卡维地洛对 ox-LDL 诱导的人主动脉内皮细胞氧化损伤的保护作用*

文 波[1,2**]，张彦燕[1,2]，徐旖旎[1,2]，杨光燕[1,2]，陈 妍[1,2]，陶 玲[1]，沈祥春[1,2***]
(1. 贵州医科大学 天然药物资源优效利用重点实验室，贵州 贵阳 550004；2. 贵州医科大学 中药药理教研室，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**：研究卡维地洛(CAR)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人主动脉内皮细胞(HAECs)损伤的保护作用。**方法**：体外培养 HAECs，分为对照组、模型组、CAR 高剂量组(CAR H 组)和 CAR 低剂量(CAR L 组)，即对照组(无血清 DMEM)、模型组(200 mg/L ox- LDL 100 μL)、CAR 高剂量组(CAR H 组，200 mg/L ox-LDL 及 1×10^{-5} mol/L CAR 各 100 μL)及 CAR 低剂量组(CAR L 组，200 mg/L ox- LDL 及 1×10^{-6} mol/L CAR 各 100 μL)，后两组 CAR 预保护 1 h 后，加入 ox-LDL 作用 24 h；采用 MTT 法分析细胞存活率，吉姆萨(Giemsa)染色后观察 HAECs 形态；酶联免疫吸附法(ELISA)检测培养液中一氧化氮(NO)含量及乳酸脱氢酶(LDH)外漏量。**结果**：模型组与对照组相比，细胞发生严重的病理形态学改变，细胞存活率及 NO 含量显著降低，LDH 外漏量显著升高($P<0.05$)，CAR H 组和 CAR L 组细胞接近对照组，细胞存活率及 NO 含量较模型组显著提高，LDH 外漏量显著降低($P<0.05$)。**结论**：CAR 能减少 ox-LDL 诱导的 HAECs 损伤，其作用可能与 NO 系统有关。

[关键词] 卡维地洛；氧化低密度脂蛋白；主动脉；内皮，血管；氧化损伤
[中图分类号] R972.4 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2015)08-0789-04

Protective Effect of Carvedilol against Ox-LDL Induced Oxidative Injury of Human Aortic Endothelial Cells *in vitro*

WEN Bo[1,2], ZHANG Yanyan[1,2], XU Yini[1,2], YANG Guangyan[1,2], CHEN Yan[1,2], TAO Ling[1], SHEN Xiangchun[1,2]
(*1. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Chinese Medicine Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the protective effect of carvedilol (CAR) against oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced human aortic endothelial cells (HAECs) injury. **Methods**: HAECs were cultured *in vitro*, randomly divided into four groups: control group (serum free DMEM), model group (200 mg/L ox-LDL 100 μL), carvedilol high dose group (CAR H group, 200 mg/L ox-LDL and 1×10^{-5} mol/L CAR) and carvedilol low dose group (CAR L group, 200 mg/L ox-LDL and 1×10^{-6} mol/L CAR). Two latter groups preincubated with carvedilol for 1 h and add ox-LDL for 24 h; adopting MTT assay to analyze cell viability, HAECs morphology was observed by Giemsa staining. The contents of nitric oxide (NO) and the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results**: Comparing model group with control group, cells underwent severe pathomorpholohy change, cell viability and NO content decreased significantly, LDH leakage increased significantly($P<0.05$), cells of CAR H group and CAR L group were similar to control group, cell viability and NO content increased more than model group, LDH leakage

*[基金项目]国家自然科学基金(No. 81360650)；贵州省普通高等学校创新团队[黔教合人才团队字(2014)31]；贵州省高层次创新性人才培养[黔科合人才(2015)4029 号]；大学生创新创业项目(No. 201410660017)；贵州省 2011 计划[黔教合协同创新字(2013)04]；贵州省科技青年英才[黔省专合字(2012)161 号]

**贵州医科大学 2013 级硕士研究生
***通信作者 E-mail：shenxiangchun@126.com

网络出版时间：2015－07－12 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150712.0932.028.html

decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion**: Carvedilol could ameliorate the HAECs injury induced by ox-LDL, which maybe involve in NO system.

[**Key words**] cardiavascular agents; carvedilol; oxidized low density lipoprotein; aorta; endothelium, vascular; oxidative injury

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是导致心血管疾病发生的最主要的始发病因和病理学基础,涉及多种细胞功能及血液成分的变化[1],血管内皮细胞作为血液与血管壁间的天然屏障,其损伤造成的内皮功能障碍是 AS 的始动环节[2]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可引起内皮受损或功能失调,还可引起脂代谢异常,内膜受损,脂点脂纹形成,继而出现纤维斑块和粥样斑块[3-5],从而导致 AS 的发生。因此,保护内皮功能对防治 AS 尤为重要。卡维地洛(carvedilol, CAR)为 α 和 β 受体阻断剂,具有抗交感活性、钙通道阻滞作用以及抗自由基、抗氧化作用[6],在临床上已经被证实可用于抗心肌缺血,抗心律失常等[7-10]。除此之外,CAR 还可作用于内皮细胞,发挥其保护作用[11]。AS 发生与内皮细胞损伤密切相关,且涉及很多机制,包括炎性因子诱导的炎症反应,脂质过氧化诱导的黏附分子表达增加,单核-内皮细胞黏附等。保护内皮细胞结构和功能的完整性,有利于减少 AS 的发生。本实验观察 CAR 对 ox-LDL 诱导人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs)氧化损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人主动脉内皮细胞(HAECs),内皮细胞培养液(ECM)、胰蛋白酶、中和液及冻存液均购自美国 Sciencell 公司,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,北京协生生物科技有限责任公司),CAR 标准品(中国药品生物制品检定所,批号:100730-200401),二甲基亚砜(DMSO,北京鼎国生物技术有限责任公司),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(齐一生物科技上海有限公司),CK40-F200 倒置显微镜(日本 OYMPUS 公司),HF-240 细胞培养箱(上海 Heal Force 公司),ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 GE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HAECs 培养 复苏 HAECs,置于含 ECM(由 5% 灭活胎牛血清、100 U 青霉素、100 mg/L 链霉素配制而成)3 mL 的一次性培养瓶中于 37 ℃,5% CO_2 恒温饱和湿度的培养箱中培养,取 3~5 代细胞进行实验。

1.2.2 确定 ox-LDL 诱导 HAECs 损伤的浓度和时间 HAECs 计数后以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL。采用无血清 DMEM 培养基(每孔 200 μL)同步化 12 h 后,分别加入 0、50、100、200、300、400、600 mg/L ox-LDL 作用 24 h,采用 MTT 法分析 HAECs 的存活率,实验重复 3 次。随着 ox-LDL 浓度增加,细胞存活率明显降低,根据存活率选取 200 mg/L(存活率约 70%)作为 ox-LDL 损伤 HAECs 的最佳浓度。

1.2.3 分组及处理 实验分为对照组、模型组、CAR 高剂量组(CAR H 组)及 CAR 低剂量组(CAR L 组),对照组加无血清 DMEM 200 μL,模型组加 DMEM 100 μL 及 200 mg/L ox-LDL 100 μL,CAR H 组加 200 mg/L ox-LDL 和 1×10^{-5} mol/L CAR 各 100 μL,CAR L 组加 200 mg/L ox-LDL 和 1×10^{-6} mol/L CAR 各 100 μL。

1.2.4 MTT 法分析细胞存活率 CAR H 组和 CAR L 组加入 CAR 预保护 1 h 后,加入 ox-LDL 继续作用 24 h。每孔加入 5 g/L MTT 20 μL,孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测定各孔吸光度值,结果以 OD 表示。每组设 6 个复孔,实验重复 3 次。细胞存活率 =(实验组 OD_{490nm} - 调零组 OD_{490nm})/(对照组 OD_{490nm} - 调零组 OD_{490nm})×100%。

1.2.5 细胞形态 吉姆萨染色按照说明书进行,待细胞染色后于倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.6 NO 含量及 LDH 外漏量 将 HAECs 接种于 96 孔板,按 1.2.3 方法分组处理后收集培养液上清,-20 ℃冰箱保存,备测。参照试剂盒说明书测定培养上清液中 NO 含量以及 LDH 外漏量。

1.3 统计学分析

所有数据用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。方差齐采用 t 检验,方差不齐采用秩和检验,$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　HAECs 存活率

ox-LDL 作用 24 h 后，模型组与对照组比较，细胞存活率显著降低（$P<0.05$）。CAR H 组和 CAR L 组较模型组细胞存活率显著提高（$P<0.05$），见表 1。

表 1　各组 HAECs 存活率（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 1　The viability rate of HAECs in each group

组别	HAECs	
	OD 值（490 nm）	存活率（%）
对照组	0.323 ± 0.017	100
模型组	0.229 ± 0.013[(1)]	70.9
CAR H 组	0.307 ± 0.032[(2)]	95.0
CAR L 组	0.289 ± 0.015[(2)]	89.5

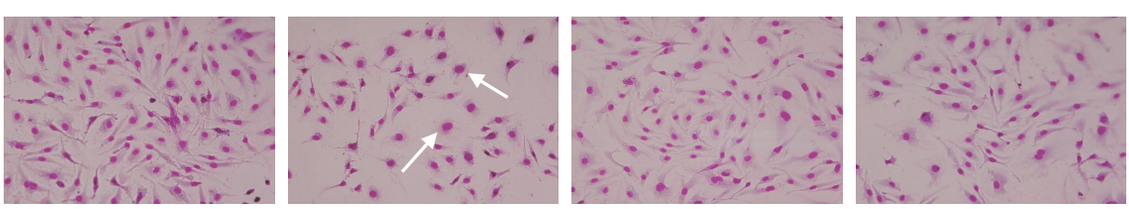
[(1)] 与对照组比较，$P<0.01$；[(2)] 与模型组比较，$P<0.01$

2.2　HAECs 的形态学改变

经 Giemsa 染色后，细胞核染为蓝紫色，胞浆染成淡粉红色。对照组细胞数目较多，胞间连接紧密，成多角形或梭型，核多偏向一侧；模型组细胞数目明显减少，胞间隙明显增大，胞核居中，包体膨大，形态异于正常，表现出细胞凋亡的形态学特征；与模型组相比较，CAR H 组和 CAR L 组细胞形态接近于正常，说明 CAR 能明显抑制 ox-LDL 对 HAECs 的损伤。见图 1。

2.3　NO 含量及 LDH 外漏量

与对照组比较，模型组 NO 含量显著性降低（$P<0.01$），而加入高低剂量 CAR 后，都能显著增加 NO 含量（$P<0.01$）；与对照组比较，模型组 LDH 外漏量明显增加（$P<0.01$），而加入高低剂量 CAR 后能显著降低 LDH 外漏量（$P<0.05$）。见表 2。



对照组　　模型组　　CAR H 组　　CAR L 组

图 1　各组 HAECs 形态（Giemsa，×200）

Fig. 1　Giemsa staining of HAECs cells

表 2　各组 HAECs 中 NO 含量及 LDH 外漏量（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 2　NO content and LDH leakage of HAECs in each group

组别	NO（μmol/L）	LDH（U/L）
对照组	189.3 ± 22.13	35.118 ± 9.32
模型组	134.5 ± 10.23[(1)]	69.410 ± 7.29[(1)]
CAR H 组	179.8 ± 18.02[(2)]	44.283 ± 6.73[(2)]
CAR L 组	168.7 ± 12.13[(2)]	49.345 ± 9.76[(3)]

[(1)] 与对照组比较，$P<0.01$；与模型组比较，[(2)] $P<0.01$，[(3)] $P<0.05$

3　讨论

EC 是位于血管壁和血流间的单层扁平细胞[12]，不仅是血管壁与血液之间的机械屏障，而且具有维持血管通透性、血管张力、选择性屏障、抗凝、活性物质代谢及正常血液流动等功能。EC 损伤可导致血管张力、血流动力学改变及血管通透性增加[13-14]。其损伤被认为是促使 AS 形成的关键环节。ox-LDL 是导致血管内皮氧化损伤的主要因素，其通过诱导血管内皮细胞及单核巨噬细胞表达黏附分子、趋化因子等，介导白细胞的滚动作用，将其定于内皮细胞表面，促进泡沫细胞形成，使内膜增厚进而引发动脉粥样硬化[15]，从而导致心血管疾病的发生。因此，本实验采用 ox-LDL 来建立 HAECs 的损伤模型。

采用 MTT 分析法，摸索药物作用最佳浓度和时间，有利于更好地探讨药物是否发挥作用。Giemsa 染色能从形态学上对细胞病理改变情况进行分析。NO 作为 EC 合成并分泌的血管源性舒张因子，经 NOS 催化 L-精氨酸而生成，是心血管系统功能重要的调节因子。其能在生理情况下抑制平滑肌细胞增殖及向血管内膜下迁移；抑制血小板黏附及聚集功能，阻止血栓形成；抑制脂质过氧化及氧自由基的产生，使细胞免受超氧阴离子损伤[16]，从而能减少 AS 的发生。LDH 作为细胞标志性代谢相关酶，是目前细胞损伤的标志物之一。LDH 在

细胞受到损伤后,从细胞内释放到细胞膜外,通过测定其在细胞外的含量,能反应细胞受损程度。本实验给予 ox-LDL 后,细胞存活率显著下降,细胞发生严重的病理形态学改变,NO 含量降低,LDH 外漏量明显增加。采用 CAR 预保护 1 h,细胞存活率显著增加,细胞逐渐恢复至正常形态,NO 含量增加,LDH 外漏量明显减少。

综上所述,CAR 能改善内皮功能状态,对 ox-LDL 诱导的 HAECs 氧化损伤具有保护作用,其作用可能与 NO 系统有关。

4 参考文献

[1] 王道艳, 王志, 张峥,等. 齐墩果酸对 ox-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2014(6):487 – 489.

[2] Vogiatzig, Tousoulisd, Stefanadisc. The role of oxidative stress in atherosclerosis [J]. Hellenic J Cardiol, 2009(5):402 – 409.

[3] 吕铁伟, 孙慧超, 张蕾,等. ox-LDL 抑制大鼠骨髓间充质干细胞的体外增殖和 Oct-4 表达[J]. 重庆医学, 2014(14):1737 – 1740.

[4] Chu L, Hao H, Luo M, et al. Ox-LDL modifies the behaviour of bone marrow stem cells and impairs their endothelial differentiation via inhibition of Akt phosphorylation [J]. J Cell Mol Med, 2011(2):423 – 432.

[5] Charo I F, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011(5):365 – 376.

[6] Kosior DA, Brodowski K, Krzykwa A, et al. Role of inflammation in etiology of atrial fibrillation-is lone arrhythmia really alone [J]. Wiad Lek, 2012(4):255 – 258.

[7] 刘淑萍. β 受体阻滞剂在急性心肌梗死中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2013(12):2995 – 2998.

[8] La Mura V, Colombo M. Bacterial translocation and nonselective β-blockers in portal hypertension: Where we are, What still we need [J]. Gastroenterology,2014: Epub ahead of print.

[9] 李露. β 受体阻滞剂预防心力衰竭患者心脏性猝死的研究进展[J]. 重庆医学, 2012(17) : 1768 – 1771.

[10] 胡和生, 闫素华. 室性心律失常的交感神经机制诊疗进展[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013(23):10861 – 10863.

[11] 张健, 魏欣冰, 丁华, 等. 卡维地洛对过氧化氢致血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006(5):620 – 624.

[12] 张霞, 金惠敏. 慢性肾脏病与血管内皮细胞功能的研究进展[J]. 上海交通大学报, 2012(4): 528 – 532.

[13] 薛建峰, 赵成军, 贾如意. 血管内皮损伤标志物[J]. 医学综述, 2006(8):461 – 463.

[14] 邱雅慧. 血管内皮细胞的功能以及损伤修复与动脉粥样硬化[J]. 中国组织工程研究与临床康复综述, 2007(11):1927 – 1929.

[15] 王桂霞. 血管内皮细胞损伤机制及其药物保护作用的研究进展[J]. 辽宁医学院学报, 2008(5):466 – 468.

[16] Grassi D, Desider G, Ferri C. Cardiovascular risk and endoendithelial dysfunction: the preferential route for athersosclerosis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011(9):1343 – 1353.

(2015-04-07 收稿,2015-06-15 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 788 页)

[3] 李博,李卫华. SREBPs 信号转导途径与动脉粥样硬化研究进展[J]. 心血管病学进展, 2011(6):876 – 879.

[4] Ning Sun, Hui Wang, Lin Wang,et al. aspin alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015(1):482 – 489.

[5] Sarah Kraus PhD, Inna Naumov PhD, Shiran Shapira PhD,et al. aspirin but not meloxicam attenuates early atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice[J]. 2014(16):233 – 238.

[6] 李敏,蒋兴亮. 痛风与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010(10):1133 – 1135.

[7] Hou HF, Yuan N, Guo Q,et al. Citreoviridin Enhances Atherogenesis in Hypercholesterolemic ApoE-Deficient Mice via Upregulating Inflammation and Endothelial Dysfunction[J]. PLOS ONE, 2015(5):1 – 13.

[8] Muhammad R. Marwali, Chang-Ping Hu, Bhavna Mohandas,et al. Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1,Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling[J]. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2007(3):1324 – 1332.

[9] 张新金,马业新,文渊,等. 促红细胞生成素通过 PI3- K/Akt 信号通路抑制血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心脏成纤维细胞增殖[J]. 中国病理生理杂志, 2009(2):293 – 298.

(2015-05-10 收稿,2015-06-12 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅