

## 氧化型脂蛋白(a)对兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响

喻 红 汪炳华 洪嘉玲

(湖北医科大学生物化学教研室, 武汉 430071)

### Effect of Oxidized Lipoprotein (a) on Proliferation of Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells

YU Hong, WANG Bin-Hua and HONG Jia-Ling

(Department of Biochemistry, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To identify possible mechanisms of the suggested high atherogenicity of lipoprotein(a) [Lp(a)], the susceptibility of Lp(a) to  $\text{Cu}^{2+}$ -induced oxidation and its effects on proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells (SMC) were studied and compared with those of low density lipoprotein (LDL).

**Methods** Human Lp(a) and LDL were isolated and purified from normal blood plasma by ultracentrifugation, sephacryl S-400 gel permeation chromatography. The oxidative modification of Lp(a) and LDL was identified by agarose gel electrophoresis and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) method.

Cell counting and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation were used to observe the mitogenic effect of lipoproteins and oxidized lipoproteins on SMC.

**Results** The susceptibility of Lp(a) to oxidation was lower than that of LDL. Native Lp(a) and LDL induced slight increase in number of SMC and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation respectively, which was statistically insignificant ( $P > 0.05$ ); ox-Lp(a) and ox-LDL promoted the increase of cell number and DNA synthesis significantly ( $P < 0.01$ ), and the promoting effects were greater than those of the corresponding native lipoproteins ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Oxidized Lp(a) might play a role in atherogenesis through stimulating the proliferation of SMC.

**KEY WORDS** Lipoprotein(a); Oxidized lipoprotein; Smooth muscle cell; Cell proliferation

**摘要** 为探讨脂蛋白(a)高度致动脉粥样硬化作用的可能机制,本文通过体外  $\text{Cu}^{2+}$  氧化法进行了低密度脂蛋白和脂蛋白(a)的氧化,并利用细胞计数及氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法,比较观察了天然和氧化的脂蛋白(a)及低密度脂蛋白对培养的兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响。结果发现,在相同氧化时间内脂蛋白(a)对  $\text{Cu}^{2+}$  的氧化敏感性较低密度脂蛋白低;氧化后的脂蛋白(a)和低密度脂蛋白均可明显促进平滑肌细胞增殖使DNA合成增加( $P < 0.01$ ),且其作用较相应的天然脂蛋白大( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。此结果提示:脂蛋白(a)经氧化后促进平滑肌细胞增殖可能是其致动脉粥样硬化的机制之一。

**关键词** 脂蛋白(a); 氧化型脂蛋白; 平滑肌细胞; 细胞增殖

现普遍认为低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)强烈的致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用可能与其氧化修饰有关<sup>[1]</sup>,氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, 氧化型 LDL)不仅促使动脉壁泡沫细胞的形成,而且还有很强的刺激血管平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)增殖效应<sup>[2]</sup>。血中高水平的脂蛋白(a)[lipoprotein(a)]也是一种独立的致As危险因素,除含有独特的载脂蛋白(a)外,其结构中脂质及载脂蛋白B100成分均与LDL极为相似。有发现脂蛋白(a)对  $\text{Cu}^{2+}$  等介导的氧化有高敏感性<sup>[3]</sup>,并有证据证实人动脉壁中存在氧化修饰的脂蛋白(a)<sup>[4]</sup>。因此有

必要观察氧化型脂蛋白(a) 是否也有与氧化型 LDL 同样的效应, 鉴于动脉 SMC 增殖在 As 病变的发生发展过程中处于关键地位, 本实验比较了天然及氧化型脂蛋白(a) 对培养的兔主动脉 SMC 增殖的影响, 以深入探讨脂蛋白(a) 在 As 发生过程中的病理生理作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

DMEM 培养基、胎牛血清、小牛血清(Gibco); 胰蛋白酶、胶原酶(I 型)(Sigma);  $^3\text{H}$ -TdR(中国原子能科学院提供); 1,1,3,3-四乙氧基丙烷(Fluka); Sephacryl S-400 (Pharmacia); 羊抗人载脂蛋白(a)和载脂蛋白 B 抗血清(本教研室制备); 其它均为国产分析纯。

### 1.2 兔主动脉平滑肌细胞培养

参照文献[5]并改进, 用酶离结合贴块法培养兔主动脉平滑肌细胞。取 4~6 周龄日本大耳白家兔胸主动脉中膜内 2/3, 剪成 1 mm<sup>3</sup> 小块, 置含 10% 小牛血清的 0.2% 胶原酶(I 型)中于 37℃、25 次/min 振荡 6~8 h, 将未消化完全的组织块以贴块法置培养瓶中, 37℃ 静置 1 h, 加含 20% 胎牛血清的 DMEM 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 3~4 天后更换培养液。细胞生长汇合后, 经 0.125% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化液消化, 再改至含 20% 小牛血清的 DMEM 进行传代培养。

### 1.3 脂蛋白(a)及低密度脂蛋白的分离、纯化及氧化

用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法从健康献血员中筛选高脂蛋白(a)个体, 参照本室建立的分离血浆脂蛋白(a)方法<sup>[6]</sup>, 用磷酸一镁沉淀含载脂蛋白 B 的脂蛋白, 溶解沉淀后超速离心, 收集  $d < 1.120 \text{ kg/L}$  的部分, 置 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(pH 7.4, 含 1 mmol/L EDTA), 4℃ 透析 24 h, 经 Sephacryl S-400(1.6 cm×100 cm) 柱层析分离脂蛋白(a)、低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳、双层火箭免疫电泳鉴定脂蛋白(a)和低密度脂蛋白纯度, Lowry 法测定蛋白含量。取纯化的脂蛋白(a)和 LDL 各 1 mL(含 1 mg), 分别加 CuSO<sub>4</sub> 至终浓度为 10 μmol/L, 37℃ 温育, 20 h 后加 EDTA(1 mmol/L)终止氧化反应, 再于 10 mmol/L 4℃ PBS 中充分透析。采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)比色法以 1,1,3,3-四乙氧基丙烷为标准品测丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 预染脂

蛋白琼脂糖凝胶电泳观察电泳迁移率来鉴定脂蛋白氧化程度。

### 1.4 平滑肌细胞细胞计数

取生长状态良好的第 3~8 代 SMC 制成细胞悬液( $4 \times 10^7$  个/L), 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔 0.5 mL, 孵育 24 h, 换无血清培养液继续孵育 24 h 后, 加小牛血清至浓度为 10%, 同时分组加入 LDL、氧化型 LDL、脂蛋白(a)和氧化型脂蛋白(a), 终浓度为 25 mg 脂蛋白/L 培养液, 对照组为只含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 培养三天后以细胞消化液分离细胞, 用 4% 台盼蓝染色计数。

### 1.5 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法

将 SMC 在含有 LDL、氧化型 LDL、脂蛋白(a)和氧化型脂蛋白(a)(终浓度为 25 mg 脂蛋白/L 培养液)的 DMEM 培养液中孵育 18 h 后, 各孔加氚标胸腺嘧啶脱氧核苷( $^3\text{H}$ -TdR)至终浓度为 2 mCi/L, 6 h 后收样, 弃含 $^3\text{H}$ -TdR 培养液, D-Hanks 液洗三次, 以细胞消化液消化, 真空泵将细胞抽吸于玻璃纤维滤纸上, 5% 三氯醋酸固定, 无水乙醇脱水, 干燥后置闪烁瓶中加入闪烁液(甲苯 500 mL, PPO 3 g, POPOP 0.1 g)于液体闪烁分析仪(美国 Packard)上测各样本每分钟放射脉冲数(cpm)。

### 1.6 统计学分析

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据分析采用配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 脂蛋白(a)及低密度脂蛋白的氧化

附图(Figure)为两种脂蛋白氧化修饰后电泳迁移率的变化。发现脂蛋白(a)和 LDL 经氧化修饰后电泳迁移率均明显大于相应的脂蛋白, 相对电泳迁移率氧化型脂蛋白(a)小于氧化型 LDL。TBARS 值见表 1(Table 1), 脂蛋白(a)氧化后丙二醛含量显著升高, 氧化型脂蛋白(a)中丙二醛产生量只有氧化型 LDL 的 68%, 表明 Cu<sup>2+</sup> 在体外能介导脂蛋白(a)及 LDL 的氧化, 但在相同的氧化时间内脂蛋白(a)氧化程度较 LDL 低。

### 2.2 天然及氧化型脂蛋白(a)和低密度脂蛋白对动脉平滑肌细胞增殖的影响

两种脂蛋白氧化修饰与否对增殖的动脉平滑肌细胞计数的变化见表 2(Table 2)。结果发

现天然脂蛋白(a)和 LDL 有使 SMC 细胞计数相对增加的趋势,但与对照组比较,无显著性差异( $P>0.05$ )。而氧化型脂蛋白(a)和氧化型 LDL 使 SMC 细胞计数显著增加( $P<0.01$ ),表明氧化型脂蛋白(a)可能有促细胞有丝分裂的作用,且作用明显较天然脂蛋白(a)大( $P<0.05$ )。

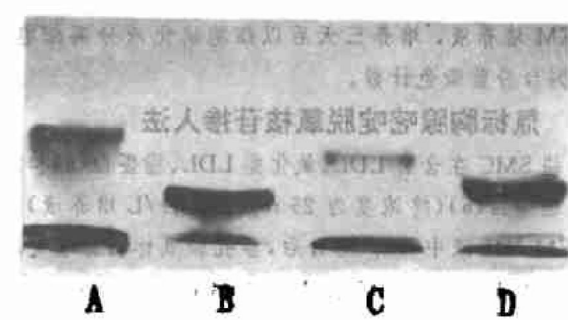


Figure. Agarose gel electrophoresis of native and oxidized Lp(a) and LDL. A: ox LDL; B: LDL; C: ox Lp(a); D: Lp(a).

Table 1. The content of malondialdehyde (MDA) in Lp(a) and LDL before and after oxidative modification ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol/L}$ ).

| Groups   | n | MDA              |
|----------|---|------------------|
| LDL      | 4 | $1.2 \pm 0.1$    |
| ox LDL   | 4 | $56.5 \pm 8.2^a$ |
| Lp(a)    | 4 | $6.7 \pm 0.1$    |
| ox Lp(a) | 4 | $38.4 \pm 6.6^b$ |

a:  $P<0.01$ , compared with LDL group; b:  $P<0.01$ , compared with Lp(a) group.

Table 2. Effects of native and oxidized Lp(a) and LDL on cell number and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation of smooth muscle cells ( $\bar{x} \pm s$ ).

| Group    | Concentration (mg/L) | Cell number ( $\times 10^4$ /well) | $^3\text{H}$ -TdR incorporation (cpm/well) |
|----------|----------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| Control  | 0                    | $2.25 \pm 0.22$                    | $497 \pm 91$                               |
| LDL      | 25                   | $2.42 \pm 0.20$                    | $510 \pm 80$                               |
| ox-LDL   | 25                   | $3.04 \pm 0.25^a$                  | $619 \pm 91^a$                             |
| Lp(a)    | 25                   | $2.34 \pm 0.24$                    | $537 \pm 93$                               |
| ox-Lp(a) | 25                   | $2.96 \pm 0.23^b$                  | $629 \pm 77^b$                             |

a:  $P<0.01$ , compared with control group; b:  $P<0.01$ , compared with LDL group; c:  $P<0.05$ , compared with Lp(a) group.

2.3: 天然及氧化型脂蛋白(a)和低密度脂蛋白对动脉平滑肌细胞氟标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量的影响

两种脂蛋白氧化修饰与否对动脉平滑肌细胞增殖过程中氟标胸腺嘧啶脱氧核苷( $^3\text{H}$ -TdR)掺入量的影响见表2(Table 2)。与对照组相比,氧化型脂蛋白(a)和氧化型 LDL 同样可使 SMC 内 $^3\text{H}$ -TdR 掺入量显著增加( $P<0.01$ ),表明氧化型脂蛋白(a)能促进 SMC 中 DNA 合成增加,且较天然脂蛋白(a)作用明显( $P<0.05$ );而天然脂蛋白(a)和 LDL 有使 SMC  $^3\text{H}$ -TdR 掺入量相对增加的趋势,但与对照组比较,差异无显著性意义( $P>0.05$ )。

3 讨论

脂蛋白与动脉粥样硬化形成的关系一直是人们关注的研究课题。随着研究工作的不断深入,研究者们已将注意力转移到脂蛋白对动脉 SMC 增殖的影响上。尤其是 80 年代末有人发现,LDL 先由动脉壁细胞氧化修饰成氧化型 LDL,尔后刺激血管壁细胞表达血小板源生长因子、白细胞介素-1 等细胞因子,促进 SMC 增殖并迁移至内皮下,这成为 As 斑块形成的关键之一<sup>[2]</sup>。脂蛋白(a)与 LDL 相比,既有结构的相似性,又有其独特性。近年来,国外十分注意脂蛋白(a)氧化修饰与 As 的关系。体外研究发现脂蛋白(a)经细胞、 $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  等致氧化因子作用可发生氧化修饰,氧化型脂蛋白(a)易通过清道夫受体或吞噬作用很快被巨噬细胞摄取、降解,从而促进胞内胆固醇酯的蓄积<sup>[3]</sup>,并能更有效地与纤维蛋白溶解酶原(简称纤溶酶原)竞争细胞表面纤溶酶原受体,促进血栓形成<sup>[4]</sup>。

Naruszewicz 等<sup>[5]</sup>认为脂蛋白(a)中  $\alpha$ -生育酚和  $\beta$ -胡萝卜素含量较 LDL 少并含较高的游离脂肪酸,故较 LDL 容易氧化,而 Sattler 等<sup>[3]</sup>则认为,尽管脂蛋白(a)中抗氧化剂含量低,但因脂蛋白(a)含较高浓度的 N-乙酰神经氨酸,通过某种保护机制而表现出氧化敏感性较低,同时脂蛋白(a)颗粒表面的载脂蛋白(a)

对其内部载脂蛋白 B100 的保护,也可能是脂蛋白(a)较 LDL 难于氧化的原因之一<sup>[9]</sup>。尽管对脂蛋白(a)氧化敏感性有不同的认识,但仍普遍认为脂蛋白(a)在动脉壁由于与细胞外基质如氨基葡聚糖和蛋白多糖等亲和力较 LDL 高许多倍,滞留时间长而被氧化的可能性极大。本实验成功地在体外应用  $\text{Cu}^{2+}$  氧化了脂蛋白(a)和 LDL,并观察了脂蛋白(a)和 LDL 对氧化敏感性的差异,结果表明,脂蛋白(a)及 LDL 氧化后丙二醛含量均明显高于相应脂蛋白,在相同氧化时间内脂蛋白(a)的氧化敏感性较 LDL 低,这与 Sattler 等<sup>[3]</sup>报道的结果一致。

文献[10]报道,脂蛋白(a)可促进人血管 SMC 的增殖但对大鼠的 SMC 促增殖作用不明显,其机制可能与其抑制纤溶酶原活性,从而抑制细胞转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )活化有关。对于氧化后的脂蛋白(a)与血管壁 SMC 增殖的相互关系,目前尚未见研究报道。本文以体外培养的兔主动脉 SMC 为对象,从细胞计数和对细胞 DNA 合成影响的结果发现:天然脂蛋白(a)有促兔主动脉 SMC 增殖的趋势,但与对照组比较差异不显著;而氧化后促 SMC 增殖较天然脂蛋白(a)显著加强,说明脂蛋白(a)经氧化修饰后,发生了结构和特征性的改变,增强其促 SMC 增殖的作用从而参与动脉粥样硬化的发生和发展过程,其确切机制还有待进一步探讨。

#### 参考文献

- 1 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its athero-genicity. *N Engl J Med*, 1989, **320**: 915~924.
  - 2 Chatterjee S. Role of oxidized human plasma LDL in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem*, 1992, **111**: 143~147.
  - 3 Sattler W, Kostner GM, Waeg G, et al. Oxidation of lipoprotein(a). a comparison with low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1081**: 65~74.
  - 4 Hoff HF. Partial characterization of lipoproteins containing apo(a) in human atherosclerotic lesion. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 789~798.
  - 5 赵三妹, 夏人仪, 王宗立, 等. 动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用. *中华病理学杂志*, 1987, **16**(4): 260~261.
  - 6 张文武, 许春玲, 洪嘉玲. 一种分离人血浆脂蛋白(a)的简便方法. *生物化学与生物物理进展*, 1993, **20**(4): 294~297.
  - 7 Naruszewicz M, Selinger E, Davignon J. Oxidative modification of lipoprotein(a) and the effect of  $\beta$ -carotene. *Metabolism*, 1992, **41**: 1215~1224.
  - 8 Naruszewicz M, Giroux LM, Davignon J, et al. Oxidative modification of Lp(a) causes changes in the structure and biological properties of apo(a). *Chem Phys Lipids*, 1994, **67/68**: 167~174.
  - 9 Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, et al. Malondialdehyde modification of Lp(a) produces avid uptake by human monocyte-macrophages. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 4143~151.
  - 10 Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, et al. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science*, 1993, **260**: 1655~1658.
- (1998-06-19 收到, 1998-08-21 修回. 编辑: 胡必利)