM-1 的表达量为 5.23 ± 0.78 pg/ml, 不同浓度的 PSP 组 ICAM-1 的表达量分别为: 5.13 ± 0.58 pg/ml、 4.28 ± 0.31 pg/ml、 4.36 ± 0.52 pg/ml, 与 ox-LDL 损伤组相比有显著性差异($P<0.05$), 但无明显的剂量依赖性(表 4)。

2.2.2 对 c-myc、p53 的 mRNA 水平的影响 RT-PCR 检测结果表明: PSP 可下调 ox-LDL 致内皮细胞损伤时凋亡相关基因 c-myc(图 4)。

p53(图 5)的 mRNA 水平在 PSP 作用下有下降趋势, 且有一定的剂量依赖性。从表 4 中可以看出, 不同浓度的 PSP 组与 ox-LDL 损伤组比较凋亡相关基因转录水平均有显著性差异($P<0.05$)。

Table 2 Effect of PSP on the content of MDA and the activity of SOD in HUVECs induced by ox-LDL ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	<i>n</i>	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)
Control	6	1.31 ± 0.39	21.65 ± 1.89
Injury	6	$5.07\pm0.78^{**}$	$13.97\pm0.97^{**}$
PSP (25 mg/L)	6	$4.61\pm0.70^{\#}$	$15.76\pm1.13^{\#}$
PSP (50 mg/L)	6	$2.83\pm0.48^{\#}$	$18.58\pm1.64^{\#}$
PSP (100 mg/L)	6	$1.29\pm0.31^{\#}$	$20.92\pm1.78^{\#}$

** $P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs injury group.

Table 3 Effect of PSP on the content of NO and the activity of NOS in HUVECs induced by ox-LDL ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	<i>n</i>	NO(μ mol/L)	NOS(U/mg-pro)
Control	6	69.73 ± 3.35	0.99 ± 0.09
Injury	6	$31.71\pm1.91^{**}$	$0.31\pm0.02^{**}$
PSP (25 mg/L)	6	$46.41\pm2.25^{\#}$	$0.55\pm0.06^{\#}$
PSP (50 mg/L)	6	$57.68\pm3.03^{**}$	$0.71\pm0.07^{**}$
PSP (100 mg/L)	6	$65.51\pm3.12^{**}$	$0.98\pm0.10^{**}$

** $P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs injury group; ** $P<0.01$ vs injury group.

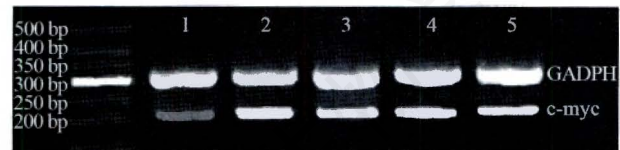


Fig.4 Electrophoresis of RT-PCR, mRNA expression of c-myc and GADPH in HUVECs induced by ox-LDL

1: control; 2: injury; 3: 25 mg/L PSP+ox-LDL; 4: 50 mg/L PSP+ox-LDL; 5: 100 mg/L PSP+ox-LDL.

Table 4 Effect of PSP on ICAM-1, c-myc and p53 expression in HUVECs induced by ox-LDL ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	ICAM-1(pg/ml)	c-myc	p53
Control	4.35 ± 0.64	0.2029 ± 0.0225	0.1839 ± 0.0122
Injury	$5.23\pm0.78^{**}$	$0.3094\pm0.0572^{**}$	$0.2841\pm0.0203^{**}$
PSP (25 mg/L)	$5.13\pm0.58^{\#}$	$0.2837\pm0.0482^{\#}$	$0.2594\pm0.0371^{\#}$
PSP (50 mg/L)	$4.28\pm0.31^{\#}$	$0.2792\pm0.0457^{**}$	$0.2278\pm0.0197^{**}$
PSP (100 mg/L)	$4.36\pm0.52^{\#}$	$0.2705\pm0.0323^{**}$	$0.2189\pm0.0210^{**}$

** $P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs injury group; ** $P<0.01$ vs injury group.

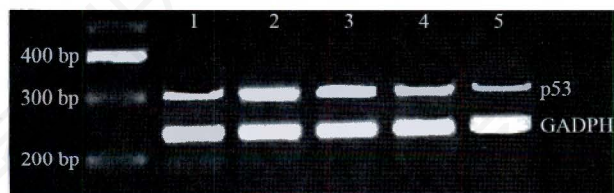


Fig.5 Electrophoresis of RT-PCR, mRNA expression of p53 and GADPH in HUVECs induced by ox-LDL

1: control; 2: injury; 3: 25 mg/L PSP+ox-LDL; 4: 50 mg/L PSP+ox-LDL; 5: 100 mg/L PSP+ox-LDL.

3 讨论

AS 是严重威胁人类健康的疾病之一。研究表明血管内皮细胞氧化损伤是 AS 发生的始动环节, ox-LDL 是导致血管内皮细胞氧化损伤的重要物质, ox-LDL 可通过多种途径启动和加速 AS 的发展, 诸如内皮损伤和粘附性增强、单核细胞分化、平滑肌细胞增殖等方面^[4-6]。研究亦表明, ox-LDL 不仅使细胞膜上本身自由基的浓度增加, 还可以使细胞抗氧化酶类等防御系统受到抑制和损伤^[7]。随着天然疗效和天然药物的兴起, 中药学越来越受到人们的关注。多糖具有高专一性、低毒副作用的特点, 有降低血脂、调节血糖及免疫调节等功效^[8,9], 现研究发现多糖对动脉血管壁的重构亦有重要作用^[10]。

本实验通过 MTT 法检测, 利用活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶使外源性的 MTT 还原为蓝紫色结晶并沉淀在细胞内, 而死细胞没有此功能, 通过测定其吸光度值, 间接反映细胞的增殖与存活。结果显示, ox-LDL 使内皮细胞增殖率下降, 加入不同浓度的 PSP 组与 ox-LDL 损伤组相比使细胞增殖率提高, 即减弱了 ox-LDL 对细胞活性的损伤, PSP 对内皮细胞损伤时的修复具有重要作用, 表明 PSP 的抗氧化作用部分是通过提高内皮细胞的增殖率实现的。

在观察 PSP 的保护作用时, 检测了生化指标 MDA 含量和 SOD 的活性, 本实验中 ox-LDL 组 MDA 水平明显升高, SOD 活性显著下降。PSP 可以降低 ox-LDL 致细胞损伤时 MDA 含量水平, 提高 SOD 活性, 说明 ox-LDL 可使内皮细胞发生脂质过氧化, 而经 PSP 预处理的内皮细胞抵抗 ox-LDL 的能力增强。可能是因为在 ox-LDL 使细胞发生脂质过氧化反应中, 由于 PSP 阻断脂质过氧化产物形成, 抑制其在膜内形成交联, 避免了膜成分多聚化和流动性的改变, 维持细胞膜的通透性, 从根本上稳定了细胞膜结构, 减轻了脂质过氧化产物对内皮细胞的损害^[11,12]; 抑制了

自由基连锁反应, 使生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸未受到氧化, 避免了细胞膜上蛋白质的空间构型发生改变, 使细胞保持一定的生理功能^[13-15]。

在观察 PSP 的保护和抗氧化作用时, 还通过检测 NO 含量和细胞内 NOS 表达观察到: ox-LDL 损伤组明显抑制了 NO 释放和 NOS 表达, 与 ox-LDL 损伤组相比, 不同浓度的 PSP 均可使 NO 释放增多、NOS 表达增高。NO 既是一种有细胞毒性的效应分子, 又是生物体内许多部分的信号分子, 是血管源性松弛因子的主要成分, 在维持血管张力, 抑制血管平滑肌增殖及血小板粘附方面起着重要作用^[16,17]。当 ox-LDL 损伤内皮细胞时, NO 释放减少, 而 NO 可抑制单核细胞与内皮细胞黏附, NO 的减少增加了两种细胞的黏附性, 使细胞迁移进入动脉内膜, 转化为巨噬细胞, 诱导内皮细胞和平滑肌细胞增生、移行^[18]; 促进血小板黏附、聚集形成血栓, PSP 可阻断此抑制, 不同浓度的 PSP 均可使 NO 释放增多, 说明 PSP 对内皮细胞的保护和抗氧化作用是通过提高 NO 的释放实现的。内皮细胞有两种 NOS, 即 NOS2(诱导型)、NOS3(内皮型), 外在刺激可诱导 NOS 活性或表达, 影响 NO 合成和释放, 进而引发炎症级联反应, 导致一系列疾病的发生和发展^[19,20]。推测 PSP 使 NO 释放增多和 NOS 表达增高的机制: (1)直接激活 NOS。李兴琴等^[21]通过体外实验证实车前子能激活 NOS, 使 NO 合成和释放增加, 并有剂量依赖性; (2)拮抗 NOS 抑制剂。将车前子作用于 NOS 抑制剂 L-NAME 诱导的高血脂大鼠后, 发现车前子能阻止 L-NAME 诱导的高脂血症, 证实车前子能拮抗 NOS 抑制剂, 进而使 NO 释放增多和 NOS 表达增多^[22]; 说明 PSP 能平衡 NO 生成及 NOS 的表达, 推测 PSP 在许多疾病发展过程中, 也可能有保护作用, 还有待进一步的研究。

同时通过 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清液中 ICAM-1 表达的变化, 以期初步探索 PSP 对损伤细胞的影响, 结果显示, ox-LDL 损伤组 ICAM-1 的表达明显增高, 不同浓度的 PSP 组与 ox-LDL 损伤组相比均使 ICAM-1 的表达降低。ICAM-1 是血管内皮细胞表达的一种黏附分子, 主要分布于细胞膜表面, 介导白细胞与内皮细胞之间相互作用的单链糖蛋白, 正常情况下有低水平表达, 可通过与纤维蛋白原和透明质酸结合, 参与细胞的增殖与迁移^[23]。Poston 等^[24]首次证实 AS 病变中内皮细胞 ICAM-1 表达增高, 认为 ICAM-1 在内皮细胞的表达与单核细胞、淋巴细胞向内皮迁移、增殖和黏附有关。结果表明 PSP 能

下调 ICAM-1 的表达, 抑制 ICAM-1 的生成, 从而使细胞与细胞间, 细胞与基质间的黏附趋于正常, 抑制了 AS 早期单核细胞与血管内皮细胞的黏附与迁移, 说明 PSP 在 AS 形成早期可能有一定的保护作用。

本实验通过 RT-PCR 研究了 PSP 作用于内皮细胞后某些凋亡相关基因 mRNA 的改变情况, 以期进一步从分子水平探索 PSP 的作用。结果显示, PSP 能影响 c-myc、p53 等相关基因 mRNA 的表达。首先, ox-LDL 损伤组 p53 mRNA 的表达明显上调, 不同浓度的 PSP 组 p53 mRNA 的表达较 ox-LDL 损伤组比较呈下降趋势。磷酸化的 p53 是一种转录因子, 在细胞凋亡和 DNA 修复中起着重要作用。当有外在因素引起细胞凋亡时, 需要 p53 的存在, 其作用主要是涉及其它凋亡控制因素^[25]。p53 是在 G₁ 期监视细胞基因组 DNA 的完整性, 在细胞周期的调控上起检查点的作用, 说明 PSP 提高细胞的增殖率抑制细胞的凋亡很可能与 p53 的表达有关^[26]。实验还发现, 用 ox-LDL 作用内皮细胞后, 细胞 c-myc mRNA 的表达明显上调, 不同浓度的 PSP 组 c-myc mRNA 的表达较 ox-LDL 损伤组比较呈下降趋势, 说明 PSP 能显著影响内皮细胞 c-myc 的 mRNA 表达。目前普遍认为细胞发生凋亡时, c-myc 高水平表达^[27], 作为转录调节因子, c-myc 激活介导凋亡的基因, 若接受附加存活因素的存在, 细胞增殖占优势, 否则细胞就发生凋亡。通过本实验说明, PSP 是附加于细胞存活的外在因素, 使细胞抗氧化能力增强, 免受自由基的损害, 从而使细胞的增殖率升高、抑制细胞的凋亡。

参考文献(References)

- Steinberg D, Witztum JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.
- Jialal I, Michael A, Diane W. β -carotene inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1086: 134-8.
- 张宁, 王素敏, 车文文, 张然, 郭璠, 徐斯佳. 车前子多糖抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞增殖及其机制. *细胞生物学杂志* 2009; 31(5): 683-8.
- Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD, *et al.* Impairment of endothelium dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344(2): 160-2.
- Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M, *et al.* Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(2): 904-8.
- Frostegard J, Haegerstrand A, Gidlund M, Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* 1991; 90(3): 119-26.
- Koba S, Pakala R, Watanabe T, Katagiri T, Benedict CR. Synergistic interaction between thromboxane A₂ and mildly oxidized low density lipoproteins on vascular smooth muscle cell proliferation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 30(63): 329-35.
- Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, *et al.* LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000; 87(1): 99-105.
- Hermenegildo C, Oviedo PJ, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315(2): 722-8.
- Ou HC, Chou FP, Lin TM, Yang CH, Sheu WH. Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(9): 1485-95.
- Kinumi T, Ogawa Y, Kimata J, Saito Y, Yoshida Y, Niki E, *et al.* Proteomic characterization of oxidative dysfunction in human umbilical vein endothelial cells induced by exposure to oxidized LDL. *Free Radic Res* 2005; 39(12): 1335-44.
- Stepp DW, Merkus D, Nishikawa Y, Chilian WM. Nitric oxide limits coronary vasoconstriction by a shear stress-dependent mechanism. *J Am J Physiol* 2001; 281(2): H796-803.
- Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Zhang S. Insulin inhibits migration of vascular smooth muscle cells with inducible nitric oxide synthase. *Hypertension* 2000; 35(1 Pt 2): 303-6.
- Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee M, *et al.* Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr* 2005; 93(5): 581-91.
- Chiu GN, Bally MB, Mayer LD. Targeting of antibody conjugated, phosphatidylserine-containing liposomes to vascular cell adhesion molecule for controlled thrombogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1613(1-2): 115-21.
- Amberger A, Maczek C, Jürgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, *et al.* Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress Chaperones* 1997; 2(2): 94-103.
- Fan YR, Liu H, Xue LZ. The effect of oxidized low density lipoprotein on releasing Nitric Oxide from cultured endothelial cells. *Chin J Arterioscler* 1999; 7(4): 345-7.
- Lum H, Barr DA, Shaffer JR, Gordon RJ, Ezrin AM, Malik AB, *et al.* Reoxygenation of endothelial cells increases permeability by oxidant dependent mechanisms. *Circ Res* 1992; 70(5): 991-8.
- CHen LX, Yu L, Liao DF. Effects of ramiprilat on vascular endothelial cells damage by oxidized low density lipoproteins. *Chin J Arterioscler* 1998; 6(1): 18-21.
- Zhang JM, Guo J, Tu X, Shi ZH, Hao JJ, Ke YH, *et al.* Protective effect of Huaxia shallot preparation on human umbilical vein endothelial cell injury induced by oxidized low density lipoprotein and its mechanism. *J Chinese Integrative Medicine* 2007; 5(6): 675-80.
- 李兴琴, 张杰, 王素敏. 车前子对高脂血症大鼠血清一氧

- 化氮的影响。四川中医 2004; 122(10): 8-9.
- 22 Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidised LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(2): 264-71.
- 23 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. *重庆医学* 2003; 1(32): 6-8.
- 24 Poston R, Foster PA, Costa SK, Brain SD. Endothelial cells play an essential role in the thermal hyperalgesia induced by nerve growth factor. *FASEB J* 2003; 17(12): 1703-5.
- 25 Lian ZQ, Zhao DL, Zhu HB. Hydroxysafflor yellow A up-regulates HIF-1 α via inhibition of VHL and p53 in Eahy 926 cell line exposed to hypoxia. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2008; 43(5): 484-9.
- 26 Liu WH, Song JN, Chen G. Effect of Li Shui Tiao Zhi Capsule (LSTZ) on apoptosis of endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein and expression of Bcl-2, Bax, p53 and Caspase-3. *Traditional Chinese and Western Medicine Journal of Cardio Cerebral Vascular Disease* 2003; 2(2): 68-70.
- 27 Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, *et al.* C-myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002; 9(5): 1031-44.

Protection Effect of Plantain Seed Polysaccharid on Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injury Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

Wen-Wen Che^{1,2}, Li-Hong Duan³, Ning Zhang¹, Na Feng¹, Su-Min Wang^{1*}

(¹Pharmacology Department, Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Jinan 106 Hospital, Jinan 250022, China; ³Shijiazhuang Obstetrics and Gynecology Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract To investigate the protective effect of PSP on the oxidized low density lipoprotein-induced lipid peroxidation injury HUVECs model and study possible mechanism, ox-LDL-induced injury HUVECs were used. We used different experimental methods to analyze the following parameters: proliferation rate, NO content, NOS activity, MDA content, SOD vitality of HUVECs by MTT assay and chemical methods in the cellular level; ICAM-1 expression and apoptosis-related gene mRNA was assessed by ELISA and RT-PCR in the molecular level. Finally, we observed that different concentrations of PSP decreased the ox-LDL-induced MDA content, and increased the ox-LDL-induced SOD, NO and NOS activity and the expression of ICAM-1 by ELISA, c-myc mRNA and p53 mRNA by Polymerase Chain Reaction (PCR), which indicates PSP had the protective effect of ox-LDL-induced endothelial cell injury, which is related to the down-regulated expression of ICAM-1, c-myc mRNA and p53.

Key words plantain seed polysaccharide; ox-LDL; HUVECs; AS; ICAM-1; c-myc mRNA; p53 mRNA

Received: July 5, 2010 Accepted: October 15, 2010

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2007000822) and Hebei Province Key Scientific Research (No.C20090314)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86266073, Fax: 86-311-86057291, E-mail: wsm001@126.com