

• 论 著 •

消斑肽能逆转平滑肌细胞源性泡沫细胞

杨永宗 杨小毅 袁中华

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Xiaoban Peptide Can Reverse Smooth Muscle Cell-derived Foam Cell

YANG Yong-Zong, YANG Xiao-Yi and YUAN Zhong-Hua

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT The cultured porcine artery smooth muscle cells became foam cells by preincubated with $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ oxidized low density lipoprotein for 72 hours, which could accumulate cholesteryl ester and the ratio between cholesteryl ester and total cholesterol was 64.1%. When the foam cells were incubated with $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Xiaoban peptide for 24 hours, they reversed to normal smooth muscle cells, whose ratio between cholesteryl ester and total cholesterol was less than 50%. The amount of nitric oxide increased in the medium of foam cell and decreased in the process of reversing to normal level. It suggest that Xiaoban peptide may be a new antiatherosclerosis medicine.

KEY WORDS Xiaoban peptide; Foam cell; Smooth muscle cell; Nitric oxide; Reverse

摘要 培养的猪主动脉平滑肌细胞,在与 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型低密度脂蛋白作用 72 h 后,细胞内蓄积胆固醇酯,使胆固醇酯占总胆固醇的 64.1%,形成泡沫细胞。然后向泡沫细胞的培养基中加入不同浓度的消斑肽,作用 24 h 后,发现总胆固醇和胆固醇酯均下降,而且胆固醇酯小于总胆固醇的 50%,提示泡沫细胞发生了逆转。在平滑肌细胞源性泡沫细胞的形成过程中,一氧化氮合成增加,与对照组的差别有显著性,而在逆转过程中一氧化氮合成下降,与对照组差别无显著性,提示消

斑肽有使一氧化氮合成功能恢复正常的作用。

关键词 消斑肽; 泡沫细胞; 平滑肌细胞; 一氧化氮; 逆转

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种以细胞增殖为主的病变。已经证明动脉粥样硬化斑块中的泡沫细胞主要来源于血液单核细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)^[1,2]。在斑块形成的早期,主要是单核细胞源性的巨噬细胞起作用。而随着病变的发展,VSMC 迁移于内膜下并大量增殖,吞噬修饰的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),导致胞内胆固醇酯大量堆积,转化成为平滑肌细胞源性泡沫细胞。这些细胞合成分泌大量基质,促使粥样斑块形成。粥样斑块的出现,导致血管腔的狭窄堵塞,构成 As 的病理学基础。目前,As 防治虽有多种方法,但针对斑块本身的方法很少,效果也不佳。本实验室从眼镜蛇毒素中提取到一种多肽,经动物实验说明有一定的消除 As 斑块的作用,故暂名消斑肽。本实验以斑块的主要细胞成份—平滑肌细胞源性泡沫细胞为模型,观察消斑肽逆转泡沫细胞的可能性,并测定一氧化氮(nitric oxide, NO)含量变化以探讨逆转的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

消斑肽由本室从眼镜蛇毒素中提取并纯化。M199 培养基为 Sigma 公司产品。小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所生产。总胆固醇、游离胆固醇药盒购自北京化工试剂分厂。Folin-phenol 试剂购自北京奥尼斯公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的制备、氧化修饰及修饰程度鉴定

1.2.1 人血浆低密度脂蛋白(密度 $1.040 \sim 1.063 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$)采用一次性密度梯度超速离心法制备^[3]。

1.2.2 氧化修饰 将新鲜的 LDL(含胆固醇 $4.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)置含 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 的 PBS 中, 37°C 水浴 12 h, 然后在 0.01% EDTA 的 PBS 中透析 24 h(4°C), 除菌保存。

1.2.3 修饰程度鉴定 修饰程度用氧化型 LDL(oxidized LDL, OLDL), 所含脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)含量来鉴定。LPO 测定用 Yagi 法^[4]。

1.3 血管平滑肌细胞的培养

无菌状态下取出猪胸主动脉, 剪去外膜脂肪, 分别用 PBS、D-Hank's 液依次冲洗, 0.25% 胰酶消化除去内皮细胞(37°C , 37 min), 剥下中膜, 剪碎, 常规组织贴块法培养(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 和饱和湿度), 待原代长出 VSMC 后, 冲掉组织块。培养基为 M199 加 20% 小牛血清。在 30 ml 培养瓶中传代培养^[5]。

1.4 血管平滑肌细胞的泡沫化及逆转

传至 3~5 代的血管平滑肌细胞, 待细胞铺满培养瓶后, 换液, 培养基中加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL 培养 72 h, 同时作对照组, 加入普通培养基再培养 24 h。

另设两处理组: 加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL 培养 72 h 后, 在向培养液中加入消斑肽, 终浓度为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 24 h。

经以上处理结束后的血管平滑肌细胞, 吸去培养液, 0.125% 胰酶消化(约 5 min), 收集细胞; 测细胞内总胆固醇、游离胆固醇及蛋白质。

1.5 细胞内总胆固醇、游离胆固醇及蛋白质含量测定

1.5.1 消化后的培养细胞, 离心($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 弃去上清。加 PBS 2 ml 于离心管中, 再离心($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min); 弃去上清, 加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaOH}$ $100 \mu\text{l}$, 异丙醇 $100 \mu\text{l}$, 超声破碎 10 秒/次, 三次; 再离心($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)。取上清各 $50 \mu\text{l}$,

按试剂盒说明操作, 测总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离胆固醇(free cholesterol, FC), 胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)的含量根据总胆固醇与游离胆固醇之差算出^[10]。

1.5.2 取离心后的沉淀物测细胞内蛋白质含量, 用 Lowry 法^[7]。

1.6 培养基中一氧化氮的测定

取 $100 \mu\text{l}$ 培养液及等量的 Greiss 试剂(1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% N-1(1-萘基)乙二胺, 5% 磷酸)滴入 96 孔培养板中, 室温放置 10 min 后于 540 nm 波长处测吸光度, 以亚硝酸钠作标准曲线, 结果以相当于 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_3$ 表示^[8]。

1.7 所有实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用双侧 t 检验。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白氧化修饰的鉴定

实验所用 LDL 氧化修饰前 LPO 含量为每克胆固醇 $1.5 \mu\text{mol}$ 硫化巴比酸反应物质(thio-barbituric acid reactive substance, TBARS), 经 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 氧化修饰 12 h 后 LPO 达到 $17.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBARS, 其颜色由淡黄变为乳白, 说明已经达到氧化程度, 成为氧化型低密度脂蛋白^[9]。

2.2 泡沫细胞模型的建立

血管平滑肌细胞与 OLDL 一起培养 72 h 后, 经油红 O 染色证明有脂质颗粒积聚在细胞内。经培养后 VSMC 内脂质变化如 Table 1 所示, 可见 TC 和 CE 均增加, 与对照组细胞比较, 差异有极显著性意义($P < 0.01$), VSMC 内胆固醇酯与总胆固醇的比例提高到 64.1% , 说明 VSMC 已转化为平滑肌细胞源性泡沫细胞^[10], 符合泡沫细胞模型的标准。

Table 1. Amounts of cholesterol in VSMC incubated with OLDL ($\bar{x} \pm s$, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cell protein).

Groups	CE	FC	TC	CE/TC(%)
control VSMC	45.1 ± 2.8	126.6 ± 3.6	171.9 ± 12.4	26.2
VSMC+OLDL	187.3 ± 9.2^b	105.7 ± 17.1^a	292.3 ± 8.5	64.1^b

CE:cholesteryl ester; FC:free cholesterol; TC:total cholesterol; a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, as compared with control VSMC.

2.3 泡沫细胞的逆转

形成的泡沫细胞与消斑肽温育 24 h 后,细胞内胆固醇含量发生了明显改变(Table 2)。胆固醇酯、总胆固醇及其比值均明显下降,与对照组泡沫细胞相比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

01);游离胆固醇有所增加。说明消斑肽不仅使泡沫细胞内的总胆固醇含量显著减少,而且使胆固醇酯占总胆固醇的比例明显降低,接近正常水平(Table 1)。

Table 2. Amounts of cholesterol in foam cell incubated with Xiaoban peptide for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ cell protein).

Groups	CE	FC	TC	CE/TC(%)
control foam cell	187.3 \pm 9.2	105.0 \pm 17.2	292.3 \pm 18.5	64.1
foam cell + 0.1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ XP	91.6 \pm 10.1 *	126.8 \pm 12.8	218.4 \pm 22.4 *	41.9
foam cell + 0.01 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ XP	47.4 \pm 4.3 *	108.9 \pm 5.9	156.3 \pm 5.0 *	30.3

CE:cholesteryl ester; FC:free cholesterol; TC:total cholesterol; XP:Xiaoban peptide; *, $P < 0.05$ as compared with control foam cell.

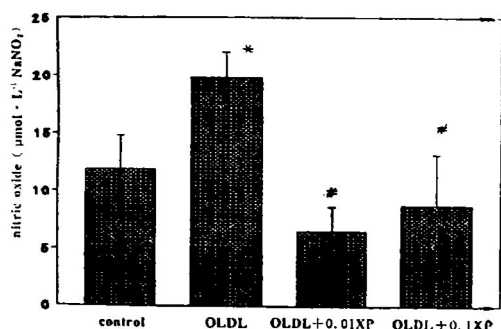


Figure. Change of nitric oxide amount in VSMC and foam cell incubated with OLDL and Xiaoban peptide.

Control bar shows that SMC incubated with normal medium. OLDL bar shows cell that the SMC were incubated with 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL for 72 hours. The last two show the reversing of foam cell, which the foam cell were incubated with 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Xiaoban peptide (XP) for 72 hours.

* $P < 0.05$ as compared with control VSMC; # $P < 0.05$ as compared with foam cell.

2.4 一氧化氮的变化

平滑肌细胞在泡沫化的过程中,随着细胞内胆固醇脂的增多,NO的合成量也大幅度上升,如Figure所示,在加入OLDL 72 h后,NO的量明显高于对照组,其差别有显著性意义($P < 0.05$)。在加入不同浓度消斑肽 24 h后,可以看到随着细胞内胆固醇酯的下降,NO合成量

的量也在下降,虽低于对照组,但差别无显著性意义。而且0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 消斑肽组的NO高于0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 消斑肽组,前者与对照组更加接近。与OLDL组相比,加有消斑肽的两组与之差别均有显著性意义。说明其合成NO的功能已接近正常。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块含有多种细胞成份,初期以单核巨噬细胞作用为著,但整个病变成份主要是血管平滑肌细胞。本实验室首次以猪胸主动脉中膜平滑肌细胞成功地建立了平滑肌细胞源性泡沫细胞,使所用的病理细胞模型更加接近动脉粥样硬化斑块的实际情况,为抗动脉粥样硬化药物筛选提供一个有用的工具。泡沫细胞的生物学特征是胞内大量脂质堆积,其中以胆固醇酯大量增多为标志。通常以胞内胆固醇酯占总胆固醇量的比例超过50%即可视为泡沫细胞^[10]。所以本实验所建立的平滑肌细胞源性泡沫细胞符合标准,可以作为动脉粥样硬化的病理细胞模型使用。

在中国传统医学中,蛇毒入药早已有所记载。生物化学分析发现蛇毒中含有多种酶类,大部分为水解酶,分别作用于蛋白质、多糖、磷脂等,主要的酶有磷脂酶A₂、磷脂酶B等^[11]。在临床上,蛇毒的抗凝作用早已用来治疗血液高凝

状态的病人,其抗癌作用也早有报道。

目前,抗动脉粥样硬化药物主要有调节血脂药、多烯脂肪酸、钙拮抗剂、抗氧化剂等,但真正以逆转和消除斑块为主要目标的药物临床尚未见应用。对于斑块所致的狭窄仍以血管再通术为主,但术后再狭窄率很高,若能以化学方法杀伤和逆转泡沫细胞,以致消除斑块、减轻狭窄乃是较为理想的途径之一。为此,本实验室从眼镜蛇毒素提取物中寻找有效成份,以求消除已经形成的动脉粥样硬化斑块。从本实验结果可以看出,消斑肽不仅从形态学上使泡沫细胞中的含脂颗粒减少,而且从生物化学成份上,使泡沫细胞内胆固醇酯含量以及胆固醇酯在总胆固醇中所占比例大幅度下降,恢复至接近正常细胞水平。据此可以视为,消斑肽可能逆转体外培养的平滑肌细胞源性泡沫细胞。当然,消斑肽是否能在体内消除动脉粥样硬化斑块还有待另外的实验结果证实和进一步的研究。

正常细胞内胆固醇含量的维持有赖于胆固醇摄入和移出的平衡。胞内胆固醇酯不断水解,以非酯化的形式离开细胞,而细胞内的未移出胆固醇不断被酯化为胆固醇酯。正如 Brown 等^[2]所指出,泡沫细胞内胆固醇酯是在酯化大于水解的条件下逐渐蓄积的。本实验所得结果可以看出,消斑肽逆转泡沫细胞过程中总胆固醇和胆固醇酯减少的同时,游离胆固醇含量不仅不减少,相反有所增多,这提示消斑肽可能是通过促进胆固醇酯水解,增加胆固醇移出而起作用。

一氧化氮不仅是一种血管张力调节物质,也参与 SMC 的增殖调节,其活性的强弱与动脉粥样硬化的形成有关。NO 在体内主要是由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化 L-精氨酸转变为瓜氨酸的过程中所释放。Vanin 等^[13]报道一种抗氧化剂 Phenozan 能降低小鼠肝脏中 NOS 的活性。本实验中泡沫细胞的 NO 含量显著增加,可能与 SMC 被 OLDL 攻击后,氧化物质增加,使一氧化氮合成酶的活性提高有关。另外,SMC 在泡沫化的过程中,肌

纤维在细胞中的比例相对减少,从而也减少了肌红蛋白对 NO 产生的抑制作用,致使泡沫细胞中 NO 的含量增多。消斑肽使泡沫细胞逆转,恢复到正常 SMC 状态,从而使 NO 的分泌功能也恢复到正常。再者,逆转后的细胞中肌红蛋白成份增加,也会使 NO 的合成下降。以上设想还有待 NOS 活性测定结果的证实。

参考文献

- 1 Cereify RE. The role of the monocyte in atherogenesis. *Am J Pathol*, 1981, 103: 181.
- 2 Thberg J, et al. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 1990, 10: 966.
- 3 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度离心分离人血清脂蛋白. *生物化学生物物理学报*, 1989, 21(3): 257.
- 4 Yagi KA. Cimple fluimetric assay for liperoxide in blood plasma. *Biochem Med*, 1976, 15: 212.
- 5 梅美珍,徐也鲁,杨永宗. 动脉粥样硬化实验技术,衡阳:中国病理生理学会动脉粥样硬化分会,衡阳医学院心血管病研究所,1989,79.
- 6 Heide JC, Boyett RL. The piomole determination of free and total cholsrterol in cell in culture. *J Lipid Res*, 1978, 19: 514.
- 7 Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265.
- 8 张灵芳,谭敦勇,周爱儒. 组织细胞一氧化氮含量测定的几种方法. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20 (6):412.
- 9 乐毅,陈媛,周玫. 轻度修饰和氧化低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子和一氧化氮的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1994, 2(2-3): 72.
- 10 Fogellman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondiade alteration of low density lipoprotein leeds to cholesteryl ester accumulation in human monocytemophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2 214.
- 11 Harrey AL. Cardiotoxins from cobra venoms; possilble mechanisms of action. *J Toxicol Toxin Rev*, 1985, 4: 41.
- 12 Brown M, Coldestein J. Lipoprotein metabolism in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*. 1983, 52 :233.
- 13 Vanin AF, Kubtina LN, Kurbanov ME, et al. *Biokhimiya* (USSR), 1991, 54: 136.

(本文 1995-08-14 收到)