

血管内皮细胞脂质过氧化损伤对平滑肌 细胞增殖的影响

高 岩 陈铁镇 杨向红

(中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001)

近年来,脂质过氧化作用(LPO)与动脉粥样硬化(As)的关系很受重视。本研究室以往的实验已证实,脂质过氧化作用不仅可引起培养人血管内皮细胞的形态损伤与功能障碍,而且还可以促进和加重实验动物 As 病变的形成。平滑肌细胞从中膜游走至内膜,增殖形成粥样斑块,是 As 形成的关键过程。本实验以巯基氧化剂联胺(diamide)作用于培养的人血管内皮细胞,引发内皮细胞的脂质过氧化作用及脂质过氧化损伤,再以内皮细胞脂质过氧化损伤条件培养液作用于培养的兔血管中膜平滑肌细胞,研究内皮细胞脂质过氧化损伤对平滑肌细胞增殖的影响,进一步阐明 As 发生中 LPO 的作用机理。

采用本研究室改进的 Jaffe 氏法培养人脐带静脉内皮细胞,至亚融合状态,用含 0.2% BSA(牛血清白蛋白)的无血清 RPMI-1640 培养液轻洗细胞层两次并继续培养 24 h,弃培养液,加入含不同浓度联胺的 RPMI-1640 培养液,联胺浓度分别为 $0.01 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.05 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 60 min 后用含 0.2% BSA 的 RPMI-1640 培养液培养 24 h,吸取培养液离心(4000 rpm, 5 min)取上清作为条件培养液。

采用组织贴块法,培养兔主动脉平滑肌细胞。向 24 孔板内加入 1×10^4 第 3 代或第 4 代平滑肌细胞,培养至出现“峰”与“谷”现象,用含 0.4% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次并继续培养,使细胞处于静止状态。加入实验因素(各组内皮细胞条件培养液)24 h 后,作 ^3H -TdR 掺入实验和免疫组化染色。每孔加入 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -TdR 2 h, PBS 洗涤 3 次,0.2 mol/ml NaOH 0.2 ml 使细胞粉碎,于 Beckman 液闪仪测量放射性。BrdU 的免疫组化染色,是将平滑肌细胞培养在玻片上,加实验因素 24 h 后,加 1 mmol BrdU 10 μl ,终浓度为 10 μM ,同时以不加 BrdU 的为阴性对照,1 h 后, PBS 冲洗,70%冷乙醇固定 30 min, SP 法染色,第 I 抗体为鼠抗 BrdU IgG,第 II 抗体为兔抗鼠 IgG + IgM + IgA, DAB 染色,光镜下观察,计数阳性率。

结果表明,损伤对照组、各损伤实验组与阴性对照组比较,平滑肌细胞的 ^3H -TdR 掺入量均增加($P < 0.01$)。联胺浓度 $0.01 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 损伤实验组与正常内皮细胞条件培养液的损伤对照组比较, ^3H -TdR 掺入量均增加(P 分别 < 0.05 , < 0.01 , < 0.01),且随着联胺作用浓度的升高,平滑肌细胞 ^3H -TdR 的掺入量呈增加趋势。免疫组化染色显示, BrdU 染色阳性细胞的细胞核被染成棕褐色。计数结果表明,阳性率与联胺浓度成正相关。

本实验证实,内皮细胞脂质过氧化损伤能促进平滑肌细胞的增殖。在制备内皮细胞条件培养液时,加联胺后,各组内皮细胞在相差显微镜下无形态学改变。内皮细胞脂质过氧化损伤后可能通过分泌某些促细胞分裂因子,作用于平滑肌细胞,使其增殖。内皮细胞脂质过氧化损伤引起的平滑肌细胞增殖,可能是过氧化脂质促进和加重 As 病变形成过程的重要步骤。