

氧化型胆甾醇对血管内皮细胞的损伤作用

任德成, 杜冠华*, 张均田

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 观察氧化型胆甾醇 3β - 5α - 6β -三羟胆甾烷(3-triol)对牛主动脉内皮细胞的损伤作用。方法 用 MTT 法检测内皮细胞的增殖活性,以硫代巴比妥酸(TBA)法测定内皮细胞丙二醛(MDA)的生成,以流式细胞仪和 3'末端标记 DNA 降解片段原位检测(TUNEL)观察内皮细胞的凋亡。结果 3-triol 呈时间和剂量依赖性地降低内皮细胞的存活率,浓度依赖性增加内皮细胞丙二醛的生成和诱导内皮细胞的凋亡。在相同剂量及相同时间的情况下,胆甾醇对内皮细胞无明显的损伤作用。结论 氧化型胆甾醇 3-triol 对血管内皮细胞具有明显的损伤作用,其作用与其抑制内皮细胞的增殖,增加内皮细胞的氧化和诱导内皮细胞的凋亡有关。

关键词: 3β - 5α - 6β -三羟胆甾烷; 内皮细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)11-0807-05

已知高胆甾醇血症是动脉粥样硬化的危险因素之一,但对胆甾醇引起动脉粥样硬化的机理尚不完全清楚。近年的研究发现,在动脉粥样硬化组织中有氧化型胆甾醇(Ch-Ox)存在,在氧化修饰的低密度脂蛋白中也有大量 Ch-Ox^[1-3]。研究提示,氧化型胆甾醇(Ch-Ox)可能是胆甾醇引起细胞病变,产生毒性作用的主要形式。因此,对氧化型胆甾醇的研究正日益引起人们的重视。由于氧化型胆甾醇存在于血液中,直接受其影响的是血管内皮细胞,为观察氧化型胆甾醇对血管内皮细胞的作用,本文以胆甾醇为对照,观察氧化型胆甾醇 3β - 5α - 6β -三羟胆甾烷对血管内皮细胞的损伤作用。

材料与 方法

材料与试剂 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司,加入 56℃ 灭活的 10% 新生牛血清。噻唑蓝(MTT)为北京百泰生化技术公司生产,用不含血清的 DMEM 配成 0.1% 的浓度;胰蛋白酶、胶原酶、碘化丙啶(PI)、硫代巴比妥酸(TBA)、 3β - 5α - 6β -三羟胆甾烷(cholestane- 3β - 5α -triol, 3-triol), 购自 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G250, Fluka 公司产品;胆甾醇,购自北京化

学试剂公司。程序性细胞死亡试剂检测盒,北京华美公司。其余试剂为国产试剂纯。

牛主动脉内皮细胞的培养 取牛主动脉用 0.1% 胶原酶消化和分离,细胞置于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基内 37℃, 5% CO₂ 培养。经第 VIII 因子鉴定后用于研究,实验用第 5-10 代细胞。

MTT 法检测内皮细胞增殖 根据文献方法^[4],内皮细胞接种到 96 孔板上,10⁴ 个/孔,培养成单层后,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,加入含 3-triol 或胆甾醇的培养液进行培养,12 h 后,细胞用 PBS 小心地洗涤,然后每孔加入含有 0.1% MTT 的培养液 100 μL,继续孵育 4 h;然后小心吸弃培养液,每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷,37℃ 振摇 10 min,以微板光学测定仪(Fluostar Galaxy, Germany)于 544 nm 处测定各孔吸光度值。

丙二醛(MDA)的测定^[5] 内皮细胞与不同浓度 3-triol 共同温育 18 h 后,倾去上清液,加入 1% 的 Triton X-100,震荡 5 min,使细胞完全裂解。加入 20% 的乙酸,1% 的 TBA,混匀,沸水浴 15 min 后,迅速冷却,600 × g 离心 5 min,取上清液于 532 nm 处测定吸光度。以 1% Triton X-100 作空白对照,1, 1, 3, 3-四甲氧基丙烷(TMP)为标准。考马斯亮蓝 G250 显色法测定蛋白质含量。

内皮细胞凋亡的测定 (1) 流式细胞仪 DNA 测定:内皮细胞铺成单层后,加入含不同浓度的 3-triol 无血清培养基培养 18 h,然后倾去培养液,加入 70% 的乙醇 4℃ 固定 4 h,200 × g 离心 10 min,沉淀用 PBS 洗一次,再离心,弃上清液,沉淀中加入 RNase

收稿日期: 2001-03-27.

基金项目: 国家科技攻关项目(96-901-02-09).

作者简介: 任德成(1972-),男,博士研究生;

杜冠华(1956-),男,研究员.

* 通讯作者 Tel: (010) 63165184, Fax: (010) 63165184,

E-mail: Dugh@imm.ac.cn

(终浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 保温 1 h, 加入 PI (终浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 混匀后以流式细胞仪测定细胞凋亡发生率。(2) 3' 末端标记 DNA 降解片段原位检测 (TUNEL 法)^[6]: 将盖玻片置于六孔板中, 加入 2×10^4 个内皮细胞于盖玻片上, 长至融合状态后, 加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 3-triol 后培养 12 h, 然后取出盖玻片, 按照程序性细胞死亡试剂检测盒进行检测。然后记数 4 个视野中细胞染色阳性百分率, (每视野 100 个细胞中的染色细胞数)。

数据处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用 t 检验。

结 果

1 3-triol 对内皮细胞存活率的影响

3-triol 作用于内皮细胞后, 细胞的存活率下降, 呈剂量和时间依赖性。40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-triol 与细胞共同孵育 12 h 后, 可使内皮细胞存活率降低, 与空白组相比, 分别下降 14.71% ($P < 0.01$) 和 36.10% ($P < 0.001$); 在相同剂量和相同作用时间条件下, 胆甾醇对内皮细胞的存活率无明显影响(图 1)。60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-triol 与内皮细胞孵育不同的时间, 与空白组相比, 4 h 后可使细胞存活率下降 11.85% ($P < 0.05$), 12 h 后使细胞存活率下降 17.22% ($P < 0.01$), 而胆甾醇对内皮细胞存活率无明显影响(图 2)。

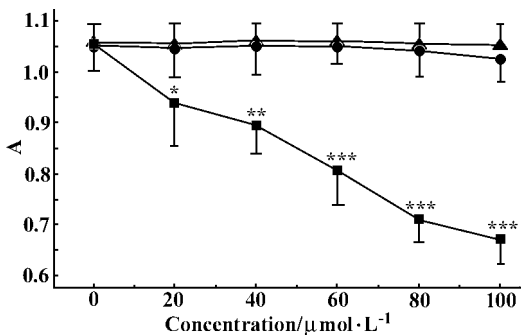


Figure 1 The concentration-effect relationship of cholestane-3β-5α-6β-triol (3-triol) on endothelial cell viability. The endothelial cells were cultured with 3-triol at different concentrations for 12 h, then the cell injury was tested by MTT assay. The triangles indicate normal cells, the filled circles indicate cells incubated with cholesterol and filled squares indicate cells incubated with 3-triol

Data were $\bar{x} \pm s$, $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs cholesterol. ■—■ 3-triol; ●—● cholesterol; ▲—▲ blank

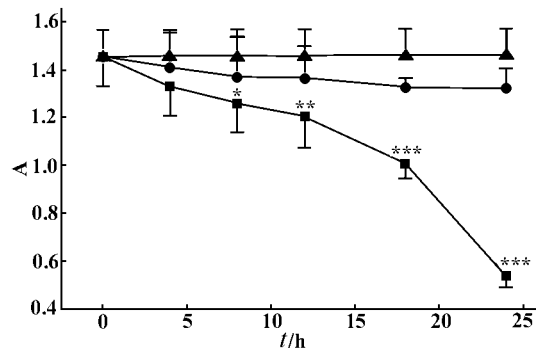


Figure 2 Time course of 3-triol on endothelial cell viability. The endothelial cells were cultured with 3-triol $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for different periods of time and then the cells were tested by MTT assay

Data were $\bar{x} \pm s$, $n = 6$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs cholesterol. ■—■ 3-triol; ●—● cholesterol; ▲—▲ blank

2 3-triol 对内皮细胞 MDA 生成的影响

内皮细胞与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3-triol 共同培养 18 h 后, 细胞内过氧化产物 MDA 的生成量明显增加, 与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胆甾醇组相比, 分别增加 22.45% ($P < 0.01$) 和 60.20% ($P < 0.001$)。相同剂量胆甾醇与内皮细胞共同孵育后, MDA 生成量略有增加, 两种浓度下分别增加 7.69% ($P > 0.05$) 和 24.18% ($P > 0.05$), 与空白组比较无显著差异(见表 1)。

Table 1 Effect of 3-triol on the concentration of MDA in cultured bovine aortic endothelial cells

| Group | Concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ protein |
|-------------|--|--|
| Blank | 0 | 0.91 ± 0.13 |
| Cholesterol | 20 | 0.98 ± 0.17 |
| Cholesterol | 100 | 1.13 ± 0.08 |
| 3-triol | 20 | $1.20 \pm 0.15^{**}$ |
| 3-triol | 100 | $1.57 \pm 0.14^{***}$ |

The bovine arterial endothelial cells were cultured with cholesterol or 3-triol for 18 h and then the concentration of MDA was tested by TBA method. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs cholesterol, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$

3 3-triol 对内皮细胞凋亡的影响

3.1 流式细胞仪测定 DNA 牛血管内皮细胞在含有 3-triol 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无血清培养液中培养 18 h 后, 流式细胞仪检测可见有亚 2 倍体峰(即所谓的凋亡峰)(见图 3), 且细胞凋亡率呈剂量依赖性, 与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胆甾醇组相比, 分别增加 76.56% ($P < 0.01$) 和 160.75% ($P < 0.001$)。相同条件下, 胆甾醇对内皮细胞的凋亡影响不明显(见表 2)。

Table 2 The apoptotic rate of cultured bovine aortic endothelial cells treated with 3-triol

| Group | Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Endothelial cell apoptosis/ % |
|-------------|--|-------------------------------|
| Blank | 0 | 7.14 ± 0.69 |
| Cholesterol | 100 | 7.21 ± 0.64 |
| Cholesterol | 200 | 7.26 ± 0.40 |
| 3-triol | 100 | $12.73 \pm 1.81^{**}$ |
| 3-triol | 200 | $18.80 \pm 1.31^{***}$ |

The cultured bovine aortic endothelial cells were cultured with 3-triol or cholesterol for 18 h, then the apoptotic rate was measured by flow cytometry. $\bar{x} \pm s$, $n=6$, $^{**} P < 0.01$, $^{***} P < 0.001$ vs cholesterol

3.2 3'末端标记 DNA降解片段原位检测 (TUNEL)

牛主动脉内皮细胞在不含药物的无血清培养条件下,有少数细胞呈凋亡阳性染色,阳性率为 $(2.25 \pm 0.96)\%$ (如图 4A)。如图 4B 所示,内皮细胞与 3-triol $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共同培养 12 h 后,可见细胞核阳性染色增加,阳性率为 $(25.75 \pm 3.10)\%$,与胆固醇组相比有显著差异 ($P < 0.001$)。而相同剂量下,胆固醇组细胞核染色阳性率为 $(2.75 \pm 0.96)\%$,与空白组相比,无明显差异 ($P > 0.05$)。

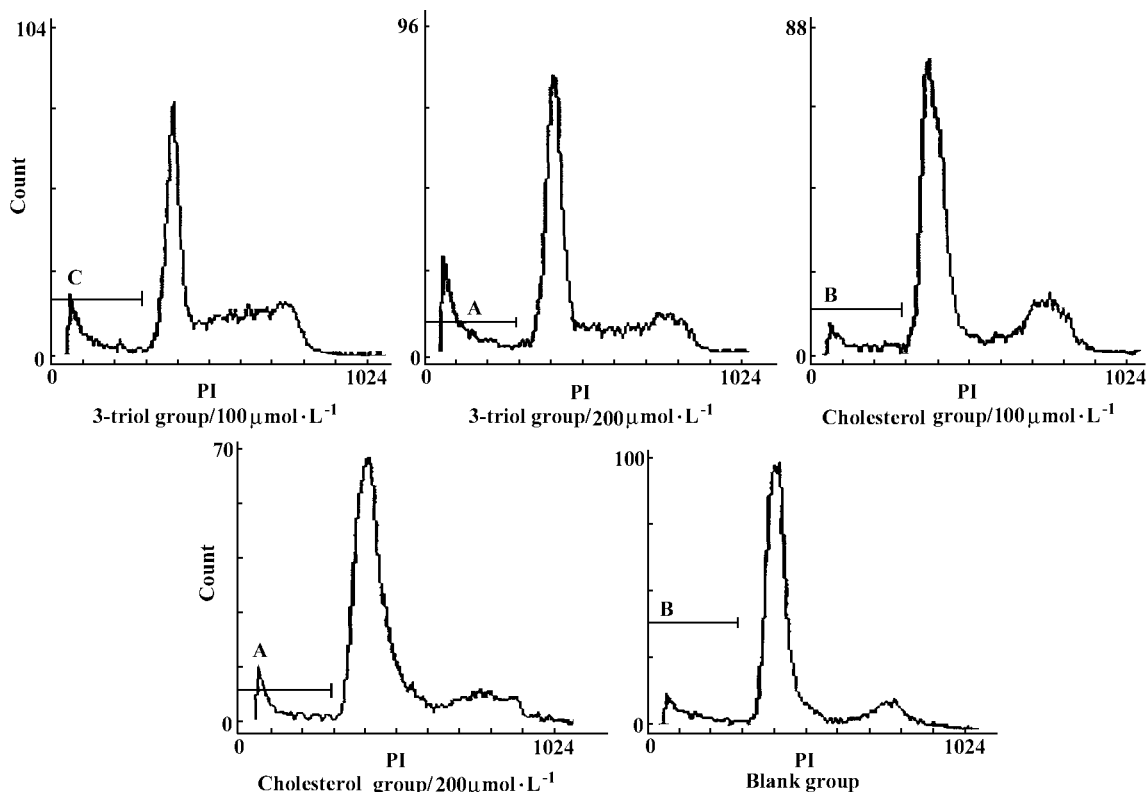


Figure 3 Apoptotic detection with flow cytometry. The endothelial cells were cultured with serum-free medium containing cholestane- 3β - 5α - 6β -triol (3-triol) or cholesterol at different concentrations for 18 h, then the apoptosis of endothelial cells was determined by flow cytometry

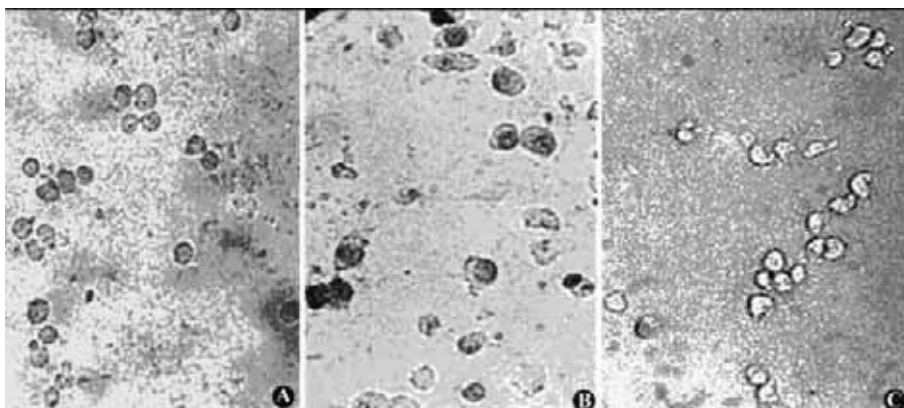


Figure 4 The apoptosis of endothelial cell induced by $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cholestane- 3β - 5α - 6β -triol (3-triol). The endothelial cells were cultured with serum-free medium containing 3-triol or cholesterol at $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 18 h, then the apoptosis of endothelial cells was determined by TUNEL assay
A. Blank group cells ; B. 3-Triol group cells ; C. Cholesterol group cells

讨 论

氧化型胆甾醇是胆甾醇经氧化后产生的一类化合物,如 7α 或 7β -羟基胆甾醇, 26-羟胆甾醇, 7-酮胆甾醇以及 3-triol 等。早在 1966 年, Brooks 等人就报道在人动脉粥样硬化组织中检测到 26-羟胆甾醇和 7-酮胆甾醇^[1]。它们存在于高血脂症的动脉壁和血浆及动脉粥样斑块中^[7-9]。近年来,发现在氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)和负性低密度脂蛋白(LDL⁻)中含有大量的氧化型胆甾醇^[2]。现在人们已广泛接受这样的观点:动脉粥样硬化(AS)的发生与胆甾醇的氧化和氧化型胆甾醇在细胞内的堆积有关^[10]。因此,在 AS 的发生和发展过程中氧化型胆甾醇具有重要的作用。此外,氧化型胆甾醇与其它疾病的关系也日益引起人们的重视,如血浆和红细胞中 7-酮胆甾醇的差异可作为糖尿病病人氧化应激的一个标志^[11]。

研究发现, 3-triol 作为氧化型胆甾醇的一种,具有多方面的作用,如抑制牛磺胆酸盐诱导的狗胆囊上皮细胞粘蛋白的分泌^[12],降低内皮细胞对低密度脂蛋白的摄取、内化和降解等^[13]。表明 3-triol 在多种疾病的发生和发展过程中具有重要作用。本文以胆甾醇为对照,研究了氧化型胆甾醇 3-triol 对牛主动脉内皮细胞的作用,结果表明, 3-triol 呈剂量和时间依赖性降低内皮细胞的存活率,增加内皮细胞 MDA 的生成,引起内皮细胞的凋亡,而胆甾醇在相同条件下对内皮细胞无明显影响。提示 3-triol 可引起细胞膜氧化,损伤细胞膜,最终导致细胞的死亡和凋亡。在细胞膜上存在一定比例的胆甾醇,如果胆甾醇过度氧化,就会引起氧化型胆甾醇增加,改变细胞膜的通透性,影响一些离子通道如钙通道和多种 ATP 酶的活性,引起钙超载,进而激活一系列的通路,最终产生对细胞的毒性作用^[14]。综上所述,氧化型胆甾醇 3-triol 对血管内皮细胞具有明显的损伤作用,可能是其诱发血管损伤性疾病原因之一。对 3-triol 导致血管内皮细胞损伤的机理有待进一步研究。

REFERENCES:

- [1] Brooks CJW, Harland WA, Steel G. Squalene, 26-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in human atheromatous plaques [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1966, **125**(3): 620 - 622.
- [2] Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, et al. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1997, **95**(4): 840 - 845.
- [3] Sevanin A, Hodis HN, Hwang J, et al. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL [J]. *J Lipid Res*, 1995, **36**(9): 1971 - 1986.
- [4] Nihah G, Tonn JC, Hoffmann O, et al. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of central nervous system. Part I: Evaluation of test-specific variables [J]. *J Neurooncol*, 1992, **13**(1): 1 - 11.
- [5] Tao XB, Li WH, Huang M, et al. Effects of calcium inhibitor on hydrogen peroxide-induced damage and calcium influx in bovine aortic endothelial cells in culture [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1997, **32**(7): 485 - 489.
- [6] Li DY, Yang B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas [J]. *Am J Physiol*, 1998, **275**(Heart Circ Physiol 44): H568 - H576.
- [7] Brow A, Dean RT, Jessup W. Free and esterified oxysterol: formation during copper oxidation of low lipoprotein and uptake by macrophages [J]. *J Lipid Res*, 1996, **37**(2): 320 - 335.
- [8] Chang YH, Abdalla DSP, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein [J]. *Free Rad Biol Med*, 1997, **23**(2): 202 - 214.
- [9] Guyto JR, Klemp KF. Development of lipid-rich core in human atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**(1): 4 - 11.
- [10] Heber D. Herbs and Atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2001, **3**(1): 93 - 96.
- [11] Abo K, Mio T, Sumino K. Comparative analysis of plasma and erythrocyte 7-ketocholesterol as a marker for oxidative stress in patients with diabetes mellitus [J]. *Clin Biochem*, 2000, **33**(7): 541 - 547.
- [12] Yoshida T, Klinkspoor JH, Kuver R, et al. Cholestan-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol, but not 7-ketocholesterol, suppresses taurocholate-induced mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells [J]. *FEBS Lett*, 2000, **478**(1-2): 113 - 118.
- [13] Zhou Q, Hulea S, Kummerow FA. The accentuating effect of low magnesium concentration on cholestan-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol-induced decrease of LDL uptake by cultured endothelial cells [J]. *Magn Res*, 1999, **12**(2): 89 - 98.
- [14] Bastiaanse EML, Hold KM, Van der Laarse A. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membrane [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, **33**(2): 272 - 283.

EFFECTS OF CHOLESTANE-3 β -5 α -6 β - TRIOL ON CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

REN De-cheng, DU Guan-hua, ZHANG Jun-tian

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of cholestane-3 β -5 α -6 β -triol on bovine aortic endothelial cells. **METHODS** The viability of endothelial cells was assessed by MIT assay. The concentration of malondialdehyde (MDA) in endothelial cells was measured by thiobarbituric acid (TBA) method. Apoptosis of endothelial cells was determined by flow cytometry and end-labeling *in situ*. **RESULTS** Cholestane-3 β -5 α -6 β -triol (20 - 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) decreased the endothelial cell viability rate in a time- and concentration-dependent manner. Cholestane-3 β -5 α -6 β -triol (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) increased the content of MDA by 22.45 % and 60.20 % respectively at 18 h compared with cholesterol. Cholestane-3 β -5 α -6 β -triol (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) induced apoptosis of endothelial cells, and the increase of apoptotic cells reached 12.73 % and 18.80 %, respectively. Otherwise, in the same condition, cholesterol (20 - 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) showed no marked effect on endothelial cells. **CONCLUSION** Cholestane-3 β -5 α -6 β -triol induced injury to endothelial cells by increasing the MDA content, decreasing the viability rate of endothelial cells and inducing apoptosis of the endothelial cells.

KEY WORDS: cholestane-3 β -5 α -6 β -triol; endothelial cells; apoptosis