

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2018) 02 - 0109 - 05

氧化应激体外模型的构建及沙利度胺保护作用的研究

高红亮, 吴超, 王超, 程倩, 李曙

(皖南医学院 病理生理学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 通过构建体外氧化应激损伤模型, 探讨沙利度胺(Thalidomide) 的保护作用以及最佳的作用时间点和浓度。**方法:** 体外氧化应激损伤模型采用脂多糖(LPS) 构建, 流式细胞术测定 LPS 最佳造模时间及浓度。MTT 法测定沙利度胺的无细胞毒性浓度。流式细胞术测定沙利度胺最佳预处理时间及不同浓度沙利度胺的保护作用。**结果:** MTT 结果显示沙利度胺浓度在 0 ~ 125 mg/L 范围内对人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 基本是无损伤的, 故选取沙利度胺最大浓度作为后续试验的浓度。流式细胞术结果显示, 较低浓度的 LPS 即可引起凋亡, 与处理 6、12 h 相比, 0.25、0.5 mg/L LPS 分别处理 HUVEC 24 h 后的凋亡率增加($P < 0.05$), 且 1 mg/L LPS 处理 HUVEC 24 h 后凋亡率最高达到 92%, 相比处理 6 h 和 12 h 后的凋亡率, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。2 mg/L LPS 处理 HUVEC 在各个时间点与 1 mg/L LPS 处理后的凋亡率基本没有差别。100 mg/L 沙利度胺预处理 6 h 后凋亡率比模型组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但是与预处理 12、24 h 相比, 凋亡率基本没有改变, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外, 100 mg/L 沙利度胺预处理后凋亡率(31.5%) 相比 10 mg/L(52.6%) 和 1 mg/L(68.6%) 的沙利度胺预处理, 凋亡率下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** 氧化应激损伤模型已成功构建, 可用于进一步研究; 沙利度胺可以保护 LPS 诱导的氧化应激下的细胞损伤, 为沙利度胺进一步应用于临床提供了很好的依据。

【关键词】沙利度胺; 脂多糖; 氧化应激; 保护作用

【中图分类号】R 329.25; R 96 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.02.003

Construction of oxidative stress model in vitro and observation on the protective effect of thalidomide on oxidative stress

Gao Hongliang, Wu Chao, Wang Chao, Chen Qian, Li Shu

Department of Pathophysiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the protective effect of thalidomide as well as its optimal time and concentration on the oxidative stress injury model developed in vitro. **Methods:** Oxidative stress injury model was constructed in vitro technique with lipopolysaccharides (LPS), and flow cytometry was used to determine the optimal time and concentration of LPS. MTT assay was performed to determine the cytotoxic concentration of thalidomide. Then flow cytometry was used to determine the optimal pretreatment time of thalidomide and the protective effect of different concentration of thalidomide on the injury model. **Results:** MTT assay showed that thalidomide concentration in between 0 and 125 mg/L produced no cytotoxic effect on human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) , for which the maximum concentration of thalidomide was selected as the reference for subsequent tests. Flow cytometry showed that low concentration of LPS had led to apoptosis of HUVECs, and apoptosis rate was significantly increased for HUVECs treated by LPS in dose of 0.25 mg/L and 0.5 mg/L after 24 h compared to the treatment after 6 h and 12 h($P < 0.05$), and the apoptosis rate of HUVECs was up to 92% at 24 h after LPS treatment in dose of 1 mg/L. The difference was significant in apoptosis rate as compared to the rate at 6 and 12 h after LPS treatment($P < 0.05$), yet was insignificant compared to the rate at 12 and 24 h following treatment($P > 0.05$). The apoptosis rate of HUVECs had no difference between LPS treatment in dose of 2 mg/L and 1 mg/L at different time point. The apoptosis rate was significantly lower than that of model group at 6 h after pretreatment with thalidomide in dose of 100 mg/L ($P < 0.05$), yet remained no obvious change as compared to the rate at 12 and 24 h($P > 0.05$). In addition, the apoptosis rate of HUVECs was different by pretreatment with thalidomide in dose of 100 mg/L(31.5%) from that in dose of 10 mg/L(52.6%) and 1 mg/L(68.6%) ($P < 0.05$). **Conclusion:** Oxidative stress injury model was successfully constructed, and can be used for following study purpose. Additionally, thalidomide can produce protective effect on cell injury from oxidative stress induced by LPS, which may be good basis for following research of

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016172); 大学生创新训练计划(201510368038, 201610368116)

收稿日期: 2017-10-16

作者简介: 高红亮(1993-), 男, 2015 级硕士研究生, (电话) 17730082405, (电子信箱) 17730082405@163.com;

李曙, 男, 副教授, 博士, (电子信箱) yxx2003@126.com, 通信作者。

thalidomide in clinical use.

【Key words】thalidomide; LPS; oxidative stress; protective effect

氧化应激是指机体在遭受到有害刺激后, 机体细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 产生过多, 导致组织和细胞的损伤^[1]。由于氧化应激的增强, 组织细胞内 ROS 水平急剧上升, 而抗氧化酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT) 等活性降低, 使得 ROS 大量生成积聚, 损伤核酸、蛋白质及脂质, 导致炎症因子表达, 并触发包括平滑肌细胞增殖和迁移在内的多种病理反应, 甚至引起细胞凋亡或坏死^[2-5]。氧化应激与临床上多种疾病的发生发展有着极大的联系, 如动脉粥样硬化发生发展、肺纤维化、癫痫、高血压等^[6]。沙利度胺(反应停又名酞胺哌啶酮, Thalidomide) 最初作为镇静剂治疗妊娠呕吐, 因有致畸作用(婴儿海豹肢) 而被禁用。随着近年来的研究, 沙利度胺作为抗血管生成剂和免疫调节剂被用于多种疾病的治疗^[7], 但是在对抗炎症引起的氧化应激损伤中的研究较少, 本实验旨在通过体外炎症氧化应激模型的构建, 观察沙利度胺对其的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂 沙利度胺购于常州制药厂, 为纯品原料药, 将其溶解于二甲基亚砜(DMSO) 后得终浓度为 50 g/L 的母液。四甲基偶氮唑蓝(MTT) 试剂盒购于碧云天生物有限公司, 脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS) (货号 L2880, Sigma 公司), 凋亡试剂盒(Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 获于弋矶山医院中心实验室。用 DMEM 培养基加 10% 胎牛血清于 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 同时在培养基中加入双抗(1% 青霉素和链霉素) 共同培养。

1.2.2 MTT 实验 MTT 法检测沙利度胺对于 HUVEC 的无毒性浓度范围。消化培养处于对数生长期的 HUVEC, 接种在 96 孔培养板中, 保证细胞密度为 1×10^4 /孔, 次日待贴壁后, 换液, 加入沙利度胺终浓度分别为 1000、500、250、62.31 mg/L 的无血清培养基, 每个浓度设 3 个副孔, 继续培养 24 h 后加入 MTT(5g/L) 各 20 μ L, 继续在培养箱培养 4 h 后, 吸出培养液, 将 DMSO 150 μ L 分别加入每孔, 摇床上避光轻微振荡 5 min 使结晶紫充分溶解, 在酶

标仪 570 nm 波长下测吸光度(C) 值。

1.2.3 流式细胞术检测最佳造模浓度及时间

LPS 浓度设为 4 组(0.125、0.25、0.5、1 mg/L), 分别处理 HUVEC 6、12、24 h 后 PBS 洗 2 遍, 收集细胞上清液离心, 接着采用 0.25% 不含 EDTA 的胰酶消化, 制备浓度为 1×10^6 个细胞/mL 的单细胞悬液, 2000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 收集细胞, 用 200 μ L 缓冲液重悬, 分别加入 5 μ L FITC 和 10 μ L PI, 4℃ 避光孵育 15 min。用 PBS 将悬液补充至 700 μ L, 上机检测。采用流式细胞术检测 LPS 不同浓度及时间点的凋亡率。

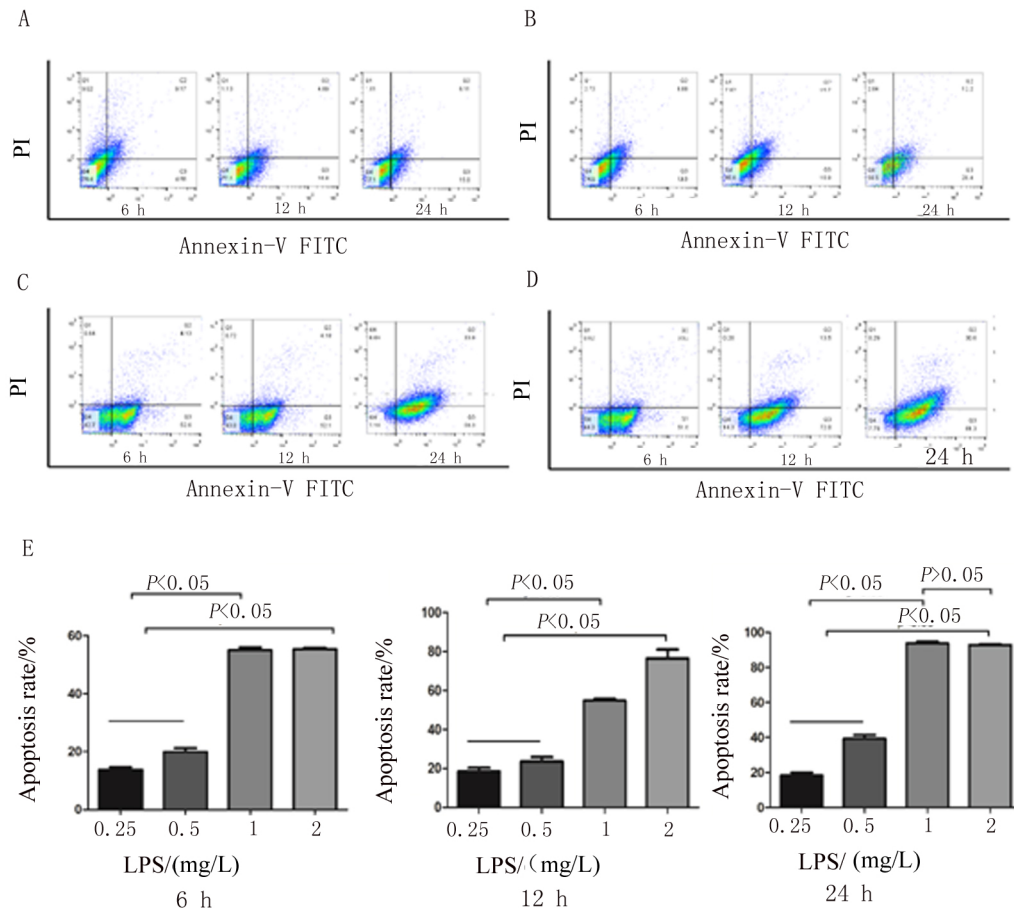
1.2.4 流式细胞术检测沙利度胺最佳预处理时间

分别用沙利度胺无细胞毒性的最大浓度预处理 HUVEC 6、12、24 h 后直接加入 LPS 处理, 采用流式细胞术检测沙利度胺不同预处理时间的凋亡率。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 凋亡率的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 最佳作用时间及浓度的确定 通过流式细胞术测定 LPS 最佳作用时间及浓度, 结果显示, 较低浓度的 LPS(0.25 mg/L, 图 1A) 即可引起 HUVEC 的凋亡, 且随着时间的延长, 凋亡率逐渐增加(图 1B、C、D)。处理 6 h 后我们发现不同浓度组凋亡率差异有统计学意义($F = 24.12, P = 0.00$), 通过两两比较, 1 mg/L 和 2 mg/L LPS 组与 0.25 mg/L、0.5 mg/L LPS 组相比, 凋亡率升高($P < 0.05$), 而 1 mg/L 和 2 mg/L LPS 组凋亡率差异无统计学意义。在处理 12 h 时, 单因素方差分析不同浓度组凋亡率差异有统计学意义($F = 56.34, P = 0.00$), SNK 法两两比较我们发现 2 mg/L LPS 的凋亡率最高($P < 0.05$), 可以达到 80%, 但还是不能达到模型的要求。通过对处理 24 h 后不同浓度组凋亡率的方差分析($F = 42.18, P = 0.00$), 差异有统计学意义后进行两两比较, 1 mg/L LPS 处理后 24 h 的凋亡率和 2 mg/L LPS 处理 24 h 后的凋亡率都可以达到 92% 左右(图 1E), 差异无统计学意义($P > 0.05$)。故最终我们选取造模条件为 1 mg/L LPS 处理 24 h。



A ~ D: 0.25、0.5、1、2 mg/L LPS 分别作用 6、12、24 h; E: 不同浓度沙利度胺分别处理 6、12、24 h 的凋亡率比较。

图 1 流式细胞术测定 LPS 最佳作用时间及浓度

3.2 沙利度胺无细胞毒性浓度范围的确定 通过 MTT 法测定沙利度胺的无细胞毒性范围,结果显示,当沙利度胺浓度为 31、62、125 mg/L 时对细胞基本是无毒性作用的 ($P > 0.05$, vs. Control),故最终确定沙利度胺无细胞毒性浓度范围为 0 ~ 100 mg/L。见图 2。

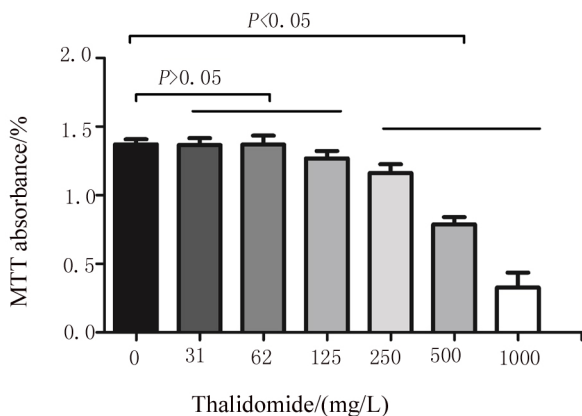
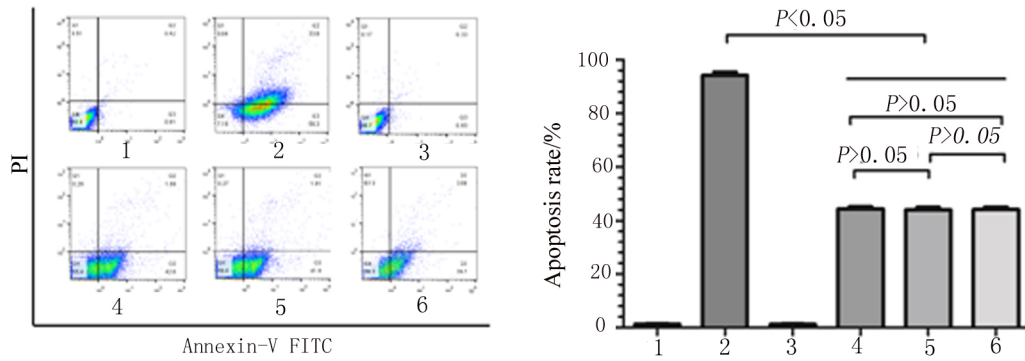


图 2 不同浓度沙利度胺对 HUVEC 活力的影响

3.3 沙利度胺最佳干预时间的确定 通过流式细

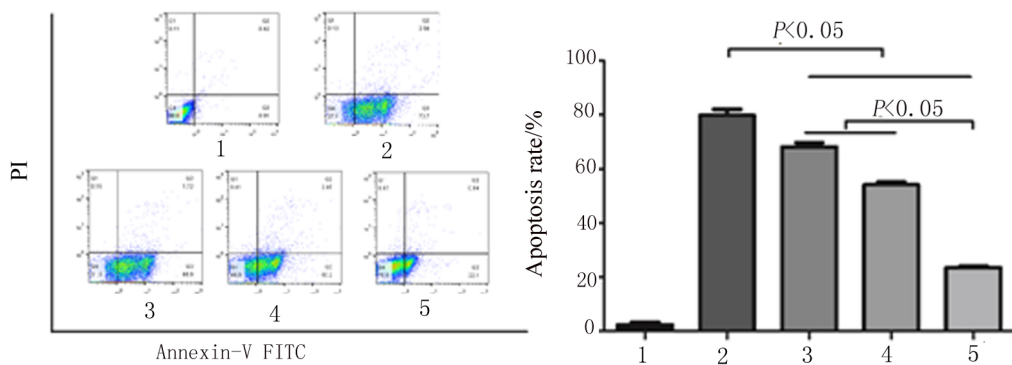
胞术测定 100 mg/L 沙利度胺最佳预处理时间,方差分析不同干预组凋亡率差异有统计学意义 ($F = 13.12, P = 0.00$),两两比较结果显示,与模型组凋亡率 (91.6%) 相比,沙利度胺预处理 6 h (43.26%)、12 h (44.29%)、24 h (43.71%) 的凋亡率均明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但是沙利度胺预处理组各之间凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。故确定用沙利度胺预处理 6 h。见图 3。

3.4 不同浓度沙利度胺保护作用的比较 通过流式细胞术测定不同浓度沙利度胺对氧化应激的保护作用。方差分析不同浓度组凋亡率差异有统计学意义 ($F = 52.12, P = 0.00$),两两比较结果显示,与模型组凋亡率 (75.74%) 相比,沙利度胺 1 mg/L (68.62%), 10 mg/L (52.66%), 100 mg/L (23.04%) 预处理组均表现出了不同程度的保护作用,其中 100 mg/L 沙利度胺预处理组凋亡率与 1 mg/L、10 mg/L 预处理组相比,凋亡率下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。



1: 空白对照组; 2: 模型组; 3: 沙利度胺单独作用组; 4~6: 100 mg/L 沙利度胺预处理 6、12、24 h 后 LPS 作用 24 h。

图3 沙利度胺预处理不同时间点对 HUVEC 凋亡率的影响



1: 空白对照组; 2: 模型组; 3~5: 1、10、100 mg/L 沙利度胺预处理 6 h 后 LPS 作用 24 h。

图4 不同浓度沙利度胺保护作用的比较

4 讨论

在很多种疾病的发生发展过程中,氧化应激损伤都参与了其中的反应。血管内皮细胞在维持血管内环境稳定中起到重要的屏障作用,但是由于氧化应激反应的发生,首先受到损伤的便是内皮细胞,而氧化应激反应所产生的 ROS 是导致血管内皮细胞凋亡的主要因素^[8-11]。而心血管疾病发生与发展的最主要原因便是炎症。有研究表明,动脉粥样硬化斑块的形成与凋亡的内皮细胞存在着很大的联系。故通过体外构建炎症模型来探讨炎症发生时内皮细胞的保护方法显得尤为重要。LPS 是革兰阴性细菌外壁层中特有的一种化学成分,能够刺激体内多种细胞合成和释放众多内源性生物活性因子,导致全身性炎症反应发生,由此引起中毒性休克、全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征^[12-13],用于多种体外炎症模型的构建。而由于近年来沙利度胺在临床上的广泛应用,大家也把目光聚集在沙利

度胺是否能够通过抑制炎症反应来减少氧化应激损伤时内皮细胞的损伤。故本研究希望用 LPS 构建体外炎症的模型来探讨沙利度胺的抗氧化应激的效果,但是由于各个实验室的药品、细胞培养条件等的差异,我们需要筛选出适合本实验室研究的模型条件。通过流式细胞术的结果显示,低浓度的 LPS 即可引起 HUVEC 的凋亡,但是并不能达到炎症模型的要求,最后发现在相同时间点 0.25、0.5 mg/L LPS 处理后的凋亡率基本没有改变,但是 1 mg/L LPS 在处理 24 h 后的凋亡率可以达到 92%,另外在各个时间点 2 mg/L LPS 与 1 mg/L LPS 处理后的凋亡率基本相同。故最终确定 LPS 造模浓度为 1 mg/L,时间为 24 h。此外为了确定沙利度胺在发生炎症和氧化应激损伤时的保护作用,我们首先筛选了沙利度胺的无细胞毒性的浓度范围,确定其无细胞毒性浓度范围 (下转第 119 页)

浓度的磷酸溶液进行考察,结果发现在一定浓度范围内,随着磷酸浓度的增加,对峰形无明显影响,但是随着浓度的增加酸度增强,对色谱柱的损伤性也在增大且该损伤是不可逆的,最终本次实验采用了甲醇-0.1%的磷酸溶液作为流动相,效果较好。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
 [2] 段秀君. 薄层色谱鉴别法鉴别清利合剂中的当归、金银花、黄芩[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(11) : 148 - 149.
 [3] 赵琦, 张军武, 安国军. 清热解毒口服液薄层鉴别方法的改进研究[J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(6) : 957 - 958.

(上接第 112 页)

为 0 ~ 125 mg/L。此外我们还测定了沙利度胺的最佳预处理时间, 100 mg/L 沙利度胺分别预处理 6、12、24 h 后, 再加入 1 mg/L LPS 处理 24 h 后测定其凋亡率, 结果显示, 预处理 6、12、24 h 之间的凋亡率没有明显变化, 但是与模型组相比, 凋亡率降低。之后我们又测定了不同浓度的沙利度胺对于 LPS 引起的氧化应激损伤的保护作用, 发现随着沙利度胺浓度的提高, 凋亡率下降, 说明沙利度胺在氧化应激反应损伤中起到了保护作用, 且与浓度呈正相关。

综上, 我们确定了 LPS 体外炎症模型的建立和沙利度胺的预处理时间和浓度, 为在炎症发生时寻求更好的保护方式提供了更好的思路, 同时也为沙利度胺更好地服务于临床打下了理论基础。但是沙利度胺具体的保护机制还有待进一步的研究。

【参考文献】

[1] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in plant science, 2002, 7(9) : 405 - 410.
 [2] OLINSKI R, GACKOWSKI D, FOKSINSKI M, et al. Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(2) : 192 - 200.
 [3] LI H, HORKE S, FORSTERMANN U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2014, 237(1) : 208 - 219.
 [4] KATTOOR AJ, POTHINENI NVK, PALAGIR D, et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis [J]. Current atherosclerosis reports, 2017, 19(11) : 42.
 [5] KIKUCHI K, TANCHAROEN S, TAKESHIGE N, et al. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease [J]. International journal of molecular sciences,

[4] 段国玲, 王丽, 赵春香. 清咽利喉颗粒主要成分的薄层色谱鉴别[J]. 药物鉴定, 2011, 20(24) : 45.
 [5] 许春燕, 刘希望, 杨亚军, 等. 银翘蓝芩口服液薄层色谱鉴别方法研究[J]. 动物医学进展, 2015, 36(11) : 40 - 43.
 [6] 余卫兵. 消糖益肾饮中地黄、黄芪、丹参的 TLC 法鉴别[J]. 中国药师, 2008, 11(5) : 595 - 596.
 [7] 李兵. 桔梗清咽合剂的薄层鉴别研究[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(22) : 124 - 124.
 [8] 李煜, 陈延翔. 利咽清噪口服液质量标准的研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13(6) : 537 - 540.
 [9] 陈伟平, 曾玉兰, 黄晓丹. 克感利咽口服液质量标准的提高研究[J]. 中药材, 2015, 38(5) : 1078 - 1080.
 [10] 罗燕. 越鞠口服液制备工艺及质量标准研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.

2013, 14(7) : 13909 - 13930.
 [6] DING Z, LIU S, WANG X, et al. Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta [J]. Antioxidants & redox signaling, 2015, 22(9) : 760 - 771.
 [7] MERCURIO A, ADRIANI G, CATALANO A, et al. A mini-review on thalidomide: chemistry, mechanisms of action, therapeutic potential and anti-angiogenic properties in multiple myeloma [J]. Current medicinal chemistry, 2017, 24(25) : 2736 - 2744.
 [8] FU Y, HU X, CAO Y, et al. Saikosaponin a inhibits lipopolysaccharide-oxidative stress and inflammation in Human umbilical vein endothelial cells via preventing TLR4 translocation into lipid rafts [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 89: 777 - 785.
 [9] MKKELSEN L, JENSEN KA, KOPONEN IK, et al. Cytotoxicity, oxidative stress and expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells exposed to dust from paints with or without nanoparticles [J]. Nanotoxicology, 2013, 7(2) : 117 - 134.
 [10] PARK MH, HEO SJ, PARK PJ, et al. 6'-bieckol isolated from Ecklonia cava protects oxidative stress through inhibiting expression of ROS and proinflammatory enzymes in high-glucose-induced human umbilical vein endothelial cells [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2014, 174(2) : 632 - 643.
 [11] FUREKAWA S, FUJITA T, SHIMABUKURO M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome [J]. The Journal of clinical investigation, 2017, 114(12) : 1752 - 1761.
 [12] KEAMEY CJ, CULLEN SP, TYNAN GA, et al. Necroptosis suppresses inflammation via termination of TNF-or LPS-induced cytokine and chemokine production [J]. Cell Death & Differentiation, 2015, 22(8) : 1313 - 1327.
 [13] JIANG W, LUO F, LU Q, et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state [J]. Chemico-biological interactions, 2016, 243: 127 - 134.