

山楂叶总黄酮对血管内皮细胞氧化损伤的保护作用

叶希韵 王耀发(上海 200062 华东师范大学生物系)

摘要 目的:研究溶血磷脂酰胆碱(LPC)和氧自由基(OFR)对血管内皮细胞(VEC)的损伤,及山楂叶总黄酮对损伤后 VEC 的保护作用。方法:以体外培养的小牛主动脉内皮细胞为材料,测定 LPC 或黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶(X+XO)与 VEC 的作用,以及加入不同浓度的山楂叶总黄酮后,对细胞乳酸脱氢酶(LDH)的泄漏量,细胞丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)的含量及对细胞增殖的影响。结果:当 VEC 与 LPC(5ug/ml)或黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶(X+XO)(10umol/L+200umol/L)共孵育 24h 时,表现为细胞 LDH 泄漏量增多,细胞内 MDA 含量升高,NO 含量减少,细胞生长减缓,存活率下降;当加入不同浓度的山楂叶总黄酮后则可明显抑制细胞 LDH 的泄漏量,降低 MDA 含量,提高 NO 的含量,细胞生长正常,存活率提高。结论:山楂叶总黄酮能通过抗氧化途径对 LPC 与 X+XO 所致 VEC 的氧化损伤起保护作用。

关键词 山楂叶总黄酮;血管内皮细胞;溶血磷脂酰胆碱;氧自由基

Protective Effects of Hawthorn Leaves Flavonoids on Oxidation Induced Damages of Vascular Endothelial Cells in Vitro

Ye Xiyun, Wang Yaofa(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To investigate protective effects of hawthorn leaves flavonoids(HLF) on the bovine vascular endothelial cells damaged by lysophosphatidylcholine(LPC) or oxygen free radicals(OFR). **METHOD:**The effects of vascular endothelial cells(VEC) were determined by the lactate dehydrogenase(LDH) release, the contents of malondialdehyde(MDA) and nitric oxide(NO) and the proliferation of VEC. **RESULTS:**When VEC were incubated with LPC(5ug/ml) or xanthine and xanthine oxidase(X+XO)(10umol/L+200umol/L) for 24 hours, the contents of LDH and MDA were markedly increased and the NO were reduced. the VEC grew slowly. Treatment with different concentrations of HLF caused a reduction in LDH and MDA contents and the NO contents were increased. but the VEC grew normally. **CONCLUSION:**The results showed that HLF afforded protection against VEC damages induced by LPC or X+XO and the protective effect of HLF may be due to anti-lipid peroxidation via free radical scavenging activity. **KEY WORDS** hawthorn leaves flavonoids, vascular endothelial cells, lysophosphatidylcholine, oxygen free radicals

血管内皮细胞参与了动脉粥样硬化(AS)的发生和发展,血管内皮损伤是导致内皮细胞功能障碍的主要原因。研究已证实^[1-2],氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)在血管内皮细胞(VEC)的损伤中是一个关键的成分,血液中一旦形成了 Ox-LDL,就可以直接损伤血管内皮,促进 AS 的形成。由于溶血磷脂酰胆碱(LPC)是 Ox-LDL 致 AS 的重要脂质成分,AS 发生过程中血浆 LPC 水平会显著上升^[3]。研究认为 Ox-LDL 对 VEC 的损伤归因于 LPC 的增加,LPC 这一重要脂质在 AS 发生发展中起着重要的作用^[4]。研究表明,氧自由基(OFR)是导致许多心血管疾病的重要因素,而 VEC 又是体内 OFR 产生和导致各种病变的重要场所^[5-7]。因此,本实验用 LPC 或黄嘌呤+黄嘌呤氧化酶作为 VEC 的损伤药物,旨在研究和寻找保护 VEC 免受氧自由基损伤的药物,这对于防治 AS 具有重要意义。

现发现山楂叶中所含的黄酮类成分,对心血管系统有明显的药理作用。山楂叶中的总黄酮能使冠状动脉扩张,有降

血脂,降血压和强心作用,能改善心脏活力和兴奋中枢神经系统的作用,且具抗氧化作用^[8-9]。目前山楂叶总黄酮(HLF)在 VEC 中的研究尚未见报道,本文通过 LPC 与 OFR 对 VEC 的损伤,研究了山楂叶总黄酮抗氧化损伤的能力及对 VEC 的保护作用,为进一步从细胞水平阐述山楂叶总黄酮的药理作用提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

DMEM 培养基, GIBCO 公司产品; LPC, 黄嘌呤, 黄嘌呤氧化酶, 胰蛋白酶, SIGMA 公司产品; 特级小牛血清, 细胞所实生公司产品; 二甲亚砜(DMSO), MERK 公司产品; 噻唑蓝(MTT), SERVA 公司进口分装; 山楂叶总黄酮(华东师范大学生物系细胞生物学实验室制备, 纯度 64.5%) ; 新生小牛胸主动脉, 取自上海市第二牧场。

1.2 血管内皮细胞原代和传代培养

无菌条件下剪取新生未进食小牛胸主动脉约 10 厘米

长,并迅速转入灭菌 D Hanks 溶液中。在超净工作台内剥离主动脉上的结缔组织并结扎分支动脉,扎住主动脉端,将血管翻身,使血管内皮朝外,用胰蛋白酶消化 10 min,取消化液离心,得内皮细胞,计数分装进行原代培养。传代培养后选用 4~7 代的内皮细胞进行实验。分别接种于 24 孔细胞培养板,每孔细胞密度平均为 5×10^5 (个)。96 孔细胞培养板,每孔细胞密度平均为 1×10^5 (个)。

1.3 实验分组

LPC 损伤,山楂叶总黄酮保护实验共分七组:(1)对照组;(2) LPC(5ug/ ml) 组;(3) LPC(5ug/ ml) + 山楂叶总黄酮(0.001 mg/ ml) 组;(4) LPC(5ug/ ml) + 山楂叶总黄酮(0.005 mg/ ml) 组;(5) LPC(5ug/ ml) + 山楂叶总黄酮(0.01 mg/ ml) 组;(6) LPC(5ug/ ml) + 山楂叶总黄酮(0.05 mg/ ml) 组;(7) 山楂叶总黄酮(0.01 mg/ ml)

X+ XO 损伤,山楂叶总黄酮保护实验共分七组:(1)对照组;(2) X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) 组;(3) X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + 山楂叶总黄酮(0.001 mg/ ml) 组;(4) X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + 山楂叶总黄酮(0.005 mg/ ml) 组;(5) X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + 山楂叶总黄酮(0.01 mg/ ml) 组;(6) X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + 山楂叶总黄酮(0.05 mg/ ml) 组;(7) 山楂叶总黄酮(0.01 mg/ ml)

1.4 测定方法^[10-12]

按照细胞乳酸脱氢酶(LDH)含量的测定方法,用 BACK-MAN DU-7 紫外分光光度计测定 LDH 含量;按照细胞内丙二醛(MDA)含量的微量测定方法,用 HITACHI 850 荧光分光光度计测定 MDA 含量;按照 MTT 比色测定方法,用 DG 3022 酶联免疫检测仪测定 570nm 波长细胞的 OD 值。按照一氧化氮(NO)的荧光检测方法,用 HITACHI 850 荧光分光光度计测定 NO 含量。

1.5 统计学处理

实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用 t 检验。以上统计用 NOSA 统计软件完成。

2 结果与讨论

2.1 山楂叶总黄酮对 LPC 致 VEC 损伤后 LDH 和 MDA 含量的影响

当 LPC(5ug/ ml) 与 VEC 共培养 24h 后可显著地增加 LDH 从细胞中的泄漏量,同时显著地加剧细胞膜的脂质过氧化,MDA 含量增加,且均与对照组比较 $P < 0.001$ 。而同时加入不同浓度的山楂叶总黄酮,则能减轻 LDH 从细胞中的泄漏量,也降低细胞 MDA 含量。说明山楂叶总黄酮能减轻 LPC 致 VEC 的损伤,山楂叶总黄酮(0.01 mg/ ml) 的浓度效果最显著。(见表 1), n 为样本数。

Table 1 The results of hawthorn leaves flavonoids on the LDH leakage and MDA contents induced by LPC in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LDH(U/ ml)	MDA(nmol/ 10 ⁶ cells)
Control	6	580 ± 17.24	0.356 ± 0.01
LPC(5ug/ ml)	6	690 ± 53.41 ^Δ	0.382 ± 0.02 ^Δ
LPC(5ug/ ml) + HLF(0.001 mg/ ml)	6	678.3 ± 59.23 ^Δ	0.378 ± 0.01 ^Δ
LPC(5ug/ ml) + HLF(0.005 mg/ ml)	6	668.3 ± 38.86 ^Δ	0.371 ± 0.04 ^{Δ*}
LPC(5ug/ ml) + HLF(0.01 mg/ ml)	6	640 ± 43.94 ^{Δ*}	0.369 ± 0.03 ^{Δ**}
LPC(5ug/ ml) + HLF(0.05 mg/ ml)	6	663 ± 64.32 ^Δ	0.377 ± 0.05 ^Δ
HLF(0.01 mg/ ml)	6	576.7 ± 45.89 ^{**}	0.361 ± 0.01 ^{**}

Compared with control group: ^Δ $P < 0.001$

Compared with LPC group: ^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

Table 2 The results of hawthorn leaves flavonoids on the LDH leakage and MDA contents induced by X+ XO in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LDH(U/ ml)	MDA(nmol/ 10 ⁶ cells)
Control	6	742.57 ± 15.82	0.571 ± 0.02
X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L)	6	874.12 ± 18.91 ^Δ	1.025 ± 0.15 ^Δ
X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + HLF(0.001 mg/ ml)	6	822.73 ± 19.03 ^Δ	0.915 ± 0.08 ^Δ
X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + HLF(0.005 mg/ ml)	6	779.06 ± 14.86 ^Δ	0.807 ± 0.06 ^{Δ*}
X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + HLF(0.01 mg/ ml)	6	765.17 ± 13.94 ^{Δ*}	0.802 ± 0.04 ^{Δ**}
X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) + HLF(0.05 mg/ ml)	6	758.42 ± 16.74 ^Δ	0.798 ± 0.09 ^{Δ*}
HLF(0.01 mg/ ml)	6	739.46 ± 17.89 ^{**}	0.573 ± 0.07 ^{**}

Compared with control group: ^Δ $P < 0.001$

Compared with X+ XO group: ^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

2.2 山楂叶总黄酮对 X+ XO 致 VEC 损伤后 LDH 和 MDA 含量的影响

当 X+ XO(10umol/ L + 200umol/ L) 与 VEC 共培养 24h 后同样显著地增加 LDH 从细胞中的泄漏量,MDA 含量增

加,且均与对照组比较 $P < 0.001$ 。而同时加入不同浓度的山楂叶总黄酮,则能显著地减轻 LDH 从细胞中的泄漏,也降低 MDA 含量,说明山楂叶总黄酮能减轻 X+ XO 致 VEC 的脂质过氧化损伤,且山楂叶总黄酮的浓度呈明显的量效关系。(见表 2), n 为样本数。

2.3 山楂叶总黄酮对 LPC 致 VEC 损伤后细胞增殖的影响

当 LPC(5ug/ml) 与 VEC 在 96 孔培养板共培养 24h 后可显著地抑制细胞的生长,成活率下降,与对照组比较 $P < 0.001$,可能由于细胞损伤抑制了细胞的正常生长。加入不同浓度的山楂叶总黄酮后细胞的生长逐渐恢复,与 LPC 组比较差异显著。但当加入 HLF(0.05 mg/ml) 时却又抑制细胞生长了,说明适量的 HLF(0.005 mg/ml) 和 HLF(0.01 mg/ml) 对细胞的保护最明显,山楂叶总黄酮浓度过高反而会减弱其增殖作用,说明 HLF 的浓度与细胞增殖没有量效关系。(见表 3), n 为样本数。

Table 3 The results of hawthorn leaves flavonoids on VEC growing induced by LPC in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	MTT(570nm) O. D
Control	8	0.63 ± 0.01
LPC(5ug/ml)	8	0.60 ± 0.02 ^Δ
LPC(5ug/ml) + HLF(0.001 mg/ml)	8	0.62 ± 0.01
LPC(5ug/ml) + HLF(0.005 mg/ml)	8	0.63 ± 0.02 [*]
LPC(5ug/ml) + HLF(0.01 mg/ml)	8	0.63 ± 0.03 ^{**}
LPC(5ug/ml) + HLF(0.05 mg/ml)	8	0.61 ± 0.02 ^Δ
HLF(0.01 mg/ml)	8	0.63 ± 0.01 ^{**}

Compared with control group:^Δ $P < 0.001$
Compared with LPC group:^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

2.4 山楂叶总黄酮对 X+ XO 致 VEC 损伤细胞增殖的影响

当 X+ XO(10umol/L + 200umol/L) 与 VEC 在 96 孔培养板共培养 24h 后可显著地抑制细胞的生长情况,与对照组比较 $P < 0.001$ 。可能由于氧自由基直接引起细胞损伤从而影响了细胞的正常生长。但加入不同浓度的山楂叶总黄酮后细胞的生长逐渐恢复,且随着山楂叶总黄酮的浓度不断增加保护作用越来越明显。说明山楂叶总黄酮是通过抗氧化途径达到保护细胞的目的。(见表 4), n 为样本数。

Table 4 The results of hawthorn leaves flavonoids on VEC growing induced by X+ XO in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	MTT(570nm) O. D
Control	8	0.86 ± 0.02 [*]
X+ XO(10umol/L + 200umol/L)	8	0.64 ± 0.01 ^Δ
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.001 mg/ml)	8	0.69 ± 0.01 ^{Δ*}
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.005 mg/ml)	8	0.74 ± 0.02 ^{Δ**}
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.01 mg/ml)	8	0.77 ± 0.01 ^{Δ**}
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.05 mg/ml)	8	0.80 ± 0.01 ^{Δ**}
HLF(0.01 mg/ml)	8	0.83 ± 0.02 ^{**}

Compared with control group:^Δ $P < 0.001$
Compared with X+ XO group:^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

2.5 山楂叶总黄酮对 LPC 致 VEC 损伤后细胞 NO 含量的影响

当 LPC(5ug/ml) 与 VEC 共培养 24h 后可显著地减少细胞 NO 的含量,且与对照组比较 $P < 0.001$ 。而同时加入不同浓度的山楂叶总黄酮后,则能逐渐增加细胞 NO 的含量,且呈量效关系。说明山楂叶总黄酮能抵抗 LPC 致 VEC 的损伤,对细胞具有保护作用。(见表 5), n 为样本数。

Table 5 The results of hawthorn leaves flavonoids on NO contents induced by LPC in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	NO(nmol/10 ⁶ cells)
Control	6	0.807 ± 0.02
LPC(5ug/ml)	6	0.637 ± 0.05 ^Δ
LPC(5ug/ml) + HLF(0.001 mg/ml)	6	0.671 ± 0.06 ^Δ
LPC(5ug/ml) + HLF(0.005 mg/ml)	6	0.723 ± 0.08 ^{Δ*}
LPC(5ug/ml) + HLF(0.01 mg/ml)	6	0.747 ± 0.07 ^{Δ*}
LPC(5ug/ml) + HLF(0.05 mg/ml)	6	0.696 ± 0.09 ^Δ
HLF(0.01 mg/ml)	6	0.794 ± 0.07 ^{**}

Compared with control group:^Δ $P < 0.001$
Compared with LPC group:^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

2.6 山楂叶总黄酮对 X+ XO 致 VEC 损伤细胞 NO 含量的影响

当 X+ XO(10umol/L + 200umol/L) 与 VEC 共培养 24h 后可显著地减少细胞 NO 的含量,且与对照组比较 $P < 0.001$ 。而同时加入不同浓度的山楂叶总黄酮,则能增加 NO 的含量,且呈量效关系。说明山楂叶总黄酮能抵抗 X+ XO 致 VEC 的氧化损伤,对细胞具有抗氧化的作用。(见表 6), n 为样本数。

Table 6 The results of hawthorn leaves flavonoids on NO contents induced by X+ XO in the medium($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	NO(nmol/10 ⁶ cells)
Control	6	1.342 ± 0.03
X+ XO(10umol/L + 200umol/L)	6	1.123 ± 0.08 ^Δ
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.001 mg/ml)	6	1.146 ± 0.05 ^Δ
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.005 mg/ml)	6	1.237 ± 0.08 ^{Δ*}
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.01 mg/ml)	6	1.325 ± 0.09 ^{Δ*}
X+ XO(10umol/L + 200umol/L) + HLF(0.05 mg/ml)	6	1.374 ± 0.06 ^{**}
HLF(0.01 mg/ml)	6	1.340 ± 0.07 ^{**}

Compared with control group:^Δ $P < 0.001$
Compared with X+ XO group:^{*} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.001$

总之,从本实验结果看,山楂叶总黄酮能抵抗 LPC 和 X+ XO 致 VEC 的损伤,能保护细胞减少乳酸脱氢酶的泄漏,降低细胞脂质过氧化程度,增加细胞中一氧化氮的产生。其作用机理是因为 LPC 和 X+ XO 致 VEC 的损伤是一种氧化损伤,而山楂叶总黄酮能保护 VEC 免受氧自由基的伤害,是通过抗氧化途径达到保护细胞的目的。这对防止由氧化损伤引起的 AS 形成,具有一定的保护作用。现已发现^[2]能清除 OFR 的物质可减轻或抑制 OX-LDL 引起的 AS 的形成。

因此,考虑用抗氧化剂来防止 AS 的进一步发展就有了可能。

VEC 是衬附于血管腔内面的细胞,对维持血管结构和功能的完整性具有重要的作用,并参与多种机能活动,它不仅具有屏障及转运功能,而且还参与机体的凝血、免疫、炎症过程中白细胞的粘附,血管的紧张性,平滑肌细胞(SMC)的增生及生物活性物质的释放和血管舒缩功能的调节等生命重要过程。因此保护 VEC 免遭损伤对防止和缓解 AS 的形成具有重要意义。本实验证明山楂叶总黄酮能抵抗氧自由基对 VEC 的伤害,这为进一步开发利用山楂叶资源提供了广阔前景。

参考文献

- 1 Zhao B, Zhang Y, Lin B et al. Endothelial Cells injured by oxidized low density lipoproteins. *Am J Hematol*, 1995, 49(3): 250.
- 2 Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 702.
- 3 Yokoyama M, Hirata K, Miyake R et al. Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168: 301.
- 4 Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD et al. Impairment of en-

dothelium dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low density lipoprotein. *Nature*, 1990, 344: 160.

- 5 Richard VJ, Murry CE, Jennings RB. Oxygen-derived free radical and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol*, 1990, 4(1): 85.
- 6 吴远明,贾菊芳,李勇军等.甲基莲心碱对氧自由基损伤血管内皮细胞的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 1997, 11(1): 27.
- 7 徐雅琴,唐朝枢,张钧华.氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对人血管内皮细胞钙转运的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8(1): 32.
- 8 许正斌,高奎斌,许双贵.山楂叶综述. *中医药学报*, 1985, 4: 49.
- 9 黄沛力,曾昭晖.银杏叶和山楂叶的抗氧化作用. *中国药学杂志*, 1996, 5: 274.
- 10 张均田主编.现代药理实验方法.第一版.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 1315.
- 11 翁玉椿,王秀平,卢泳才等.细胞和细胞膜过氧化脂质的微量定量. *细胞生物学杂志*, 1985, (3): 142.
- 12 黄文栋,王亚凡.生命的化学. 1994, 14(6): 44.

收稿日期: 2001 - 04 - 12