

脂质过氧化对血管内皮细胞促增殖活性的影响

杨向红 陈铁镇 王跃中

(中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001)

Effect of Lipid Peroxidation of Vascular Endothelial Cells on Mitogenic Activities

YANG Xiang-Hong, CHEN Tie-Zhen and WANG Yue-Zhong

(Department of Experimental Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT

Aim To investigate whether the lipid peroxidation of endothelial cells had any effect on the production of growth factors by them.

Methods The bovine aortic endothelial cells were isolated and cultured using an enzyme-dispersal method, and the media conditioned by endothelial cells with lipid peroxidation induced by cumene hydroperoxide were collected. Then the endothelial cell-conditioned media (ECCM) were treated by heparin-binding sepharose, and the mitogenic activity of ECCM for swiss 3T3 cells were determined by incorporation of ^3H -thymidine into DNA of the cells. The concentration of endothelin in the media of endothelial cells were analysed by radioimmunoassay.

Results Cumene hydroperoxide induced storage of lipid peroxide in cultured endothelial cells, and there was an obvious increase in the incorporation of ^3H -thymidine into DNA in Swiss 3T3 cells treated with ECCM compared with the control. However, the mitogenic activity of ECCM for Swiss 3T3 cells were in non heparin-binding parts. Then the concentration of endothelin in the media of endothelial cells were treated by cumene hydroperoxide were increased obviously compared with the control.

Conclusion It seems reasonable to believe that lipid

peroxidation of endothelial cells induced by cumene hydroperoxide leads to an increased synthesis and secretion of growth factors, and the mitogenic activities were due to non heparin-binding parts like as endothelin.

KEY WORDS Lipid peroxidation; Endothelial cell-derived growth factor; Endothelin; Atherosclerosis

摘要 为探讨脂质过氧化对血管内皮细胞源生长因子的影响,以氢过氧化枯烯作用于培养的牛主动脉内皮细胞后,收集内皮细胞条件培养基,并用肝素亲和层析法处理,分组测定其对 3T3 细胞 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入率的影响,并用放射免疫法测定各脂质过氧化作用组内皮细胞培养基中内皮素的含量。结果发现,氢过氧化枯烯使培养的内皮细胞的脂过氧化物蓄积增加,且内皮细胞条件培养基对 3T3 细胞的 DNA 合成有促进作用,对 Swiss 3T3 细胞的促增殖活性主要存在于非肝素结合部分。氢过氧化枯烯作用后的内皮细胞的内皮素分泌水平比对照组增加。由此推测脂质过氧化作用引起的内皮细胞对平滑肌细胞的促增殖活性可能与内皮素等非肝素结合的分子有关。

关键词 脂质过氧化; 内皮细胞源生长因子; 内皮素; 动脉粥样硬化

动脉中膜平滑肌细胞迁入内膜并增殖是动脉粥样硬化病变形成的重要病理过程,影响平滑肌细胞迁移和增殖的因素很多,已知血小板、单核/巨噬细胞、内皮细胞及平滑肌细胞本身均能产生和分泌多种影响平滑肌细胞增殖的因子。体外细胞培养表明,内皮细胞能产生和分泌如血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和小分子

物质内皮素(endothelin)等^[1~3]。内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化病变发生的始动机制,损伤的内皮细胞不一定出现细胞剥脱,大多表现为机能失调。我们以往的研究表明,脂质过氧化作用可引起培养的和在体的内皮细胞形态和结构的损伤及前列环素(prostacyclin, PGI_2)生成减少等障碍。动物实验表明,在高脂血症状态下,脂质过氧化损伤的动脉可在短期内形成纤维斑块^[4,5]。因此研究内皮细胞脂质过氧化损伤对平滑肌细胞增殖的影响,对进一步阐明脂质过氧化作用通过损伤内皮细胞而促进和加重动脉粥样硬化病变形成的机制具有重要意义。我们最近的研究发现,脂质过氧化作用能使内皮细胞对平滑肌细胞的致有丝分裂活性增强。所以本实验试图对脂质过氧化内皮细胞源生长因子活性的变化进行进一步地检测和分析。

1 材料和方法

1.1 牛主动脉内皮细胞的培养

于无菌条件下取出牛主动脉,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗3次,再向主动脉内灌注0.25%胰蛋白酶消化液,于37℃孵育30 min。然后收集主动脉内液体,离心后含15%小牛血清的DMEM培养基(Sigma)制成细胞悬液,分装于60 mm培养皿中,置于37℃、5% CO_2 条件下培养。以0.25%胰蛋白酶、0.02%乙二胺四乙酸二钠(disodium edetate, EDTA 2Na)消化传代,第3~5代细胞用于实验。

1.2 脂质过氧化作用实验

将培养达融合状态的内皮细胞分组,弃掉原有的培养基,氢过氧化枯烯作用组分别加入含0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L氢过氧化枯烯的DMEM液;对照组加入不含氢过氧化枯烯的DMEM液,37℃作用3 h后,采用改进的八木法^[6]测定细胞内脂过氧化物的代谢终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。

1.3 内皮细胞条件培养基的制备及肝素亲和层析

使内皮细胞暴露于氢过氧化枯烯液,作用3 h,弃去作用液。用PBS液轻洗2次,加入含0.2%牛血清白蛋白的无血清DMEM培养基,继续培养24 h,收集细胞培养基上清液,12 000 r/min离心10 min,取其上清液,即为内皮细胞条件培养基。

用肝素亲和层析柱,以20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)和150 mmol/L NaCl液平衡后,将内皮细胞条件培养基加入层析柱,通过层析柱的部分为非肝素结合部分。然后以20 mmol/L Tris-HCl和3.0 mmol/L NaCl液洗脱层析柱上的肝素结合部分。

1.4 内皮细胞条件培养基促增殖活性的测定

将生长状态良好的Swiss 3T3细胞以0.25%胰蛋白酶及0.02% EDTA 2Na消化,离心后计数,制成 2.0×10^7 个/L的细胞悬液,分装于24孔培养板中。以含10%小牛血清的培养基培养3~4 d,弃去培养基,加入无血清的DMEM液,继续培养48 h,再弃去培养基,分别加入上述4组内皮细胞条件培养基(各组又分为未经肝素亲和层析处理部分、肝素结合部分与非肝素结合部分),以无血清DMEM培养基作阴性对照。作用16~20 h后,每孔换入含74 MBq/L ^3H -TdR的DMEM液,37℃孵育2 h,以PBS液冲洗2次,5%三氯醋酸固定,再以0.25 mol/L NaOH液使细胞破碎,将细胞粉碎液加入闪烁液中,以液体闪烁仪计数其放射比活度。

1.5 内皮素放射免疫分析实验

以氢过氧化枯烯作用液孵育内皮细胞3 h后,弃去作用液,再加入无血清DMEM培养基,孵育16 h,抽取上清液作为测定样品,用内皮素(ET-1)放射免疫分析药盒测定各脂质过氧化作用组内皮细胞的内皮素分泌量。

1.6 统计学处理

采用 t 检验,对各组数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 细胞脂质过氧化物的含量

氢过氧化枯烯作用组内皮细胞的丙二醛含量均高于对照组,差异具有显著性($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),而且随着氢过氧化枯烯浓度的升高,丙二醛的含量也增多(图1, Figure 1)。结果表明,氢过氧化枯烯引发了内皮细胞的脂质过氧化反应。

2.2 内皮细胞条件培养基促增殖活性的结果

与对照组比较,经氢过氧化枯烯作用后的内皮细胞条件培养基对Swiss 3T3细胞的 ^3H -TdR掺入率明显增高($P < 0.01$),且其促增殖活性与氢过氧化枯烯的浓度呈正相关关系(图2, Figure 2)。氢过氧化枯烯对内皮细胞条件培养基肝素结合部分无明显促增殖活性,而对非

肝素结合部分与未经肝素亲和层析处理的内皮细胞条件培养基的促增殖活性呈相同增加趋势(图3, Figure 3)。

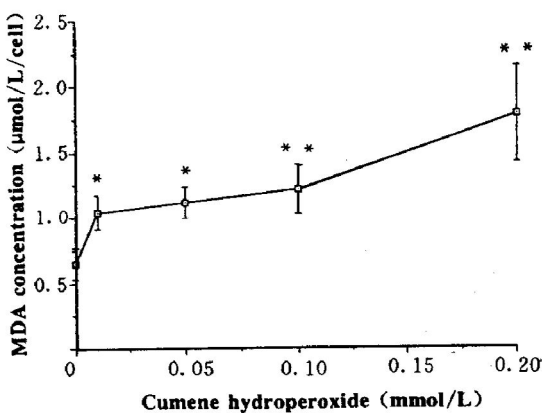


Figure 1. The concentration of MDA in cultured endothelial cells treated by cumene hydroperoxide ($n = 8$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with control group.

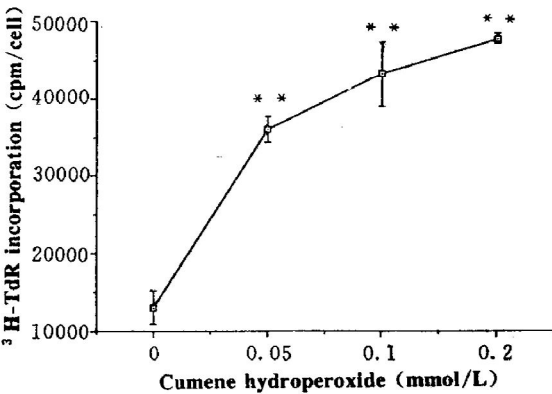


Figure 2. Effect of ECCM treated by cumene hydroperoxide on ^3H -thymidine incorporation of 3T3 cells. **: $P < 0.01$, compared with control group.

2.3 内皮素放射免疫分析结果

与对照组比较,经氢过氧化枯烯作用后的内皮细胞的内皮素含量明显增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),且与脂过氧化物浓度呈正相关关系(图4, Figure 4)。

3 讨论

已知有多种因子均能促进血管中膜平滑肌细胞的增殖,并且其含量在动脉粥样硬化病灶

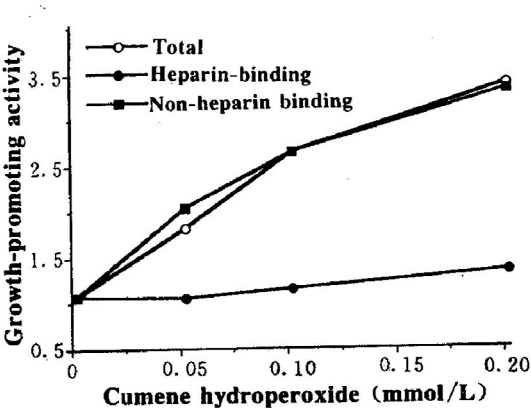


Figure 3. Growth-promoting activity of ECCM treated by cumene hydroperoxide from heparin-sepharose column.

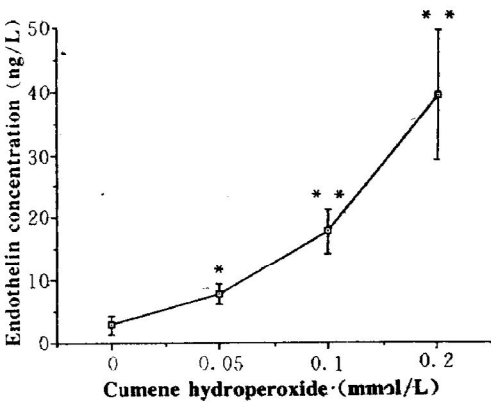


Figure 4. The concentration of endothelin in ECCM treated by cumene hydroperoxide ($n = 10$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with control group.

中呈增加趋势^[7]。这些因子可来自动脉硬化病变形成的血小板、内皮细胞、单核/巨噬细胞或平滑肌细胞本身。Ross^[7,8]的损伤应答学说认为,内皮细胞的机能失调是动脉粥样硬化病变发生的首发环节,从而引起细胞间相互作用和影响,导致动脉粥样硬化病变的形成。病变早期内皮细胞可保持其形态的完整性,但已出现生理机能的种种失调,包括产生和分泌生长调节因子的失调。体外培养发现,内皮细胞能分泌肝素结合性的血小板源生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子及小分子物质内皮素等促有丝分裂原,并且一些刺激因素包括机械性损伤等可使其分泌增加^[9]。本研究室的实验亦表明,人脐静脉和牛主动脉内皮细胞条件

培养基均能促进中膜平滑肌细胞的 DNA 合成^[10]。

我们以往的研究表明,脂过氧化物作用于内皮细胞后,不仅可以引起体内及体外内皮细胞的形态损伤和功能障碍,而且可促进和加速高脂血症状态下动物动脉纤维斑块病变的形成。所以研究脂质过氧化作用后的内皮细胞对周围细胞的影响,对阐明脂质过氧化作用促进和加重动脉粥样硬化病变的作用机制有重要意义。近来我们的研究表明,脂质过氧化作用后的内皮细胞对平滑肌细胞的 DNA 合成有明显的促进作用,而脂过氧化物直接作用于平滑肌细胞则对其 DNA 合成无明显影响^[10]。我们曾以抗血小板源生长因子-AA、抗血小板源生长因子-BB 中和抗体对内皮细胞条件培养基进行了抗体中和实验,发现脂质过氧化作用后内皮细胞的促增殖促活性不被中和^[11]。

本实验结果表明由氢过氧化枯烯作用引发的内皮细胞条件培养基对 Swiss 3T3 细胞的促增殖活性主要存在非肝素结合部分。氢过氧化枯烯作用后的内皮细胞的内皮素分泌水平比对照组明显增加。由此推测脂质过氧化作用引起的内皮细胞对平滑肌细胞的促增殖活性可能与内皮素等非肝素结合性的分子有关,其作用机理还有待进一步探讨。

参考文献

- 1 Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, et al. Endothelial cell-derived basicfibroblast growth factor; Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(8): 2 292~296.
- 2 Casscells W. Smooth muscle cell growth factors. In: *progress in Growth Factor Research*, Vol 3, New York: Pergamon, 1991, 177~206.
- 3 Bobik A, Grooms JA, Millar A. et al. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 1990, **258** (Cell Physiol. 27): C408~C415.
- 4 杨向红, 陈铁镇. 脂质过氧化对内皮细胞的损伤及抗氧化剂的保护作用. *中华病理学杂志*, 1990, **19**(1): 8.
- 5 陈铁镇, 董玉兰, 杨向红, 等. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *电子显微学报*, 1991, **10**(4): 393.
- 6 Ohkawa H, Ohiahi N, Yangi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**(2): 351.
- 7 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for 1990s. *Nature*, 1993, **362**(29): 801~809.
- 8 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med*, 1986, **314**(8): 488.
- 9 Michael K, Susan D. Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends Cardiovasc Med*, 1993, **3**: 213~217.
- 10 杨向红, 陈铁镇. 血管内皮细胞脂质过氧化对中膜平滑肌细胞增殖的影响. *中华医学杂志*, 1996, **76**(1): 58~59.
- 11 杨向红, 陈铁镇. 脂质过氧化对血管内皮细胞源生长因子分泌的影响. *中华病理学杂志*, 1996, **25**(2): 107~108.

(1998-04-20 收到, 1998-07-24 修回. 编辑: 文玉珊)