

沙棘对高脂血清培养平滑肌细胞 的保护作用

王宇 卢咏才 刘小青 郭肇铮 胡金红 (北京中医学院 100029)

提要 首次从亚细胞水平证实沙棘与维生素E相似,对高脂血清损伤的平滑肌细胞有如下的保护作用: 1.降低细胞内脂质过氧化物含量; 2.减轻细胞膜的损伤; 3.保护细胞健康生长并促其增生。

关键词 沙棘 平滑肌细胞 高脂血症 脂质过氧化 动脉粥样硬化

沙棘又名醋柳,为胡颓子科,酸刺属灌木。药用其干燥果实或浸膏。沙棘性温、味酸涩、入肝、胃、大小肠经、有活血散瘀、化痰宽胸、补脾健胃等功能,用于跌打损伤、瘀血肿痛、胃痛、咳嗽痰多、呼吸不畅、食欲不振等症^[1]。现代医学研究近几年报道渐多。沙棘果

实和种子中化学成分主要有:维生素、氨基酸、黄酮、糖类、脂肪酸…等。在心血管病方面,能降低胆固醇、 β -脂蛋白,缓解心绞痛,增加冠脉血流量,改善心电图^[1,2]。对O₃损伤的小鼠,有降低体内脂质过氧化物(LPO)的作用^[3]。LPO与动脉粥样硬化(AS)的发生发展有密切

关系⁽⁴⁻⁶⁾。据此,本实验通过体外培养方法观察沙棘对高脂血清培养平滑肌细胞(SMC)的保护作用,以探讨中药沙棘可能防治AS的作用及机理。

材料与方法

一、材料

沙棘油(从沙棘 *Hippophae rhamnides* L. 种子中提炼出,仲崇菊等鉴定,富含 α -生育酚和 β -胡萝卜素)⁽⁷⁾由山西省医药研究所马翠英赠; α -生育酚(VE, E. Merk[†]2171987);黄嘌呤氧化酶(Sigma 107F-3848);次黄嘌呤(Sigma 83F-0073),正常人血清(HS)、小牛血清(CS)及高脂兔血清(HRS,含 β -脂蛋白2184mg/dl、胆固醇250mg/dl、甘油三酯193mg/dl)均为本室制。

二、方法

1. SMC的培养及高脂损伤病理模型的建立 主动脉SMC的培养及病理模型的建立按本室传统方法进行^(8,9)。取第十代体外培养的人胚主动脉SMC,15万细胞/瓶接种于25ml培养瓶,5%CO₂浓度,37℃下,以16%血清(8%HS+8%CS)的IMDM培养24h后换入高脂血清培养,同时设不加高脂血清的对照组、高脂加沙棘组及高脂加VE组。各组血清总浓度仍为16%,其中高脂组血清比例为5%HRS、5%HS、6%CS;对照组血清比例为5%RS、5%HS、6%CS。分别于加高脂后第三天和第五天作各项指标测定。

2. 沙棘及VE培养液的制备 准确称取10mg沙棘油及VE分别稀释于10mlIMDM中,40℃水浴30min,高速振荡5min,二者均呈乳状溶合于培养液中。分别继续加IMDM至100ml即成为1.0 μ g/ml的沙棘和VE培养液。

3. 细胞增生状态观察 实验第三和第五天,分别用酶消化法收集细胞。收集前先用PBS将培养细胞轻洗3遍,倾除洗液中飘浮的死细胞,然后按常规用0.25%胰蛋白酶消化,血球计数板计数。

4. 过氧化脂质(LPO)测定 按改良TBA

法进行⁽¹⁰⁾。将培养的SMC制成细胞悬液,离心(3000r/min,10min),PBS洗3次,计数后进行测定。结果LPO的含量以丙二醛(MDA)nmol/细胞表示。计算公式:

$$\begin{aligned} \text{LPO} &= 0.5 \times \frac{f}{F} \times \frac{1}{\text{百万细胞数}} \\ &= \text{MDA nmol}/100\text{万细胞} \end{aligned}$$

式中f为实验管值,F为标准品nMol值,0.5为标准品用量。

5. 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 按李益新法测定。基本原理是:黄嘌呤氧化酶在催化黄嘌呤生成尿酸时产生超氧基,后者与发光剂Luminol反应发光。SOD能清除超氧基而抑制发光,以发光强度的被抑制程度测得酶活力的变化。本实验用LKB-Wallac1250型发光仪测定发光强度。结果以ng/100万细胞表示。

6. 扫描电镜样品制备 培养瓶中放置盖玻片使细胞生长于其上,实验第五天取出盖玻片,用预温的Hank's液(37℃)洗2遍,2.5%戊二醛固定30min,2%锇酸后固定30min,系列酒精脱水,醋酸异戊酯置换30min,临界点干燥处理,离子镀膜。扫描电镜观察。

7. 统计学应用t检验法。

结 果

一、沙棘和VE对高脂损伤SMC生长的影响

于实验第3、5天在倒置显微镜下观察各组培养细胞的生长状况。结果显示,高脂组培养液中有大量悬浮死细胞,对照组内无飘浮死亡细胞,高脂加VE和高脂加沙棘组内亦有一定量的悬浮细胞,但与高脂组比,相对较少。贴壁生长的细胞,各组无明显区别。细胞形态相似,均成束排列、交错生长呈“峰、谷”状。细胞计数结果:实验第3天,见高脂组、高脂加VE和高脂加沙棘组细胞的正常生长均受影响,细胞减少,三者之间无明显差异,但与对照组的差异显著。第5天时,高脂加VE或加沙棘组的细胞计数明显增加,与高脂组比,差异显著(表1)。

表1 沙棘和维生素E对SMC增生的影响

组别	×10 ⁴ 细胞	
	第3天	第5天
对照	42.71±2.97 ³⁾	91.30±8.65 ³⁾
高脂	29.67±1.43	44.70±5.07
高脂+VE	31.36±3.57	68.00±6.49 ³⁾
高脂+沙棘	29.97±1.08	73.20±3.33 ³⁾

注: $\bar{x} \pm SD$ n=5 与高脂组比 ¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01
³⁾P<0.001(下同)

二、沙棘、VE对高脂损伤SMC保护作用的扫描电镜观察

实验第五天,扫描电镜下,见对照组SMC表面光滑,细胞膜无缺损;高脂组细胞表面粗糙不平、出现大小不等的缺损;高脂加VE及加沙棘组细胞膜表面亦可见小缺损,二组程度相似,均较高脂组的损伤轻微。

三、沙棘及VE对高脂损伤SMC内LPO含量和SOD活性的影响

表2 沙棘和维生素E对SMC内LPO含量的影响

组别	MDA nmol/10 ⁶ 细胞		P值 (3比5天)
	第3天	第5天	
对照	0.581±0.069 ³⁾	0.570±0.028 ³⁾	
高脂	0.855±0.053	0.950±0.087	
高脂+VE	0.653±0.108 ²⁾	0.406±0.025 ³⁾	<0.01
高脂+沙棘	0.761±0.061 ¹⁾	0.583±0.098 ³⁾	<0.001

表3 沙棘和维生素E对SMC内SOD活性的影响

组别	SODmg/10 ⁶ 细胞		P值(3比5天)
	第3天	第5天	
对照	9.918±2.349 ¹⁾	9.346±1.093 ³⁾	
高脂	15.168±4.012	16.713±1.592	
高脂+VE	13.698±2.466 ⁴⁾	14.749±1.156 ⁵⁾	
高脂+沙棘	14.900±1.186 ⁵⁾	11.996±1.430 ^{1,4)}	<0.01

注: 与对照组比 ¹⁾P<0.05 ²⁾P<0.01

实验从细胞培养实验中发现,沙棘能明显降低高脂损伤SMC内增高的LPO含量,沙棘作用时间越长,LPO降低越明显,减轻损伤,促进SMC健康生长。结果表明,沙棘可能与天然抗氧化剂VE一样,通过清除LPO而保护细胞的结构与功能。同时发现,实验第3天,加高脂(包括加VE及沙棘)培养的SMC,其SOD活性均显著高于对照组,这与食饵性高脂血症伴随血清

沙棘和VE均有明显降低SMC内LPO含量的作用。实验第3天,沙棘和VE即有降LPO趋势,与高脂组比较,分别为P<0.05和P<0.01;第5天时,VE组、沙棘组分别与高脂组比均有显著差异(P<0.001);VE组、沙棘组LPO含量自身比较,第5天比第3天下降更显著,P<0.001(表2)。SOD活性测定结果显示,实验第3天时,各实验组SOD活性均比对照组升高,但差别不显著。第5天,高脂组、沙棘组及VE组SOD活性均比对照组显著升高,有统计学意义;但沙棘组和VE组SOD活性均比高脂组低,沙棘组更明显些(P<0.05);沙棘组自身SOD活性,第5天比第3天更低,差异显著(表3)。

讨论

自由基引发脂质过氧化的损伤与AS密切相关^[4,5],Smith提出,可根据血浆LPO水平估价AS病变的程度^[4],可见减少自由基引发LPO的生成和/或加速其清除,以免血管壁细胞受损,已成为AS防治的重要一环。我室在抗衰老动物实验中发现,沙棘能抑制臭氧损伤后小鼠血中LPO升高^[3],但沙棘对AS病变发生过程的关键细胞——SMC有何影响,还未见报道。本

LPO持续升高,抗氧化酶活性在早期呈代偿性升高的结果一致。实验第5天时,高脂组SOD活性仍很高,但沙棘和VE组SOD活性则呈下降趋势,以沙棘组尤为明显,呈显著差异。推测由于沙棘和VE的显著抗氧化作用,此时LPO已降至正常水平,减轻了对细胞的损伤,同时也减弱了细胞对自由基刺激的应激反应,使

(下转601页)

SOD活性向正常水平恢复。值得提出：沙棘对SMC结构、功能的保护作用，可能反映它是一个有希望的抗AS的药物。关于沙棘影响SOD活性的其它机理以及它对其它抗氧化酶的作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

〔1〕 葛孝炎等. 中草药 1986; 17(8):42

〔2〕 葛孝炎等. 山西医药研究(沙棘专辑) 1985; 2:9

〔3〕 郭肇铮等. 山西中医药研究 1986; 2:35

〔4〕 Smith T et al. Atherosclerosis 1985; 57:119

〔5〕 卢咏才等. 中华医学杂志 1985; 65(2):75

〔6〕 Warso M A et al. Brit Med Bull 1983; 39:277

〔7〕 仲崇菊等. 山西医药研究(沙棘专辑) 1985; 2:27

〔8〕 卢咏才等. 北京中医学院学报 1983; 1:61

〔9〕 郭肇铮等. 中国病理生理学杂志 1988; 4:293

〔10〕 翁玉椿等. 细胞生物学杂志 1985; 7(3):142

1991年3月5日收稿