

丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白和氧自由基 促血管平滑肌细胞增殖的影响*

胡忠华^① 廖端芳 陈临溪 黄红琳 陈剑雄 刘宗汉^①

(衡阳医学院心肺药理研究室,^① 心血管病研究所, 衡阳 421001)

The Effect of Probucol on Multiplication of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein and Oxygen Free Radicals

HU Zhong-Hua^①, LIAO Duan-Fang, CHEN Lin-Xi, CHEN Jian-Xiong, HUONG Hong-Jin and LIU Zong-Han^① (Department of Cardiopulmonary Pharmacology, ^① Institute of Cardiovascular disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT By means of cell counting and MTT assay, we observed that cultured bovine aortic smooth muscle cells (SMC) incubated with oxidized low density lipoprotein (OLDL, 0.2 g protein · L⁻¹) for 12 hours and xanthine (X, 100 μmol · L⁻¹) plus xanthine oxidase (XO, 100 U · L⁻¹) for 2 hours showed multiplication of bovine aortic smooth muscle cells and that the effects of OLDL and X-XO were significantly inhibited by probucol. Synthesis inhibitor of nitric oxide (NO) N^G-nitro-L-arginine (N^G-L-Arg, 100 μmol · L⁻¹) could not abolish the effect of probucol. Our data indicates that probucol could contend with multiplication of SMC induced by OLDL or X-XO.

KEY WORDS Oxidized low density lipoprotein; Oxygen free radicals; Probucol; Vascular smooth muscle cell

摘要 本文用细胞计数和 MTT 快速比色计量法观察到体外培养的牛主动脉平滑肌细胞分别与氧化型低密度脂蛋白和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶共同培养后, 前

者明显增殖 ($P < 0.01$)。抗氧化剂丙丁酚 (100 μmol · L⁻¹) 能抑制氧化型低密度脂蛋白和黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶促平滑肌细胞增殖作用; 一氧化氮合成酶抑制剂 N^G-硝基-L-精氨酸对两者促平滑肌细胞增殖的作用无影响, 同时也不能阻断丙丁酚的抑制两者促细胞增殖作用。这一结果提示, 丙丁酚能抑制氧化型低密度脂蛋白和外源性氧自由基促平滑肌细胞增殖, 这一作用可能与血管平滑肌细胞中一氧化氮的合成及释放无关。

关键词 氧化型低密度脂蛋白; 氧自由基; 丙丁酚; 平滑肌细胞

平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块中的主要细胞, 它的增殖在 As 形成中具有重要意义。有资料表明: 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, OLDL) 和氧自由基 (oxygen free radicals, OFR) 均可促进血管 SMC 增殖^[1]。丙丁酚既是降脂药, 又具有抗氧化作用, 它可阻止 LDL 的氧化修饰^[2]; 抑制泡沫细胞形成^[3]。丙丁酚能否抑制 OLDL 和 OFR 促血管 SMC 的增殖, 尚不清楚。我们用牛主动脉平滑肌细胞作材料, 观察了丙丁酚对一些因素促平滑肌细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

丙丁酚 (probucol, PBC), 黄嘌呤 (xanthine, X), 黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO), N^G-硝基-L-精氨酸 (N^G-nitro-L-arginine, N^G-L-Arg), M¹⁹⁹ 培养基, 二甲基噻唑-二苯基溴化四唑 [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT] 均为 Sigma 公司产品。其它试剂为分析纯。

1.2 低密度脂蛋白制备及修饰

取人新鲜血加 EDTA 抗凝, 经离心后, 血浆再进

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

行密度梯度超速离心^[4],收集 LDL,经 PBS 充分透析。然后将 LDL 置含 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 的 PBS 中, 37°C 温育 12 h, 修饰后的 LDL 在含 EDTA 的 PBS 中透析 24 h (4°C), 超滤除菌保存。

1.3 修饰程度鉴定

采用琼脂糖凝胶电泳^[5], 油红染色, OLDL 相对于 LDL 电泳迁移率为 2.1。

1.4 牛主动脉平滑肌细胞培养

常规贴块法培养 SMC。取牛胸主动脉置于 D-Hank's 液中, 沿纵轴切开血管壁, 剥离内膜, 将中膜剪成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 左右组织块, 种植于培养瓶, 加入 20% 胎牛血清 M_{199} 培养液, 将第五代融合细胞分别移植到 24 孔和 96 孔培养板中, 37°C 培养。

1.5 实验分组

本实验分对照组; OLDL ($0.2 \text{ g protein} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; OLDL 加丙丁酚 ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; OLDL 加 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; OLDL、 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 加丙丁酚组; 对照组; X-XO ($\text{X}, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{XO}, 100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; X-XO 加丙丁酚组; X-XO 加 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 组; X-XO、 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 加丙丁酚共 10 组, 每组设 4~6 孔。

1.6 细胞增殖试验

将第五代融合细胞按 $2 \times 10^5 \text{ SMC} \cdot \text{L}^{-1}$ 移植到 96 孔培养液中, 待细胞快融合时, 按以上分组加入各试剂, 37°C 培养, 前 5 组培养 12 h、后 5 组培养 2 h 后, 每孔加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT, 37°C 继续培养 12 h。二甲亚砜终止反应, 用酶免疫仪在 570 nm 读数光密度值, 以反映细胞的增殖情况。

1.7 细胞计数

将第五代融合细胞按 $4 \times 10^7 \text{ SMC} \cdot \text{L}^{-1}$ 悬液移植到 24 孔培养板中, 按以上分组加入各试剂, 37°C 培养 12 h 或 2 h 后, 去掉处理因素, 继续培养, 收集细胞, 经 0.5% 台盼蓝进行活细胞染色, 计细胞数。

1.8 实验数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异经方差齐性分析后, 用校正 t 检验。

2 结果

2.1 丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白促平滑肌细胞增殖的影响

Figure 1 示, 应用 $0.2 \text{ g protein} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL 与 SMC 相互作用 12 h 后, SMC 计数和 MTT 法测得的光密度值均增加, 与对照组相比, 差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$), 说明

OLDL 有促进 SMC 增殖的作用。培养基中有丙丁酚存在时, OLDL 与 SMC 相互作用 12 h 后, 细胞计数和光密度值不增加 ($P > 0.05$), 说明丙丁酚对 OLDL 促 SMC 增殖有抑制作用。用 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 取代丙丁酚, OLDL 促 SMC 增殖的作用又出现; 当 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 和丙丁酚同时存在于培养基中时, OLDL 促 SMC 增殖的作用不复存在; 这说明, 丙丁酚抑制 OLDL 促 SMC 增殖的作用似乎与 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 无关。

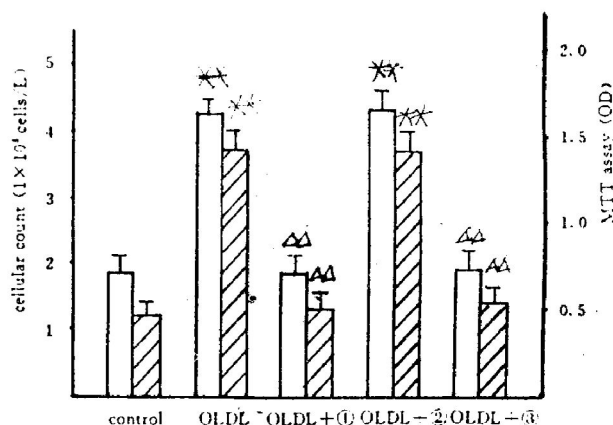


Figure 1. The effect of probucol on multiplication of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein. $\bar{x} \pm s$, $n=4$; $\Delta \Delta$ $P > 0.05$, $**$ $P < 0.01$ compared with control group. ①=probucol, ②= $\text{N}^G\text{-L-Arg}$, ③=probucol + $\text{N}^G\text{-L-Arg}$, similarly hereinafter.

2.2 丙丁酚对黄嘌呤--黄嘌呤氧化酶促平滑肌细胞增殖的影响

Figure 2 示, 应用 X-XO ($\text{X}, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{XO}, 100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 SMC 相互作用 2 h 后, 与对照组相比较, 培养液中细胞计数明显增加, MTT 法测定的光密度值也明显增加 ($P < 0.01$), 说明 X-XO 有促进 SMC 增殖的作用。培养基中有丙丁酚存在时, 与对照组比较, 细胞计数和光密度值都不增加 ($P > 0.05$), 说明丙丁酚能取消 X-XO 促 SMC 增殖作用。将培养基中的丙丁酚换成 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$, X-XO 促 SMC 增殖作用依然存在; 当丙丁酚与 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 同时出现在培养基中出现时, X-XO 促 SMC 增殖作用又不出; 这说明丙丁酚取消 X-XO 促 SMC 增殖的作用似乎与 $\text{N}^G\text{-L-Arg}$ 无关。

3 讨论

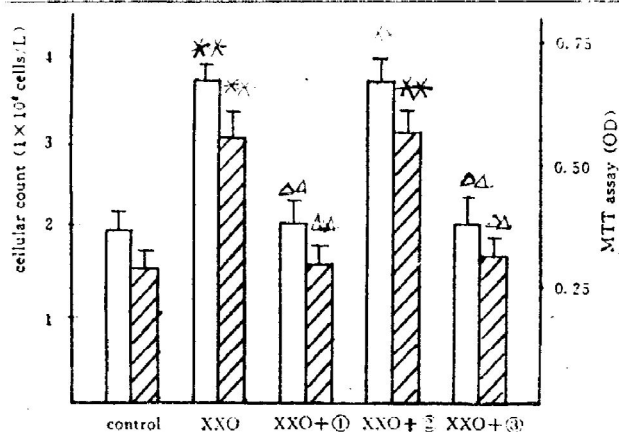


Figure 2. The effect of probucol on multiplication of vascular smooth muscle cells induced by xanthine plus xanthine oxidase. $\bar{x} \pm s, n=4$; $\Delta\Delta$: $P>0.05$, $**P<0.01$ compared with control group.

动脉血管平滑肌细胞增殖是 As 的主要病理改变,因此对 SMC 增殖机理的研究,一直是探讨 As 发病机制的热点之一。大量资料表明:多种生长因子、细胞因子、血管活性多肽等能促进 SMC 增殖、迁移。近年来的研究还发现:OLDL,活性氧可使体外培养的血管 SMC 增殖^[1]。我们的实验进一步证实 OLDL 可促进牛主动脉 SMC 增殖,经黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶所产生的 OFR 也可促使牛主动脉 SMC 增殖。

文献报道,丙丁酚能有效地缓解遗传性高脂血症家兔 As 的发展^[3]。最近研究表明:丙丁酚还能阻止 LDL 氧化修饰^[2];抑制 OLDL 所致的巨噬细胞的白细胞介素-1 分泌,从而阻止巨噬细胞向泡沫细胞的转化^[6];保护内皮细胞释放内皮源性舒张因子的能力免受 OLDL 损伤^[7]。本实验还发现,丙丁酚能抑制 OLDL、X-XO 促进牛主动脉 SMC 增殖作用,并且这一抑制效应不能被一氧化氮合成酶抑制剂 N^G -L-Arg 阻断。

近年来的研究发现,一氧化氮(nitric oxide, NO)就是血管内皮细胞所释放的内皮源性舒张因子。它是由 L-精氨酸和分子氧在 NO 合成酶催化下生成的,NO 合成酶是 NO 生成的关键酶。NO 被认为是一种新的细胞信使分子参与细胞内信息传导。它具有舒张血管,降低血压,抑制血管 SMC 的增殖等许多重要的生理作用,在 As 和高血压等疾病发病中具有重要

意义。Busses^[8]发现,SMC 也可产生 NO,这是否参与 SMC 增殖这一过程,尚不清楚。我们的实验发现 NO 合成酶阻断剂 N^G -L-Arg 不能取消丙丁酚的作用,提示丙丁酚的作用亦可能与 SMC 的 NO 合成及释放无关。

平滑肌细胞增殖机理尚不完全清楚。多种生长因子可与 SMC 膜上的特异性受体结合,通过一系列复杂的细胞内信息传导,使细胞增殖。许多资料表明,原癌基因 c-myc、c-myb 表达与 SMC 增殖和分化有着密切的关系,它可能是各种细胞生长信息引起细胞增殖的信息传导的终端。蛋白激酶 C、胞浆钙也可能参与这一信号传导过程。丙丁酚做为一种强的抗氧化剂,它具有多方面抗 As 作用,本文发现丙丁酚有对抗 OLDL、OFR 促 SMC 增殖的作用,其作用机理有待进一步研究。

致谢 湖南医科大学陈修教授赠送丙丁酚。

参考文献

- 1 Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*, 1992, **70**: 593.
- 2 Parthasarathy S, Young SG, Witzt JL, et al. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1986, **77**: 641.
- 3 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.
- 4 张林华,刘秉文.一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21**(3): 257.
- 5 Steinbrecher VP, Zhang H, Coughlin M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 1990, **9**: 155~168.
- 6 Ku G, Doherty NS, Wolos JA, et al. Inhibition of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *Am J Cardiol*, 1988, **62**: 88B~91B.
- 7 Simon BC, Haudenschild CC, Cohen RA. Preservation of endothelium-dependent relaxation in atherosclerotic rabbit aorta by probucol. *J Cardiovascular Pharmacology*, 1993, **21**: 893~901.
- 8 Busse R, Mulsh A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1990, **275**: 87.

(本文 1995-03-02 收到)