

• 实验研究 •

银杏叶提取物抑制轻度修饰低密度脂蛋白诱导的
血管内皮细胞与单核细胞粘附的实验研究*

刘春华 钱冠清 刘会齐 刘晓辉

内容提要 目的:观察银杏叶提取物(EGb)对轻度修饰低密度脂蛋白(MM-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)与人类单核细胞系 U937 粘附功能的影响。方法:利用计数法观察 HUVEC 与 U937 细胞的粘附率;用 ELISA 方法检测 MM-LDL 作用后 HUVEC 膜表面粘附分子血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)及 P 选择素(P-selectin)的表达。结果:MM-LDL(75 μ g/ml)作用 HUVEC 4h 后,其对 U937 细胞粘附明显增加($P < 0.01$),HUVEC 膜表面未见 VCAM-1、ICAM-1 及 P-selectin 表达上调,作为阳性对照重组肿瘤坏死因子 α (rTNF α)5.0 ng/ml 可显著诱导以上 3 种粘附分子表达。中药 EGb 剂量依赖性抑制 MM-LDL 诱导 HUVEC 与 U937 细胞粘附。结论:EGb 能保护 HUVEC,减少 MM-LDL 对其活化,可能有利于延缓动脉粥样硬化(AS)早期进展。MM-LDL 诱导的 HUVEC 与 U937 粘附不是通过 ICAM-1、VCAM-1 及 P-selectin 介导的。

关键词 内皮细胞 轻度修饰低密度脂蛋白 细胞粘附分子 银杏叶提取物

Experimental Study on Suppressive Effect of Ginkgo Extract on Adhesion of Vascular Endothelial Cell to Monocyte Induced by Minimally Modified Low Density Lipoprotein LIU Chunhua, QIAN Guanqing, LIU Huiqi, et al. *Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin (300020)*

Objective: To observe the effect of Ginkgo extract on the interaction between minimally modified low density lipoprotein (MM-LDL) induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and U937 monocyte-like cell line. **Methods:** The adhesive percentage between HUVEC and U937 by counting and the expression of VCAM-1, ICAM-1, P-selectin by ELISA. **Results:** Treatment of HUVEC with MM-LDL (75 μ g/ml) for 4 hrs could significantly increase the adhesion of U937 to HUVEC ($P < 0.01$) and Ginkgo extract could suppress the adhesion in dose-dependent manner. The surface expression of VCAM-1, ICAM-1, P-selectin was not induced by MM-LDL, while recombination tumor necrosis factor- α 5.0 ng/ml, as a positive control, could do. **Conclusion:** Ginkgo extract afforded protection against HUVEC damage induced by MM-LDL and the adhesion of monocytes to endothelial cells induced by MM-LDL is not mediated by VCAM-1, ICAM-1 and P-selectin.

Key words minimally modified low density lipoprotein, endothelial cell, adhesion molecule, Ginkgo extract

血管内皮细胞(VEC)活化是动脉粥样硬化(AS)发病的始动环节,WBC 特别是单核细胞(MC)与活化 VEC 粘附并迁移集聚于内膜下,摄取氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)形成泡沫细胞是 AS 发病的早期病理表现^{〔1〕}。食饵性及遗传性高胆固醇血症兔模型脂肪条纹出现在动脉内膜前已有大量 MC 粘附^{〔1〕}。自从 80 年代发现丙丁酚的抗 AS 作用是其抑制了低密度脂蛋

白(LDL)氧化从而阻止 Ox-LDL 损伤 VEC 及 MC 浸入血管壁后,抗氧化药成了防治 AS 的新途径。文献报道中药银杏叶提取物(EGb)具有抗氧化作用^{〔2〕},是目前治疗心脑血管疾病的有效药物^{〔3〕}。我们以轻度修饰低密度脂蛋白(MM-LDL)与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共培养为实验体系,在体外研究 EGb 对 MM-LDL 诱导的 HUVEC 与人类单核细胞系 U937 细胞粘附的影响,并探讨 MM-LDL 诱导 HUVEC 粘附功能改变的机制,为阐明 AS 的早期发生机制及防治提供依据。

* 国家自然科学基金重点项目资助(No.39730220)

中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所(天津 300020)

材料和方法

1 材料

1.1 细胞培养 HUVEC 标本取自健康新生儿脐静脉,用改良 Jaffe 法^[4]进行培养。通过显微镜形态观察及抗 Willebrand 因子抗体免疫荧光标记鉴定,以 1:2 传代。本实验所用细胞为第一、二代。U937 细胞系本所免疫室惠赠,用 RPMI-1640 培养液在 37℃、5% CO₂ 温箱内培养。实验前用台盼蓝染色,活性率 > 95%。

1.2 试剂与主要仪器 牛骨明胶(本所产品)、重组肿瘤坏死因子 α(rTNFα)(美国 Calbiochem Biochemicals)、辣根过氧化物酶标抗体(美国 Sigma 公司产品)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)及 P 选择素(P-selectin)均为美国 Pharmingen 产品。银杏叶提取物(EGb,含 24% 总黄酮甙和 6% 银杏内酯,由上海第二医科大学陈维洲老师惠赠)。SPECTRAI 型酶标仪(澳大利亚)。

2 方法

2.1 MM-LDL 的制备 LDL 购自中国医学科学院基础所(利用密度梯度离心法分离)。用铁氧化方法^[5]获得 MM-LDL。用 Lowry 法^[6]测 LDL 蛋白质含量,TBA 反应法^[7]测定 MM-LDL 氧化程度。本实验所用 MM-LDL 的丙二醛含量为 2.46~3.86 nmol/mg,未氧化前的 LDL 含量为 0.78 nmol/mg。

2.2 U937 和 HUVEC 粘附实验 用直接计数法^[7]。HUVEC 培养在 24 孔培养板内待完全汇合后,按以下分组加入含有或不含有刺激剂的 199 培养基(M199)作用 4h。对照组(A 组):M199;MM-LDL 刺激组(B 组):M199 内含终浓度为 75 μg/ml 的 MM-LDL,即 M199 加 MM-LDL(终浓度为 75 μg/ml);药物干预组:(1)C 组:M199 加 MM-LDL(终浓度为 75 μg/ml)加 EGb(终浓度 125 μg/ml);(2)D 组:M199 加 MM-LDL(终浓度为 75 μg/ml)加 EGb(终浓度 250 μg/ml);(3)E 组:M199 加 MM-LDL(终浓度为 75 μg/ml)加 EGb(终浓度 500 μg/ml);阳性对照组(F 组):M199 加 rTNFα(终浓度 5.0 ng/ml)。加入浓度为 1 × 10⁶/孔 U937 细胞温育 30 min 后去除未结合的 U937 细胞,于显微镜下计数未结合的 U937 细胞数,利用下列公式计算出粘附率。

$$\text{粘附率} = \frac{\text{加入 U937 细胞数} - \text{未结合的 U937 细胞数}}{\text{加入 U937 细胞数}} \times 100\%$$

2.3 ELISA 法检测 HUVEC 表面粘附分子 HUVEC 培养在 96 孔板内待完全汇合后加入含有或

不含有刺激剂的 M199 培养液在 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 4h 或 18h。经甲醛丙酮固定液固定,0.1% 牛骨明胶封闭后,加入抗 ICAM-1、抗 VCAM-1 或抗 P-selectin 单克隆抗体 50 μl,温育 60 min。加入辣根过氧化物酶标羊抗鼠 IgG 50 μl,于 37℃ 湿盒内温育 60 min,经底物缓冲液避光显色 30 min 后终止反应,测定 492 nm 处的光吸收值(OD₄₉₂)。

2.4 统计学方法 结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Dunnett 方法。

结 果

1 MM-LDL 对 HUVEC 与 U937 粘附的影响 MM-LDL 75 μg/ml 与 HUVEC 温育 4h 组 U937 的粘附率明显增高,为(30.39 ± 5.23)%(n=7),对照组为(4.50 ± 1.01)%(n=7),两组比较差异有显著性(P<0.01)。阳性对照组 rTNFα 5.0 ng/ml 粘附率为(41.30 ± 1.16)%(n=3),与对照组比较,差异有显著性(P<0.01)。

2 EGb 对 MM-LDL 诱导 HUVEC 与 U937 细胞粘附的干预作用 用 EGb 250、500、750、1000 μg/ml 与 HUVEC 孵育 24h,发现 1000 μg/ml 组的细胞严重变形,轮廓消失或脱落,750 μg/ml 及其以下浓度各组对细胞形态无影响。我们选用了 125、250、500 μg/ml 3 个浓度分别和 MM-LDL 75 μg/ml 共同与 HUVEC 作用(实验分组如上述),结果表明 125、250、500 μg/ml EGb 组粘附率分别为(14.80 ± 3.55)%、(9.71 ± 2.84)%、(7.10 ± 1.91)%,与 MM-LDL 刺激组(30.39 ± 5.23)%比较,差异均有显著性(P<0.01),提示 EGb 具有抑制 MM-LDL 诱导 HUVEC 与 U937 细胞的粘附作用,其抑制呈浓度依赖关系。

3 MM-LDL 对 HUVEC 表面粘附分子表达的影响 见表 1。HUVEC 经 rTNFα 5.0 ng/ml 作用 4h,其表面粘附分子 VCAM-1、ICAM-1 及 P-selectin 表达均显著增高(P<0.05, P<0.01);MM-LDL 75 μg/ml 作用于 HUVEC 4h 组未见到 VCAM-1、ICAM-1 及 P-selectin 表达变化。

表 1 MM-LDL 对 HUVEC 膜表面粘附分子 VCAM-1、ICAM-1 及 P-selectin 的影响 (OD₄₉₂, $\bar{x} \pm s$)

组别	VCAM-1	ICAM-1	P-selectin
A	1.231 ± 0.288(8)	1.398 ± 0.063(5)	0.721 ± 0.211(7)
B	1.147 ± 0.258(8)	1.371 ± 0.103(6)	0.952 ± 0.340(7)
F	1.702 ± 0.361(8)*	1.661 ± 0.176(6)*	1.245 ± 0.287(4)**

注:与 A 组比较,* P<0.05,** P<0.01;() 内为样本数

讨 论

MM-LDL 能与 LDL 受体结合并具有多种生物学

活性⁽³⁾,对 AS 的作用已引起众多学者的注意。从我们的实验结果看出,未经刺激的 HUVEC 对 U937 的粘附率很低,而经 MM-LDL75 μ g/ml 处理 4h 后的 HUVEC 对 U937 粘附率增加约 6.7 倍,与文献报道一致⁽⁷⁾。此外,细胞因子 rTNF α 5.0ng/ml 处理 HUVEC 4h 后也引起 U937 显著粘附于内皮细胞($P < 0.01$)。

EGb 是将银杏的有效成分加以分离、富集后制成的制剂,其有效成分可分为两大类:银杏苦内酯是专一的血小板活化因子拮抗剂,黄酮甙类具有清除氧自由基的作用⁽⁹⁾。国外已用 EGb 治疗老年性脑功能障碍,疗效显著⁽³⁾;国内用其乙醇提取物治疗冠心病和高脂血症也取得一定疗效⁽¹⁰⁾。本研究结果显示,EGb 可剂量依赖性地抑制 MM-LDL 诱导的 HUVEC 对人类单核细胞系 U937 细胞粘附,其作用显著。已有实验证明,氧自由基在 Ox-LDL 诱导的 VEC-WBC 间相互粘附中起一定作用⁽¹¹⁾,EGb 具有对抗 Cu²⁺ 和过氧化自由基对人血浆 LDL 的氧化修饰及溶血磷脂酰胆碱致 VEC 的损伤作用⁽²⁾。据此我们推想,EGb 可能通过清除氧自由基,抑制 MM-LDL 诱导的 VEC-WBC 粘附,从而阻抑 AS 早期的发生发展,显示其具有良好防治 AS 的应用前景。

VEC 表面粘附分子 VCAM-1, ICAM-1 及 P-selectin 是介导 WBC 粘附于 VEC 的重要分子⁽¹¹⁾。为了探讨 MM-LDL 增加 VEC 对 MC 粘附机制,我们检测了 MM-LDL75 μ g/ml 处理 HUVEC 4h 后细胞膜上 VCAM-1, ICAM-1 及 P-selectin 的表达。结果显示这 3 种粘附分子表达均未增加,经 rTNF α 处理 4h 后的 HUVEC 则均明显诱导 VCAM-1, ICAM-1 及 P-selectin 表达,说明 MM-LDL 所引起的 VEC 与 U937 细胞粘附并不是通过 VCAM-1, ICAM-1 及 P-selectin 介导的,与 Kim 等⁽⁷⁾、Galdern 等⁽¹²⁾的报道一致。有文献报道几种新的粘附分子高度表达在 MM-LDL 处理的 HUVEC 膜表面及冠状动脉硬化内膜,特异性地诱导 MC 与 VEC 粘附^(12,13)。亦有人提出纤维连接蛋白可能在其中亦起作用⁽¹⁴⁾。这些参与 AS 早期发病的新粘附分子有待进一步探讨。

参 考 文 献

1. Sakai A, Kume N, Nishi E, et al. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expression in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 1997; 17: 310—316.
2. 张依宁,张 键,黄桂秋,等.银杏叶提取物对溶血卵磷脂致

血管内皮细胞损伤的保护作用. *药学学报* 1997; 32(10): 735—739.

3. Indrani M, Lucia M, Marie T, et al. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1649—1653.
4. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85: 1260—1266.
5. Maier JAM, Barenghi L, Pagani F. The protective role of high density lipoprotein on oxidized low-density-lipoprotein induced U937/endothelial cell interactions. *Eur J Biochem* 1994; 221: 35—41.
6. Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, et al. Effect of vitamin C and E supplementation on susceptibility of plasma lipoproteins to peroxidation induced by acute smoking. *Atherosclerosis* 1990; 85: 47—52.
7. Kim JA, Territo MC, Wayner E. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 427—433.
8. Avogaro P, Gazzolato G, Bittolo-Bon G, et al. Some questions concerning a small, more electronegative low density lipoprotein circulating in human plasma. *Atherosclerosis* 1991; 91: 163—171.
9. 张 煜,黄 芸.银杏叶提取物预防心肌缺血再灌注损伤的研究进展. *国外医学心血管疾病分册* 2000; 27(1): 29.
10. Chen X, Chen WZ. Recent pharmacological progress of Ginkgo biloba extract for cardiovascular and neuronal diseases. *Chin J Int Med* 1996; 2: 300—305.
11. Cominacini C, Garbin U, Frattapascini A. Lacidipine inhibits the activation of transcription factor NF- κ B and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on EC. *Hypertens* 1997; 15(12pt2): 1633—1640.
12. Galdern TM, Factor SM, Hatcher VB. An endothelial cell Adhesion protein for monocytes recognized by monoclonal antibody IG9, expression in vivo in inflamed human vessels and atherosclerotic human and watanable rabbit vessels. *Lab Invest* 1994; 70(6): 836—849.
13. McEvoy LM, Sun H, Tsao PS, et al. Novel adhesion molecule involved in monocyte adhesion to aortic endothelium in model of atherosclerosis. *J Exp Med* 1997; 185: 2069—2077.
14. Shih PT, Elises MJ, Fang ZT, et al. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocytes adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating β 1 integrin. *J Clin Invest* 1999; 103(5): 613—625.

(收稿:1999-09-24 修回:2000-03-03)