

· 论 著 ·

# 丙丁酚对自由基损伤内皮细胞的保护作用与一氧化氮的关系\*

廖端芳 陈剑雄 黄红林 唐小卿 曹建国 余麟  
(衡阳医学院心肺药理研究室 衡阳 421001)

## Correlation between the Protection of Probucol on Injury of Endothelial Cells by Free Radicals and the Activity of Nitric Oxide

LIAO Duan-Fang, CHEN Jian-Xiong, HUANG Hong-Ling, TANG Xiao-Qing, CAO Jian-Guo and YU Lin  
(Department of Cardiopulmonary Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, Hunan, China)

**ABSTRACT** We investigated the effects of probucol on endothelial damage induced by exogenous free radicals and on activity of nitric oxide (NO). The results demonstrated that rabbit aortic rings incubated with xanthine (X, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and xanthine oxidase (XO, 100 U  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) for 30 min showed weak response to acetylcholine and that cultured bovine aortic endothelial cells incubated with X-XO for 30 min showed decrease of NO release and increase of malondialdehyde content. Probucol (40, 80 and 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could protect endothelial cells from injury due to X-XO in a concentration-dependent manner. Inactivator of NO oxidized hemoglobin (OHb, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), not synthesis inhibitor of NO  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine ( $\text{N}^{\text{G}}$ -L-Arg, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), could abolish the effect of probucol. In the inhibitive experiment of NO synthesis and effect, we observed that the acetylcholine

-induced relaxation ratio of aortic rings was reduced by  $\text{N}^{\text{G}}$ -L-Arg, OHb and NO antagonist methylene blue (MB, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Probucol 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  could contend with the relaxing inhibition of O Hb and MB not  $\text{N}^{\text{G}}$ -L-Arg. Our data indicate that probucol can protect endothelial cells from damage due to free radicals. The mechanism of such protection may be partly associated with the maintenance of NO activity.

**KEY WORDS** Nitric oxide; Probucol; Oxygen free radicals; Endothelial cells

**摘要** 本文观察了抗氧化剂丙丁酚对外源性氧自由基损伤动脉内皮细胞的保护作用与其对一氧化氮合成释放的关系。结果显示:兔胸主动脉血管环和培养牛主动脉内皮细胞与黄嘌呤+黄嘌呤氧化酶孵育 30 min 后,乙酰胆碱诱导的血管舒张百分率减少,内皮细胞释放一氧化氮的能力降低,脂质过氧化物含量升高。丙丁酚(40、80 和 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )均能保护内皮细胞免受黄嘌呤+黄嘌呤氧化酶损伤,且呈剂量依赖性。丙丁酚的作用可被一氧化氮灭活剂氧化血红蛋白阻断而不能被一氧化氮合成酶抑制剂  $\text{N}^{\text{G}}$ -硝基-L-精氨酸阻断。血管内皮一氧化氮合成与效应抑制实验显示: $\text{N}^{\text{G}}$ -硝基-L-精氨酸、氧化血红蛋白和一氧化氮效应拮抗剂美蓝均能使乙酰胆碱诱导的血管环舒张百分率降低。丙丁酚能对抗氧化血红蛋白和美蓝的作用,但对  $\text{N}^{\text{G}}$ -硝基-L-精氨酸的作用无影响。表明丙丁酚保护血管内皮细胞免受氧自由基损伤可能与保护内皮细胞释放的一氧化氮活性有关。

**关键词** 一氧化氮; 丙丁酚; 氧自由基; 内皮细胞

\*国家自然科学基金资助课题 (39200151); The Japan Foundation of Cardiovascular Research 资助课题。

丙丁酚是唯一能有效地缓解纯合子型家

族性胆固醇低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)受体缺如患者皮肤和肌腱黄色瘤及阻止纯合子型 Watanabe 遗传性高脂血症家兔动脉粥样硬化发展的药物<sup>[1]</sup>。近年研究表明:丙丁酚不仅具有降胆固醇作用,更重要的是它还具有抗氧化作用。丙丁酚能阻止 LDL 氧化修饰<sup>[2]</sup>,强化高密度脂蛋白的胆固醇逆转运功能<sup>[3,4]</sup>。Ku 等<sup>[5]</sup>报道丙丁酚能抑制氧化 LDL 所致的巨噬细胞分泌白细胞介素-1,从而抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化。在食饵性高胆固醇血症家兔,丙丁酚能抑制氧自由基 (oxygen free radicals, OFR)介导的内皮细胞粘附性改变<sup>[6]</sup>,保护内皮细胞释放内皮源性舒张因子 (endothelium-derived relaxing factors, EDRF)的能力免受氧化 LDL 损伤<sup>[7]</sup>。丙丁酚能否直接对抗 OFR 损伤内皮细胞?它的抗氧化作用与内皮细胞释放一氧化氮 (nitric oxide, NO) 之间的关系如何?尚不清楚。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

丙丁酚 (ProbucoI, PBC)、苄肾上腺素、N-硝基-L-精氨酸 ( $N^G$ -nitro-L-arginine,  $N^G$ -L-Arg)、美蓝、黄嘌呤和 199 培养基均为 Sigma 公司产品,硫代巴比妥酸为 Fluka Co (Swiss) 产品;黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 和血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 为中国科学院上海生物化学研究所产品,氯化乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 由上海试剂三厂生产。

### 1.2 离体兔胸主动脉黄嘌呤—黄嘌呤氧化酶损伤模型

参照作者的方法<sup>[8]</sup>,取兔胸主动脉,剪成长约 4 mm 血管环,置于 37℃ 通气 (5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub>) 的克氏液中,加入黄嘌呤 (100 μmol · L<sup>-1</sup>, 终浓度,下同) 和黄嘌呤氧化酶 (XO, 100 U · L<sup>-1</sup>) 共同孵育 30 min。然后用不锈钢钩将环固定于离体血管浴槽中,取静息张力 4.0 g 平衡 90 min,在新福林预收缩的基础上,观察 ACh 诱导的舒张百分率。丙丁酚和/或氧化血红蛋白 (oxidized hemoglobin, OHb) 等在黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶 (xanthine-xanthine oxidase, X-XO) 前 5 min 加入,共同孵育。

### 1.3 牛主动脉内皮细胞培养

参照 Booyse 等<sup>[9]</sup>描述的方法进行。胎牛经颈动脉放血致死,无菌取出整段胸主动脉,剥去外膜结缔组织,用 D-Hank's 液冲洗 3~4 次,纵向剪开血管,内膜朝下置于培养皿内,以 0.25% 胰酶消化 (37℃, 15 min),加等量 20% 小牛血清 199 培养液终止消化。用小匙轻刮内膜,收集液体离心 (1 000 × g, 10 min),弃上清,加培养液制成细胞悬液,种植于培养瓶中,置 37℃ 培养,将第三代融合细胞按 2 × 10<sup>4</sup> · ml<sup>-1</sup> 移植到 24 孔培养板中,待内皮细胞快融合时,作如下处理:①正常对照组;②X-XO 处理组,每孔含黄嘌呤 100 μmol · L<sup>-1</sup> 和 XO 100 U · L<sup>-1</sup>;③丙丁酚处理组,在加 X-XO 前 10 min 加入丙丁酚 (80 μmol · L<sup>-1</sup>);④N<sup>G</sup>-L-Arg 抑制组,在加 X-XO 前,同时加入丙丁酚和 N<sup>G</sup>-L-Arg (100 μmol · L<sup>-1</sup>),待 X-XO 作用 30 min 后,取培养液测 NO 和脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO)。

### 1.4 氧化血红蛋白 (OHb) 的制备<sup>[10]</sup>

商品血红蛋白为混合型,用前将血红蛋白与硫代硫酸钠按 1 mol : 10 mol 混合于蒸馏水中,反应 2 h,将混合物放入透析袋透析 24 h,得 1 mmol · L<sup>-1</sup> OHb。

### 1.5 培养液中 NO 微量及 LPO 测定

培养液 NO 微量测定法参考文献<sup>[11,12]</sup>进行。取培养液 500 μl,加入 35% 磺基水杨酸 100 μl 沉淀蛋白,离心 (-4℃, 10 000 × g, 15 min),取上清液 40 μl,加入 5% NH<sub>4</sub>Cl 50 μl, 5% NaOH 10 μl,室温放置 10 min。然后加 Griess 试剂 100 μl, 60℃ 水浴, 0℃ 冰浴各 10 min,用酶联免疫仪在 570 nm 读取光密度。同时以亚硝酸盐作标准曲线,结果以 NO 转变为亚硝酸盐的量表示。LPO 按硫代巴比妥酸法<sup>[13]</sup>进行,结果以丙二醛的含量表示。

### 1.6 血管内皮 NO 合成与效应抑制实验

血管环实验方法同 1.2,不同的是血管环不经 X-XO 孵化,先在浴槽中分别加入 OHb (100 μmol · L<sup>-1</sup>)、美蓝 (100 μmol · L<sup>-1</sup>) 和 N<sup>G</sup>-L-Arg (100 μmol · L<sup>-1</sup>) 观察 ACh 诱导血管环舒张百分率。再观察 OHb、美蓝和 N<sup>G</sup>-L-Arg 分别与丙丁酚同时存在情况下,ACh 诱导的舒张百分率,并与正常情况下 ACh 的作用比较,以分析丙丁酚对 NO 释放及效应各环节的影响。

1.7 所有实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,所有数据经微电脑作方差分析后进行校正 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 对 X-XO 损伤主动脉舒张功能的影响

血管环与 X-XO 共同孵育 30 min 后对 ACh ( $0.01 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的舒张反应性降低, 丙丁酚 ( $40, 80$  和  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 均可

明显对抗 X-XO 所致内皮功能损伤, 且呈剂量依赖性。丙丁酚  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的作用被 NO 灭活剂 OHb 所阻断, 但不被  $\text{N}^G\text{-L-Arg}$  阻断 (Table 1)。

Table 1. Protective effect of PBC on X-XO-induced endothelium damage of rabbit aorta *in vitro*.

Groups	relaxation of ACh (%)			
	0.01 $\mu\text{mol}$	0.1 $\mu\text{mol}$	1 $\mu\text{mol}$	10 $\mu\text{mol}$
control	4.7 $\pm$ 3.1	20.2 $\pm$ 8.3	44.7 $\pm$ 7.4	66.2 $\pm$ 8.4
X-XO	1.2 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 5.1**	21.9 $\pm$ 6.0***	28.5 $\pm$ 7.3***
PBC <sub>40</sub>	5.0 $\pm$ 3.3	20.6 $\pm$ 6.5**	32.0 $\pm$ 8.5**	42.9 $\pm$ 8.8***
PBC <sub>80</sub>	4.2 $\pm$ 2.7	20.8 $\pm$ 4.8**	53.8 $\pm$ 9.6***	55.9 $\pm$ 9.3***
PBC <sub>120</sub>	3.5 $\pm$ 1.5	21.6 $\pm$ 8.4**	53.6 $\pm$ 6.6***	69.1 $\pm$ 3.7***
PBC <sub>80</sub> +OHb	1.6 $\pm$ 1.2	8.5 $\pm$ 4.4**	36.1 $\pm$ 12.0***	38.9 $\pm$ 15.7***
PBC <sub>80</sub> +N <sup>G</sup> -L-Arg	3.8 $\pm$ 1.2 <sup>+</sup>	18.7 $\pm$ 3.6 <sup>+</sup>	50.2 $\pm$ 5.4	52.0 $\pm$ 6.1

control; ACh control; X-XO; ACh response on xanthine plus xanthine oxidase; PBC<sub>40-120</sub>; ACh response after incubated with X-XO in the presence of 40, 80, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  probucol; PBC<sub>80</sub>+OHb (or N<sup>G</sup>-L-Arg); ACh response after incubated with X-XO in the presence of 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  probucol and 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  OHb (or N<sup>G</sup>-L-Arg).  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ . #,  $P<0.05$ , ##,  $P<0.01$  vs control; \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$  vs X-XO; +,  $P>0.05$ , ++,  $P<0.05$ , +++,  $P<0.01$  vs PBC<sub>80</sub>.

### 2.2 对 X-XO 损伤内皮细胞功能的影响

培养的牛主动脉内皮细胞与 X-XO 作用 30 min 后, 其培养液中过氧化脂质代谢产物丙二醛含量增加, NO 含量降低。丙丁酚 ( $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能有效地保护内皮细胞免受 X-XO 损伤, N<sup>G</sup>-L-Arg 抑制内皮细胞合成释放 NO ( $1.12 \pm 0.14$  对  $1.81 \pm 0.16$ ,  $P<0.01$ ), 但不能阻断丙丁酚的作用; 而 OHb 则可阻断之 (Table 2, Table 3)。

Table 2. Effect of probucol on NO release of bovine aortic endothelial cell ( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	n	Nitrite ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
control	4	1.81 $\pm$ 0.16
X-XO	8	0.94 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub>	4	1.81 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub> +N <sup>G</sup> -L-Arg	6	1.29 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub> +OHb	5	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>d</sup>
PBC <sub>80</sub>	5	1.55 $\pm$ 0.29 <sup>e</sup>
N <sup>G</sup> -L-Arg	4	1.12 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>

a:  $P<0.01$  vs control; b:  $P<0.01$  vs X-XO; c:  $P>0.05$  vs X-XO+PBC<sub>80</sub>; d:  $P<0.01$  vs X-XO+PBC<sub>80</sub>; e:  $P>0.05$  vs control.

Table 3. Effect of probucol on MDA content of bovine aortic endothelial cell ( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	n	nitrite ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
control	4	4.69 $\pm$ 0.24
X-XO	6	6.33 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub>	4	5.00 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub> +N <sup>G</sup> -L-Arg	5	4.95 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
X-XO+PBC <sub>80</sub> +OHb	4	6.38 $\pm$ 0.48 <sup>d</sup>

a:  $P<0.01$  vs control; b:  $P<0.01$  vs X-XO; c:  $P>0.05$  vs X-XO+PBC<sub>80</sub>; d:  $P<0.01$  vs X-XO+PBC.

### 2.3 对 N<sup>G</sup>-L-Arg、OHb 和美蓝抑制 NO 合成及效应的影响

从 Figure 可见, NO 合成抑制剂 N<sup>G</sup>-L-Arg、NO 灭活剂 OHb 和 NO 效应阻断剂美蓝, 均能降低 ACh 诱导的舒张反应, 丙丁酚  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可对抗 OHb 和美蓝的作用, 但对 N<sup>G</sup>-L-Arg 的作用无影响。

## 3 讨论

Simon 最近报道, 在食饵性高脂血症和

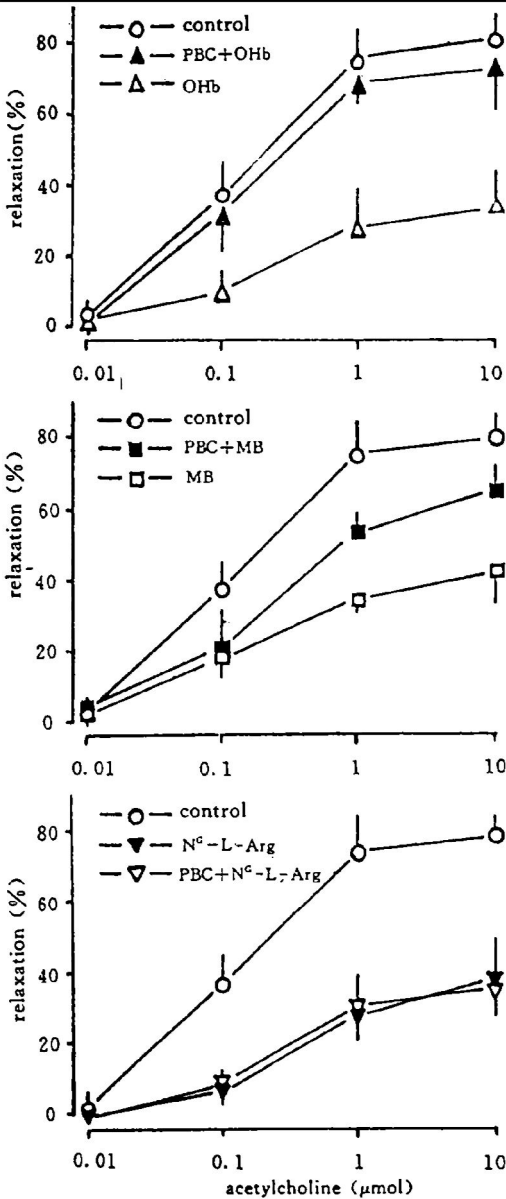


Figure. Effect of probucol on acetylcholine-induced nitric oxide release of rabbit aorta *in vitro*.

control; acetylcholine control; OHb, MB and N<sup>G</sup>-L-Arg; acetylcholine response in the presence of 100 μmol oxidized hemoglobin, 100 μmol methylene blue and 100 μmol N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine respectively; PBC+OHb or MB or N<sup>G</sup>-L-Arg; acetylcholine response in the presence of probucol 80 μmol and oxidized hemoglobin or methylene blue or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine.  $\bar{x} \pm s$ , n=5; ##, P<0.01 vs control; \*\* P<0.01 vs OHb;  $\Delta\Delta$ , P<0.01 vs MB; ++, P>0.05 vs N<sup>G</sup>-L-Arg.

动脉粥样硬化家兔模型, 丙丁酚在不明显降低血清胆固醇的条件下能保护高血脂症家兔的主动脉内皮依赖性松弛特性, 但对非内皮依赖性松弛剂硝普钠的作用没有影响, 因而推测丙丁酚的作用与保护内皮细胞 NO 的释放功能和保护 NO 活性有关<sup>(7)</sup>, 但丙丁酚到底对 NO 的合成释放及作用环节有何影响尚不清楚。我们发现, 丙丁酚可对抗 X-XO 系统所产生的 OFR 直接造成的动脉内皮损伤, 保护 ACh 诱导的舒张百分率和降低过氧化脂质含量。丙丁酚的保护作用被 OHb 减弱, 但不能被 N<sup>G</sup>-L-Arg 拮抗。丙丁酚还能直接拮抗美蓝、OHb 对 ACh 诱导血管内皮依赖性舒张的抑制, 但对 N<sup>G</sup>-L-Arg 的作用无影响。

NO 或 EDRF 是血管内皮细胞合成释放的一种内源性舒血管活性物质, 在调节血管张力、维持内皮细胞本身抗损伤能力方面起重要作用, NO 一方面激活平滑肌细胞内的鸟苷酸环化酶, 使 cGMP 水平升高, 抑制细胞外钙内流和内钙释放, 使平滑肌细胞松弛; 另一方面也有消除自由基的作用, 血管局部 NO 减少, 其危害之一是动脉壁孔减少, 使 LDL 穿过血管壁的时间延长, 增加 LDL 氧化。超氧化物歧化酶通过提高 NO 活性, L-精氨酸通过使 NO 增加都具有抗内皮损伤和抗动脉粥样硬化作用<sup>(14,15)</sup>, 但 NO 半衰期很短, 易被代谢破坏。N<sup>G</sup>-L-Arg 为 NO 合成酶抑制剂, N<sup>G</sup>-L-Arg 不能取消丙丁酚的内皮保护作用, 丙丁酚也不能拮抗 N<sup>G</sup>-L-Arg 的内皮舒张抑制作用, 提示丙丁酚对内皮释放 NO 没有影响, OHb 虽与 NO 有高度亲和力, 但它是一种大分子蛋白质, 不易在细胞内灭活 NO, 而 NO 通过扩散方式可自由进出细胞膜, OHb 在细胞外与扩散出细胞的 NO 结合, 降低了 NO 的内皮保护作用。同时 OHb 的作用使 NO 的扩散方式朝管腔内移动, 使扩散进入平滑肌的 NO 量减少, 舒血管作用减弱。我们观察到丙丁酚和 OHb 在抗自由基损伤内皮, 抑制内皮依赖性舒张方面

互相拮抗, 说明丙丁酚能保护 NO 活性或延缓 NO 代谢。美蓝本身也是一种氧化剂, 美蓝也可以与 NO 直接作用, 但更重要的是美蓝能进入细胞内将鸟苷酸环化酶的亚铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白<sup>[10]</sup>, 因而能阻断 NO 发挥效应, 丙丁酚是一种脂溶性非常强的抗氧化剂, 能进入细胞对抗美蓝的氧化作用, 我们在实验中发现丙丁酚能对抗美蓝的血管舒张抑制作用。

上述结果表明: 丙丁酚对自由基损伤内皮细胞的保护作用可能与其保护 NO 活性, 延缓 NO 代谢有关, 而不是促进内皮细胞合成释放 NO。

**致谢** 湖南医科大学陈修教授赠送 ProbucoI, 本院计算机教研室周怡副教授在数据计算机处理方面给予大力支持。

### 参考文献

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE. In vivo inhibition of foam cell development by probucol in watanabe rabbits. *Am J Cardiol*, 1988, 62: 6B~12B.
- Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, et al. ProbucoI inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1986, 77: 641~644.
- Schwartz CJ. Introduction—the probucol experience, A review of the past and a look at the future. *Am J Cardiol*, 1988, 62: 1B~5B.
- Goldberg RD, Kamel OC, Mendez AJ. ProbucoI enhances cholesterol efflux from cultured human skin fibroblasts. *Clin Res*, 1987, 35: 3
- Ku G, Doherty NS, Wolos JA, et al. Inhibition by probucol of interleukin 1 secretion and its implication in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1988, 62: 77B~81B.
- Ferns GAA, Forster L, Stewart-Lee A, et al. ProbucoI inhibits mononuclear cell adhesion to vascular endothelium in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis*, 1993, 100: 171~181.
- Simon BC, Haudenschild CC, Cohen RA. Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 21: 897~901.
- Liao DF (廖端芳), Chen X. Prostacyclin-mediated protection by angiotensin-converting enzyme inhibitors against injury of aortic endothelium by free radicals. *Cardioscience*, 1992, 3: 79~84.
- Booyse FM, Sedlak BJ, Jr Rafelson ME. Culture of arterial endothelial cells; Characterization and growth of bovine aortic cell. *Thromb Diath Haemorrh*, 1975, 34: 825~839.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985, 232: 708~716.
- Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sciences*, 1992, 51: 1621~1629.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, 126: 131~138.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351~358.
- Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, et al. Chronic treatment with polyethyleneglycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol fed rabbit. *Circ Res*, 1991, 69: 1293~1300.
- Cooke JP, Singer AH, Tsao P, et al. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 1992, 90: 1168~1172.

(本文 1994-08-31 收到)