

载脂蛋白 CⅢ拮抗低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤

黎健 刘清华 蒋雷 王玲^①

(卫生部北京老年医学研究所 北京医院, 北京 100730)

The Protective Effect of Apolipoprotein CⅢ on Endothelial Cell Injury Induced by Low Density Lipoprotein

LI Jian, LIU Qing-Hua, JIANG Lei and WANG Ling^①

(Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, Beijing 100730; ① Tong Ren Hospital, Beijing 100730, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the protective effect of apolipoprotein(apo) CⅢ on the morphology and function of human umbilical vein endothelial cells injured by low density lipoprotein (LDL) *in vitro*.

Methods Cultured human endothelial cells derived from umbilical vein were divided into four groups: control, high density lipoprotein (HDL)-apo + LDL, apo CⅢ + LDL and LDL group, which were observed the morphological changes with phase-contrast and transmission electron microscope and measured the release of lactate dehydrogenase (LDH) and level of 6-keto-prostaglandin F_{1α} (PGF_{1α}).

Results Endothelial cells after being injured by LDL showed cell contraction, increased release of LDH and decreased level of 6-keto-PGF_{1α}. However, normal morphology and LDH release as well as prostacyclin (PGI₂) synthesis in endothelial cells were found when HDL-apo or apo CⅢ was added to culture media before LDL injury.

Conclusions Both HDL-apo and apo CⅢ could resist the injurious effect of LDL on cultured endothelial cells.

KEY WORDS Endothelial cell; Apolipoprotein CⅢ; Low density lipoprotein; Atherosclerosis.

摘要 为探讨高密度脂蛋白-载脂蛋白和载脂蛋白 CⅢ在保护内皮细胞免受低密度脂蛋白损伤方面所起的作用。将体外培养的人脐静脉内皮细胞分成对照组、高密度脂蛋白-载脂蛋白+低密度脂蛋白组、载脂蛋白 CⅢ+低密度脂蛋白组和低密度脂蛋白组 4 组。通过观察细胞形态变化、测定乳酸脱氢酶释放率和前列环素合成,来观察低密度脂蛋白对内皮细胞形态和功能的影响。结果发现,低密度脂蛋白可引起内皮细胞收缩、细胞膜损伤、乳酸脱氢酶释放增加和前列环素合成减少。预加入高密度脂蛋白-载脂蛋白或载脂蛋白 CⅢ(100 mg/L),内皮细胞再受到低密度脂蛋白(1.5 g/L)的损伤时,细胞形态和功能不发生明显改变。提示高密度脂蛋白-载脂蛋白和载脂蛋白 CⅢ均能部分拮抗低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤。

关键词 内皮细胞; 载脂蛋白 CⅢ; 低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是由于血管内皮细胞损伤引发脂质浸润、平滑肌细胞大量增殖而引起的,它是心、脑血管病的主要病因。保护内皮细胞免受损伤是预防动脉粥样硬化发生发展的关键^[1]。高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)已被看作是动脉粥样硬化的保护因素,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是造成内皮细胞损伤的有害因子^[2]。临床研究显示血清 HDL 胆固醇浓度与发生冠心病的危险性呈现负相关。体外实验表明,HDL 可以拮抗 LDL 对内皮细胞的损伤,促进内皮细胞合成前列环素(prostacyclin, PGI₂),维持分泌 PGI₂ 的稳定性,并对胆固醇的逆转运有促进作用^[3~5]。HDL 的作用与其分子中的载脂蛋白有

① 北京同仁医院

关^[6~8]。载脂蛋白 CⅢ也是 HDL 的主要组成蛋白。它是否与 HDL 保护内皮细胞的作用有关,有待进一步研究证实。本文以体外培养的人脐静脉内皮细胞为模型,用 HDL-载脂蛋白作对照,观察载脂蛋白 CⅢ在保护内皮细胞拮抗 LDL 损伤方面所起的作用。

1 材料与方法

1.1 低密度脂蛋白、高密度脂蛋白-载脂蛋白和载脂蛋白 CⅢ的制备

人混合血清经序列超速离心法得到 LDL 和 HDL^[9], HDL 经脱脂后得到 HDL 载脂蛋白,再过 Sephadex G-75 柱和高效液相色谱离子交换柱制备获得载脂蛋白 CⅢ^[10]。经等电聚焦电泳、双向免疫扩散、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及氨基酸组成分析鉴定,载脂蛋白 CⅢ制品的纯度达色谱纯、电泳纯和免疫纯。

1.2 内皮细胞的分离、培养和鉴定

取人脐带静脉,注入 0.25%胰蛋白酶 10 ml, 37℃温育 15 min 后离心获得内皮细胞,用含 20%小牛血清的 M199(美国 GIBCO 公司)培养液在 6 孔培养板(美国 Costar 公司)培养,经 6~9 天生长汇合为单层,经相差显微镜观察细胞形态、透射电镜观察细胞浆的 Weibel-Palade 小体及免疫酶法测定Ⅲ因子等方法鉴定,证实培养的细胞确系人的内皮细胞。

1.3 实验分组

汇合内皮细胞分为 4 组,每组设置 4~6 个标本。对照组:正常生长的内皮细胞; HDL-载脂蛋白+LDL 组:在内皮细胞培养液中加入 HDL-载脂蛋白(100 mg/L), 37℃孵育 19 h 后加入 LDL(1.5 g/L); 载脂蛋白 CⅢ+LDL 组:先加入载脂蛋白 CⅢ(100 mg/L), 37℃孵育 19 h 后加入 LDL(1.5 g/L); LDL 组:在内皮细胞培养液中加入 LDL(1.5 g/L)。各组在 37℃继续培养 48 h,观察内皮细胞形态及功能变化。内皮细胞培养液为含 20%小牛血清的 M199 培养液。

1.4 形态观察

倒置相差显微镜(瑞士 Polyvar 公司)下观察内皮细胞的形态。透射电镜(日本 Joel 公司)下观察超微结构:用细胞刮子刮下培养的内皮细胞,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清,2.5%戊二醛固定 30 min,巴比妥缓冲液冲洗 2 次,1%锇酸后固定 30 min。巴比妥缓冲液冲洗,逐级乙醇脱水,812 树脂包埋,60℃聚合 48 h,常

规切片,铅铂双重染色,透射电镜观察。

1.5 乳酸脱氢酶测定

分别收集培养液和细胞层,细胞用 2% Triton X-100 破膜,酶法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性,根据下式计算 LDH 释放的百分比^[6]。

$$\text{LDH 释放}\% = \frac{U_s}{(U_s + U_c)} \times 100\%$$

式中 U_s 代表培养液中 LDH 的活性单位; U_c 代表细胞层中 LDH 的活性单位。

1.6 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 测定

参照文献[6]进行,将 1 ml 培养液用 5 ml 乙酸乙酯提取两次,放射免疫法测定 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$, 6-keto-PGF $_{1\alpha}$)含量。

1.7 统计学方法

实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异的显著性采用 t 检验。

2 结果

2.1 形态观察

原代汇合内皮细胞呈现多角形、单层镶嵌排列(附图 A, Figure A)加入 LDL 48 h 后,大部分细胞自溶和脱落,残余细胞胞体明显收缩呈分枝状(附图 B, Figure B),预加入 HDL-载脂蛋白或载脂蛋白 CⅢ孵育 19 h 后,再加入 LDL 孵育 48 h,内皮细胞形态大致正常,胞体弱显不规则,但未出现分枝状、自溶和脱落现象(附图 C 和 D, Figure C and D)。这一结果从形态学角度说明, HDL-载脂蛋白和载脂蛋白 CⅢ均具有拮抗 LDL 损伤内皮细胞的能力。

2.2 乳酸脱氢酶释放

乳酸脱氢酶释放百分比的计算结果见附表(Table)。LDL 组 LDH 释放高于其它三组,差异有极高度显著性($P < 0.001$)。预加入 HDL-载脂蛋白后再施加 LDL 损伤,与对照组相比, LDH 释放量有所增加,但没有显著性差异。载脂蛋白 CⅢ组与对照组的差异有高度显著性($P < 0.01$)。提示载脂蛋白 CⅢ保护细胞膜完整性的作用不如 HDL-载脂蛋白。

2.3 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 测定结果

由附表(Table)可见, LDL 组的 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量显著低于对照组、HDL-载脂蛋白和载脂蛋白 CⅢ组($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P <$

0.05)。原因之一是 LDL 加入后,大部分内皮细胞自溶脱落,单位培养体积中内皮细胞数量减少,因而 PGI₂ 合成量减少。HDL-载脂蛋白和载

脂蛋白 CⅢ 组的 6-keto-PGF1α 测定值与对照组接近。

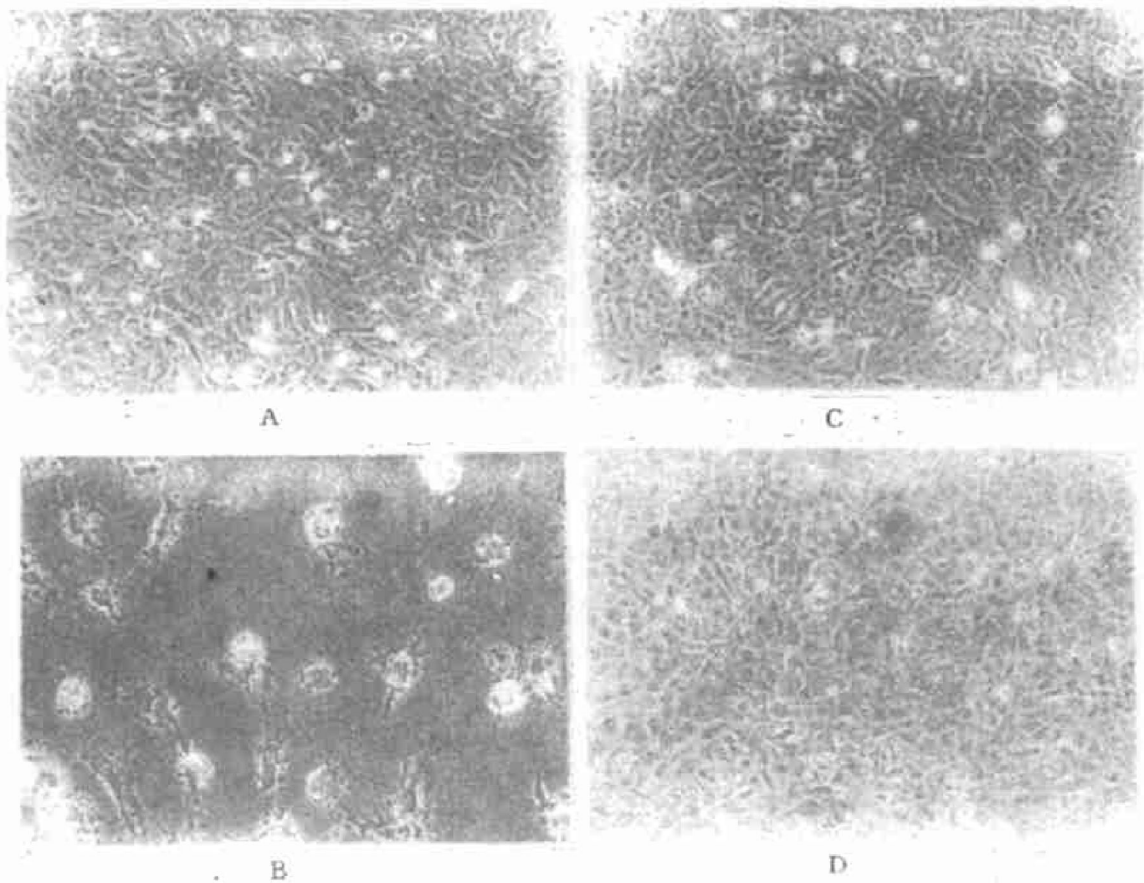


Figure. Phase contrast microscopy of human endothelial cells derived from umbilical veins. A. After 5 days in culture, endothelial cells grew in confluent cobblestone monolayers; $\times 180$. B. The endothelial cells exposed to LDL in a concentration of 1.5 g/L appear "contracted" and round up; $\times 750$. C. The endothelial cells were preincubated with HDL-apo in a concentration of 100 mg/L for 19 h before addition of LDL, showed normal morphology; $\times 180$. D. The endothelial cells were preincubated with apoCⅢ in a concentration of 100 mg/L for 19 h before addition of LDL, showed normal morphology; $\times 180$.

Table. LDH release and 6-keto-PGF1α level in endothelial cells ($\bar{x} \pm s$).

Group	n	LDH release(%)	n	6-keto-PGF1α (mg/L)
control	4	21.3 \pm 3.1 ^d	6	11.3 \pm 2.5 ^c
LDL	4	72.0 \pm 5.5	6	7.8 \pm 1.4
HDL-apo	4	24.7 \pm 1.9 ^d	6	11.4 \pm 1.3 ^d
apo CⅢ	4	33.8 \pm 2.6 ^d	6	11.2 \pm 3.4 ^b

b, $P < 0.05$, c, $P < 0.01$, d, $P < 0.001$, compared with LDL group.

3 讨论

载脂蛋白 CⅢ 是载脂蛋白 C 族中含量最丰富的载脂蛋白,主要分布在 HDL 和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)中。载脂蛋白 CⅢ 有多种生理作用,除了极易与磷脂结合而维系脂蛋白的结构外,还可抑制载脂蛋白 CⅠ 对脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)的激活,参与甘油三酯代谢的调控。此外,载脂蛋白 CⅢ 还具有阻止肝细胞摄取含载脂蛋白 E 的乳糜微粒残体的作用。载脂蛋白 CⅢ 对线粒体 α -酮基丁酯脱氢酶也产生竞争性抑制作用^[11]。但载脂蛋白 CⅢ 在动脉粥样硬

化发生发展中的作用至今还不十分清楚。Bren等^[12]指出,Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型高脂蛋白血症患者血清载脂蛋白CⅢ水平显著升高。Norum等^[13]发现一种载脂蛋白CⅢ缺乏症,此种患者HDL水平极低,易早发动脉粥样硬化。经检测,患者载脂蛋白AⅠ和载脂蛋白CⅢ的结构基因并没有突变,而是在载脂蛋白AⅠ基因附近额外插入了一个DNA片段,致使载脂蛋白AⅠ和载脂蛋白CⅢ的基因连锁重排,以致载脂蛋白AⅠ和载脂蛋白CⅢ不能正常表达,因此患者血浆既缺乏载脂蛋白AⅠ又缺乏载脂蛋白CⅢ。载脂蛋白CⅢ基因位于11号染色体,与载脂蛋白AⅠ和AⅣ形成一个基因簇。有报道载脂蛋白CⅢ基因3'端多态性可能与冠心病有关^[14],基因多态性频率在不同种族人群中有差别^[15],但冠心病患者血清载脂蛋白CⅢ水平与正常人没有显著差别^[16]。载脂蛋白CⅢ与动脉粥样硬化的关系还有待进一步研究。本文以细胞收缩,LDH释放和PGI₂合成作为内皮细胞损伤的形态标志、定量指标及功能指标,观察LDL对内皮细胞的损伤作用和载脂蛋白CⅢ的拮抗作用。结果表明,载脂蛋白CⅢ具有部分拮抗LDL损伤的能力。预加入载脂蛋白CⅢ,内皮细胞再受到较大剂量(1.5 g/L)的LDL损伤时仍有相对正常的形态、较低的LDH释放率和较高的PGI₂合成量。将HDL分子中其它主要载脂蛋白(载脂蛋白AⅠ、AⅡ、CⅠ、CⅡ等)同时进行保护内皮细胞功能研究,发现载脂蛋白CⅢ保护内皮细胞的作用不如载脂蛋白AⅠ、CⅠ和CⅡ^[6~8]。

高密度脂蛋白(HDL)保护内皮细胞免受LDL损伤的作用机制目前尚无满意的解释。Henrikens等^[17]认为,HDL抑制LDL与内皮细胞膜上的特异受体结合,防止LDL胆固醇在内皮细胞膜上的过量堆积。但有些研究者^[18]认为,LDL的损伤性作用属非受体依赖性和细胞特异性,因其对纯合子型遗传性高胆固醇血症患者的纤维母细胞(缺乏LDL受体)和健康人平滑肌细胞和纤维母细胞均有损伤作用。推测LDL分子中可能存在具有损伤作用的结构成

分,HDL可能遮盖了这些结构成分,起到保护作用。我们的结果表明,HDL可能通过其中的载脂蛋白对内皮细胞起保护作用。但作用机理尚待进一步阐明。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med*, 1986, 314 (8): 488~500.
- 2 Olsson G, Wiklund O, Bondjers G. Effects of injury on apo B kinetics and concentration in rabbit aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (7): 930~936.
- 3 Kawai C. Pathogenesis of acute myocardial infarction. *Circulation*, 1994, 90 (2): 1 033~43.
- 4 Savion N, Koter E. Role of apolipoprotein AⅠ, AⅡ and CⅠ in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells. *Eur Heart J*, 1993, 14 (7): 930~935.
- 5 Von EA, Huang Y, Wu S, et al. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (5): 691~703.
- 6 黎健,刘清华,蒋雷,等.载脂蛋白CⅢ对低密度脂蛋白引起的内皮细胞损伤的保护作用. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18 (2): 131
- 7 刘清华,黎健,蒋雷,等.载脂蛋白CⅢ保护内皮细胞拮抗低密度脂蛋白损伤的实验观察. *中华病理学杂志*, 1992, 21 (1): 8~10.
- 8 刘清华,蒋雷,金军华,等.载脂蛋白AⅠ和高密度脂蛋白对内皮细胞保护作用的实验观察. *中华老年医学杂志*, 1996, 15 (1): 33~35.
- 9 黎健,蒋雷,李健斋.人血清载脂蛋白B的分离鉴定及其抗血清制备. *中华医学检验杂志*, 1987, 10(4): 198~201.
- 10 黎健,蒋雷,赵清仓,等.人血清载脂蛋白CⅠ、CⅡ的分离纯化及其单克隆抗体制备. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3 (4): 325~329.
- 11 李宪周,王克勤.载脂蛋白C族:见:王克勤(主编).脂蛋白与动脉粥样硬化.北京:人民卫生出版社,1995: 125~133.
- 12 Bren ND, Rastogi A, Kottke BA. Quantification of human plasma apolipoprotein CⅠ, CⅡ and CⅢ by radioimmunoassays. *Mayo Clin Proc*, 1993, 68 (7): 657~664.
- 13 Norum RA, Lakier JB, Goldstein S. Familial deficiency of apolipoprotein AⅠ and precocious coronary artery disease. *N Engl J Med*, 1982, 306: 1 513~519.
- 14 Wick U, Witt E, Engel W. Restriction fragment length

- polymorphisms at the apoprotein genes A I, C II and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as possible markers of coronary heart disease. *Clin Genet*, 1995, 47 (4): 184~190.
- 15 Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L. Variation at the apo A I /C II /A IV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo C II. *Atherosclerosis*, 1991, 87 (2-3): 219.
- 16 Alessandri C, Basili S, Maurelli M, et al. apolipoprotein C II and C III in peripheral arterial disease. *Angiology*, 1994, 45(2): 131~136.
- 17 Henriksen T, Evensen SA, Carlander. Injury to cultured endothelial cells induced by low density lipoproteins; protection by high density lipoproteins. *Scand J Clin Lab Invest*, 1979, 39: 369~375.
- 18 魏少敏, 任文华, 王振义, 等. 低、高密度脂蛋白对培养的人血管内皮细胞形态变化的初步观察. *中华病理学杂志*, 1987, 16 (1): 43~46.
- (1997-01-06 收到, 1997-03-06 修回)

• 书评 •

评《动脉粥样硬化—基础与临床》一书

杨 和 平

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

动脉粥样硬化所引起的冠心病、脑血管病及周围血管疾病, 严重危害人民的健康。其发病率和死亡率均居各种疾病的首位。因此, 动脉粥样硬化的研究和防治倍受人们的关注, 为了更好地促进动脉粥样硬化的研究和治疗, 蔡海江教授主编了《动脉粥样硬化—基础与临床》一书, 编著者为全国在此领域内研究成果卓著或临床经验丰富的著名专家, 多数为国家科技攻关项目的负责人, 书内各章节由国内各方面专家分章撰写, 所及内容为专家们长期研究和临床观察所积累的精华, 且系统介绍了动脉粥样硬化的最新成就, 无疑使该书具有很高的权威性。

该书的特点是综合了动脉粥样硬化的病理学、病理生理学、药理学、生物化学、分子生物学、临床诊断学和治疗学的现状, 重点放在其他书籍涉及较少的动脉粥样硬化的发病学, 尽量引用了细胞及分子生物学方面的研究成果, 概

论为书中的精华, 阐明了国内外动脉粥样硬化研究的概况和展望, 为同行们指明了努力的方向; 动脉粥样硬化的病理学所述内容较其他书籍更具体; 脂代谢章节新颖翔实; 动脉粥样硬化的流行病学、发病学、临床表现、临床诊断和治疗章节系统深入; 书中还突出了动脉粥样硬化本身的发生原因、发展机理、预防、诊断和治疗的特色。

全书约 45 万字, 并适当附有图表和参考文献, 重点内容突出, 关键问题分析透稳, 基础与临床结合紧密。该书的出版对加快我国动脉粥样硬化的研究起积极的推动作用, 对动脉粥样硬化所引起的冠心病、脑血管病和周围血管疾病防治有重要的指导意义。此书是当代医务工作者、医学生及研究生的重要参考书, 是从事动脉粥样硬化及相关领域研究的科研工作者和医务人员必备的参考书。