

# 扇贝糖胺聚糖对OX-LDL诱导血管内皮细胞氧化应激损伤的抑制作用机制研究<sup>Δ</sup>

鞠传霞<sup>1\*</sup>, 侯琳<sup>1\*</sup>, 丛培阳<sup>2</sup>, 王嘉怡<sup>1</sup>, 孙福生<sup>1</sup>, 王蕾<sup>1</sup>, 张芳<sup>1</sup>, 刘赛<sup>1</sup> (1. 青岛大学药学院, 山东青岛 266021; 2. 威海卫人民医院, 山东威海 264200)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3938-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.17

**摘要** 目的: 研究扇贝糖胺聚糖(SS-GAG)对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)损伤的抑制作用机制。方法: 试验分为阴性对照组、模型组与SS-GAG高、中、低浓度(质量浓度分别为200、100、50 mg/L)组, 后3组以不同质量浓度SS-GAG培养细胞12 h后, 以50 μmol/L氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)培养细胞24 h。以MTT法检测细胞活力; 测定乳酸脱氢酶(LDH)活性; 流式细胞仪测定活性氧(ROS)水平; 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)测定氧化低密度脂蛋白受体1(LOX-1)mRNA表达; Western blot测定NOX4蛋白表达。结果: 与阴性对照组比较, 模型组细胞活力减弱, LDH活性增强, ROS水平升高, LOX-1 mRNA表达增强, NOX4蛋白表达增强, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较, SS-GAG高、中、低浓度组细胞活力增强, LDH活性减弱, ROS水平降低, LOX-1 mRNA表达减弱, NOX4蛋白表达减弱, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论: SS-GAG有一定的保护血管内皮细胞作用, 其机制可能与经LOX-1/NOX4途径抑制ROS产生、减轻氧化应激损伤有关。

**关键词** 扇贝糖胺聚糖; 人脐静脉血管内皮细胞; 活性氧; 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体1; NADPH氧化酶

## Study on Inhibitory Effects Mechanism of Scallop Skirt Glycosaminoglycan on Oxidative Stress Injury in Vein Endothelium Cells Induced by OX-LDL

JU Chuan-xia<sup>1</sup>, HOU Lin<sup>1</sup>, CONG Pei-yang<sup>2</sup>, WANG Jia-yi<sup>1</sup>, SUN Fu-sheng<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, ZHANG Fang<sup>1</sup>, LIU Sai<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Qingdao University, Shandong Qingdao 266021, China; 2. Weihaiwei People's Hospital, Shandong Weihai 264200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effects mechanism of scallop skirt glycosaminoglycan (SS-GAG) on injury in human umbilical vein endothelium cells (HUVEC). METHODS: In the test, there was a negative control group, a model group and the groups of SS-GAG at high, middle and low concentrations (mass concentrations of 200, 100 and 50 mg/L respectively). The cells in latter 3 groups were cultured in SS-GAG at different mass concentrations for 12 h, and then in 50 μmol/L oxidized low-density lipoprotein (OX-LDL) for 24 h. MTT method was used to detect cell viability and the activity of lactic dehydrogenase (LDH), the flow cytometer to determine the level of reactive oxygen species (ROS), real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect mRNA expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), and Western blot to detect NOX4 protein expression. RESULTS: Compared to the cells in the negative control group, those in the model group demonstrated lower viability, higher activity of LDH, higher level of ROS, and stronger expressions of LOX-1 mRNA and NOX4 protein. There was statistical significance ( $P < 0.01$ ). Compared to the cells in the model group, those in the groups of SS-GAG at high, middle and low concentrations showed higher viability, lower activity of LDH, lower level of ROS and weaker expressions of LOX-1 mRNA and NOX4 protein. There was statistical significance ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: SS-GAG can protect HUVEC to some degree by a mechanism which may be related to inhibiting ROS production via LOX-1/NOX4 pathway and relieving oxidative stress injury.

**KEYWORDS** Scallop skirt glycosaminoglycan; Human umbilical vein endothelium cell; Reactive oxygen species; Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; NADPH oxidase

目前公认血管内皮细胞的损伤及其功能异常是多种心血管事件发生的始动、关键性环节<sup>[1]</sup>。氧化应激是氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)、肾素-血管紧张素系统、同型半胱氨酸等危险因素导致内皮细胞损伤的共同通路<sup>[2]</sup>。青岛大学医学院药理

教研室从栉孔扇贝裙边中提取出有效成分——扇贝糖胺聚糖(Scallop skirt glycosaminoglycan, SS-GAG), 已获得发明专利(ZL 200410035656.3)。前期研究发现50、100、200 mg/L SS-GAG能对抗OX-LDL、多聚阳离子、Fenton体系和过氧化氢诱导的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)氧化应激损伤<sup>[3-6]</sup>, 保护血管内皮细胞。本研究拟通过OX-LDL复制HUVEC损伤模型, 从细胞和分子水平进一步研究其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Δ 基金项目: 青岛大学医学院创新团队青年教师培育项目  
\* 副教授, 博士研究生。研究方向: 海洋活性物质功能。电话: 0532-82991202。E-mail: 57777777@126.com  
# 通信作者: 教授, 博士研究生。研究方向: 海洋活性物质功能。电话: 0532-83780072。E-mail: qingyi001@126.com

FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司);7600型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);RG 3000型实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)仪(德国Qiagen公司);2100 C型自动酶标仪(美国Rayto公司);Trans-Blot SD型半干电转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 1.2 药品与试剂

SS-GAG(青岛大学医学院药理教研室,纯度:96%);RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司);MTT(美国Sigma公司);乳酸脱氢酶(LDH)、活性氧(ROS)测试盒(上海碧云天生物科技有限公司);Trizol(上海Invitrogen公司);反转录试剂盒(美国Promega公司);小鼠抗人NOX4单克隆抗体、小鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG,北京中杉金桥生物技术有限公司)。

## 1.3 细胞

HUVEC购自中国科学院细胞库。

## 2 方法

### 2.1 OX-LDL制备及鉴定

利用CuSO<sub>4</sub>修饰低密度脂蛋白制备OX-LDL,采用硫代巴比妥酸法鉴定<sup>[9]</sup>。

### 2.2 细胞培养与分组

HUVEC接种于培养瓶内,用含10%胎牛血清、 $1 \times 10^5$  u/L青/链霉素双抗的RPMI 1640培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养细胞。试验分为阴性对照(无血清培养基处理12h)组、模型组(50 mg/L OX-LDL处理24h)组与SS-GAG高、中、低浓度(分别以质量浓度为200、100、50 mg/L的SS-GAG预处理12h,后均用50  $\mu$ mol/L OX-LDL处理24h)组。

### 2.3 细胞活力测定<sup>[9]</sup>

取对数生长期细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^6$  L<sup>-1</sup>,接种于96孔板中,每个浓度设6个复孔。按“2.2”项下方法处理细胞后,加入10 g/L MTT 10  $\mu$ l培养4 h,每孔加入150  $\mu$ l MTT溶解,用酶标仪于490 nm波长处测定光密度(OD)以代表细胞活力。

### 2.4 LDH活性测定

按“2.2”项下方法处理细胞后,收集上清培养液,取6  $\mu$ l样品与200  $\mu$ l LDH测试盒R1试剂混匀,37℃孵育3 min;再加入100  $\mu$ l R2试剂,37℃孵育90 s,全自动生化分析仪连续监测2 min吸光度(A)变化,计算 $\Delta A/\text{min}$ 。LDH活性(U/L) =  $\Delta A/\text{min} \times F$ ,式中F为常数(8 095)。

### 2.5 ROS水平测定

荧光定量法测定ROS水平。2',7'-二氯荧光二乙酸盐穿过细胞膜后,在胞内水解生成还原型二氯荧光素(DCFH)。细胞内ROS能氧化DCFH生成有荧光的氧化型二氯荧光素。将细胞与1 ml二氯荧光黄二乙酸盐(DCFH-DA)置于37℃培养箱中,避光孵育20 min。按“2.2”项下方法处理细胞后,常规洗细胞2遍,流式细胞仪检测ROS水平(激发光波长488 nm,发射光波长525 nm)。

### 2.6 氧化低密度脂蛋白受体1(LOX-1)mRNA表达测定

RT-PCR法测定LOX-1 mRNA表达。按“2.2”项下方法处理细胞后,Trizol试剂提取总RNA,反转录生成cDNA后,进行SYBR Green荧光定量PCR。LOX-1上游引物:5'-GAGAG-TAGCAAATTGTTTCAGCTCCTT-3',下游引物:5'-GCCC-

GAGAAAATAGGTAACAGT-3';GAPDH上游引物:5'-TG-GCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3',下游引物:5'-GGCCT-CTCTCTTGCTCTCAGTATC-3'。反应条件:95℃预变性1 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40次循环。荧光值以 $c_t$ 值表示,LOX-1 mRNA的表达水平以LOX-1与GAPDH  $c_t$ 的相对值表示,以 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 法统计分析。

### 2.7 NOX4蛋白表达测定

Western blot测定NOX4蛋白表达。按“2.2”项下方法处理细胞后,收集细胞,加细胞裂解液冰浴20 min,12 000×g离心5 min,超声裂解,取上清,用Bradford法蛋白定量。十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白,转膜和封闭,与小鼠抗人NOX4单克隆抗体(1:1 000)、小鼠抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体(1:1 000)于4℃摇床过夜孵育,然后与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(1:5 000)室温孵育1 h。加入显色底物,显影后读片,并进行扫描分析。

### 2.8 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组细胞活力与LDH活性测定结果

与阴性对照组比较,模型组细胞活力降低,LDH活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,SS-GAG高、中、低浓度组细胞活力增强,LDH活性减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各组细胞活力与LDH活性测定结果见表1。

表1 各组细胞活力与LDH活性测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Determination results of the viability and LDH activity of cells in all groups( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	细胞活力	LDH, U/L
阴性对照组	1.620 $\pm$ 0.063	24.21 $\pm$ 5.67
模型组	1.098 $\pm$ 0.051*	112.67 $\pm$ 10.93*
SS-GAG低浓度组	1.332 $\pm$ 0.032 <sup>#</sup>	94.83 $\pm$ 12.51 <sup>#</sup>
SS-GAG中浓度组	1.458 $\pm$ 0.022 <sup>#</sup>	73.42 $\pm$ 9.74 <sup>#</sup>
SS-GAG高浓度组	1.541 $\pm$ 0.059 <sup>#</sup>	47.16 $\pm$ 10.35 <sup>#</sup>

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.01$

### 3.2 各组细胞ROS水平测定结果

与阴性对照组比较,模型组细胞内ROS水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,SS-GAG高、中、低浓度组细胞ROS水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各组细胞ROS水平测定结果见图1、表2。

### 3.3 各组细胞LOX-1 mRNA表达测定结果

与阴性对照组比较,模型组细胞LOX-1 mRNA表达增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,SS-GAG高、中、低浓度组细胞LOX-1 mRNA表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各组细胞LOX-1 mRNA表达测定结果见表2。

### 3.4 各组细胞NOX4蛋白表达测定结果

与阴性对照组比较,模型组细胞NOX4蛋白表达增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,SS-GAG高、中、低浓度组细胞NOX4蛋白表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。各组细胞NOX4蛋白表达测定结果见图2。

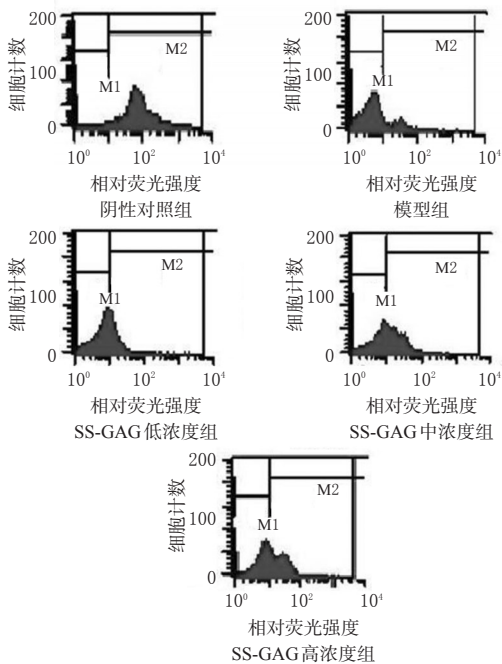


图1 各组细胞ROS水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 1 Determination results of the ROS level in cells in all groups( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

表2 各组细胞ROS和LOX-1 mRNA水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Determination results of the levels of ROS and LOX-1 mRNA in cells in all groups( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	ROS, %	LOX-1 mRNA, %
阴性对照组	4.89 ± 1.36	99.99 ± 4.50
模型组	78.79 ± 10.54*	367.54 ± 9.16*
SS-GAG 低浓度组	45.84 ± 9.29 <sup>#</sup>	250.22 ± 17.47 <sup>#</sup>
SS-GAG 中浓度组	41.66 ± 8.36 <sup>#</sup>	192.67 ± 10.04 <sup>#</sup>
SS-GAG 高浓度组	35.18 ± 7.62 <sup>#</sup>	139.93 ± 13.27 <sup>#</sup>

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

Note: vs. negative control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.01$

#### 4 讨论

OX-LDL 诱导的血管内皮细胞的损伤及其功能异常是动脉粥样硬化发生的始动和关键性环节。氧化应激是 OX-LDL 导致内皮细胞损伤的主要通路<sup>[2]</sup>。氧化应激破坏细胞膜,增加膜通透性,释放胞内 LDH, LDH 释放量可反映膜的完整性。本研究结果表明,经 OX-LDL 处理后,模型组细胞活力减弱, LDH 释放量增多;而 SS-GAG 能促进细胞增殖,抑制 LDH 释放,保护血管内皮细胞。

在正常情况下,体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡。一旦内源性氧化酶如 NADPH 氧化酶(NOX)<sup>[9]</sup>产生过多 ROS,超过体内抗氧化体系的清除能力,体内氧自由基代谢就会失衡,发生氧化应激反应<sup>[6]</sup>。因此,清除 ROS 是保护血管内皮细胞免受损伤的关键。本研究结果表明,OX-LDL 能明显升高细胞内 ROS 水平,不同质量浓度的 SS-GAG 均可抑制 ROS 的水平升高。

LOX-1 是血管内皮细胞摄取和代谢 OX-LDL 的主要受

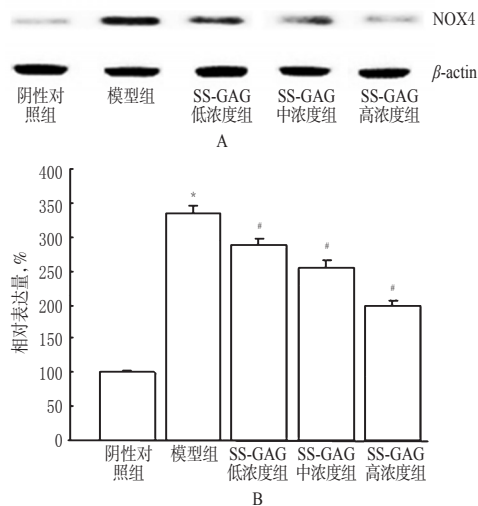


图2 各组细胞NOX4蛋白表达测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A. 电泳图;B. 柱形图

注:与阴性对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

Fig 2 Determination results of NOX4 protein expression in cells in all groups( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A. electrophoresis chart; B. column

Note: vs. negative control group, \* $P < 0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.01$

体<sup>[9]</sup>,在动脉硬化发生过程中起重要作用<sup>[10-11]</sup>。LOX-1 和 OX-LDL 结合后通过 NADPH 氧化酶途径,促进 ROS 生成<sup>[12]</sup>。研究表明,NOX4 是血管内皮细胞最主要的内源性 ROS 来源<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,OX-LDL 处理后细胞 LOX-1 mRNA 表达增强,NOX4 蛋白表达增强;SS-GAG 可抑制 LOX-1 mRNA 和 NOX4 蛋白表达的增强。

综上所述,SS-GAG 可经 LOX-1/NOX4 途径抑制 ROS 产生,发挥保护 OX-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤的作用。本研究为海洋活性物质发挥保护血管内皮作用提供了直接的试验依据,为将 SS-GAG 研制开发成具有自主知识产权的具有血管保护活性的保健品或药品提供更多的理论和试验依据。

#### 参考文献

- [1] Mudau M, Genis A, Lochner A, et al. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2012, 23(4): 222.
- [2] Puca AA, Carrizzo A, Villa F, et al. Vascular ageing: the role of oxidative stress[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(3): 556.
- [3] 张俊玲,刘赛.扇贝裙边糖胺聚糖对 OX-LDL 导致的血管内皮细胞损伤的抑制作用[J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(12): 1389.
- [4] 高莹,刘赛,王海桃.扇贝裙边糖胺聚糖对过氧化氢损伤的内皮细胞释放血管活性物质的影响[J]. *中国药房*, 2008, 19(7): 496.
- [5] 张杰,刘赛,苏玉文,等.扇贝糖胺聚糖对受氧化损伤的内皮细胞功能的影响[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(13): 990.
- [6] 张杰,刘赛.扇贝糖胺聚糖对氧自由基损伤的血管内皮细胞的保护作用[J]. *中国海洋药物*, 2004, 23(6): 18.
- [7] Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of

# 吉西他滨的体内外抗肝癌作用研究

孙家跃<sup>1\*</sup>, 左靖<sup>1</sup>, 金义光<sup>2</sup>(1.宿州市立医院药剂科, 安徽宿州 234000; 2.军事医学科学院放射与辐射医学研究所药物化学研究室, 北京 100850)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3941-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.18

**摘要** 目的:研究吉西他滨的体内外抗肝癌作用。方法:取5、10、20、30、50、70、90 μmol/L的吉西他滨水溶液作用于人乳腺癌MCF-7细胞和人肝癌HepG2细胞,采用MTT法(450 nm)测定作用24、48、72 h后细胞的吸光度,计算细胞抑制率和半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。在小鼠右前腋皮下接种0.2 ml肝癌H22细胞株(2×10<sup>10</sup>个/L)建立荷瘤小鼠,将其随机分为对照组(生理盐水)与吉西他滨组(40 mg/kg),每组5只,每隔2 d尾iv药物1次,共给药3次,记录体质量变化和计算抑瘤率。结果:吉西他滨对MCF-7细胞和HepG2细胞均有抑制作用,其24 h的IC<sub>50</sub>分别为30、>90 μmol/L;48、72 h的IC<sub>50</sub>均<5 μmol/L。两组荷瘤小鼠的体质量差异无统计学意义,吉西他滨对小鼠H22瘤的抑制率为75.76%。结论:吉西他滨体内外均有较好的抗肝癌作用。

**关键词** 吉西他滨;肝癌;细胞;实体瘤;体内;体外

## Study on Inhibitory Effects *in vivo* and *in vitro* of Gemcitabine on Liver Cancer

SUN Jia-yue<sup>1</sup>, ZUO Jing<sup>1</sup>, JIN Yi-guang<sup>2</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Suzhou Municipal Hospital, Anhui Suzhou 234000, China; 2.Lab of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study inhibitory effects *in vivo* and *in vitro* of gemcitabine on liver cancer. METHODS: MCF-7 cells and HepG2 cells were treated with different concentrations of gemcitabine solutions (5, 10, 20, 30, 50, 70 and 90 μmol/L). The absorbance of cells was determined by MTT assay after treated for 24, 48 and 72 h. The inhibition ratio and 50% inhibiting concentration (IC<sub>50</sub>) of cells were calculated. Tumor-bearing mice were established by inoculating 0.2 ml liver cancer H22 cell line via right anterior axillary, and then randomly divided into control group (normal saline) and gemcitabine group (40 mg/kg) with 5 mice in each group. They were given relevant medicine intravenously every 2 days, for 3 times. The changes of body weight and inhibition ratios were recorded. RESULTS: Gemcitabine can inhibit MCF-7 cells and HepG2 cells, and IC<sub>50</sub> of gemcitabine to them were 30 and >90 μmol/L within 24 h respectively, and those of gemcitabine to them were all lower than 5 μmol/L after 48 h and 72 h. There was no statistical significance in body weight of tumor-bearing mice between 2 groups, and inhibitory rate of gemcitabine to H22 cell line was 75.76%. CONCLUSIONS: Gemcitabine can inhibit liver cancer *in vivo* and *in vitro*.

**KEYWORDS** Gemcitabine; Liver cancer; Cell; Solid tumor; *in vivo*; *in vitro*

endothelial phenotype[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(1): 21.

[8] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(5):981.

[9] Morawietz H. LOX-1 receptor as a novel target in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2010, 135(7):308.

[10] Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, et al. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and relat-

ed disorders[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1):36.

[11] Mehta JL, Sanada N, Hu CP, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet[J]. *Circ Res*, 2007, 100(11):1 634.

[12] Chen XP, Xun KL, Wu Q, et al. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(1):1.

[13] Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NADPH oxidase [J]. *Circulation*, 2004, 109(2):227.

\* 副主任药师。研究方向:抗肿瘤药物。电话:0557-3022635。  
E-mail:sjy660579@163.com

(收稿日期:2014-12-12 修回日期:2015-03-12)

(编辑:张静)