

高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白抑制的 血管平滑肌细胞一氧化氮释放的影响

梁利波 王 抒 黎 健

(卫生部北京老年医学研究所, 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730)

Effect of High Density Lipoprotein on the Production of Nitric Oxide Inhibited by Oxidized Low Density Lipoprotein

LIANG Li-Bo, WANG Shu and LI Jian

(Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics,
Beijing 100730, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effect of high density lipoprotein (HDL) on the production of nitric oxide (NO) inhibited by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in vascular smooth muscle cells.

Methods The production of NO in cultured human vascular smooth muscle cells was analyzed by measuring nitrite in media with GRIESS reagent. The immunochemical staining was used to observe the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS). The content of mRNA for iNOS was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results The ox-LDL could decrease the content of iNOS and level of mRNA for iNOS in vascular smooth muscle cells induced by lipopolysaccharide and interferon- γ , leading to inhibition of NO production. However, the addition of HDL before incubation with LDL could increase the production of NO and level of iNOS. 0.25 g/L HDL could significantly increase the release of NO, and at concentration of 1.5 g/L the production of NO was 4.5 times higher than the control. The effect of HDL was concentration dependent.

Conclusions HDL could inhibit the activity of ox-LDL on production of NO in vascular smooth muscle

cells.

KEY WORDS High density lipoprotein; Oxidized low density lipoprotein; Nitric oxide; Atherosclerosis

摘要 为观察高密度脂蛋白是否能拮抗氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞释放一氧化氮的抑制作用,培养了人脐动脉平滑肌细胞并用脂多糖和 γ -干扰素诱导一氧化氮的释放。应用GRIESS试剂测定细胞培养基中亚硝酸盐的含量,以免疫组织化学染色和逆转录-聚合酶链反应分析诱导型一氧化氮合酶基因的表达。结果发现,氧化型低密度脂蛋白可使脂多糖和 γ -干扰素诱导的平滑肌细胞一氧化氮合酶及其mRNA水平下降,抑制一氧化氮释放。而高密度脂蛋白能拮抗氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞释放一氧化氮的抑制作用。0.25 g/L 高密度脂蛋白即能显著增加一氧化氮的释放($P < 0.05$),高密度脂蛋白浓度达到1.5 g/L可使得一氧化氮的释放增加4.5倍。结果表明,高密度脂蛋白能提高一氧化氮合酶基因表达水平,促进一氧化氮的释放。高密度脂蛋白的作用具有浓度效应。

关键词 高密度脂蛋白; 氧化型低密度脂蛋白; 一氧化氮; 动脉粥样硬化

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的信使分子,对心血管系统有广泛的调节作用。NO能抑制血管平滑肌细胞的增殖、血小板聚集和白细胞粘附^[1~3]。NO由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸产生。NOS分为结构型和诱导型(inducible NOS, iNOS)。iNOS只有在白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等因素诱导下表达^[4]。在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑

块中 NOS 的含量和基因表达水平都下降,提示 NOS 合成量的下降可能参与了 As 的发展^[5]。

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)被认为具有致 As 作用。一方面 ox-LDL 可被巨噬细胞清道夫受体识别而摄取,导致泡沫细胞的形成^[6];另一方面,ox-LDL 能降低巨噬细胞和血管平滑肌细胞的 iNOS mRNA 水平,抑制 NO 的释放^[7]。而高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)具有抗 As 作用^[8]。研究表明,HDL 拮抗 LDL 对血管内皮细胞的损伤^[9,10],但 HDL 能否拮抗 ox-LDL 对平滑肌细胞释放 NO 的抑制作用,至今尚无报道。本实验探讨了 ox-LDL 对血管平滑肌细胞 NO 释放的抑制作用以及 HDL 对这种抑制的拮抗作用。

1 材料与方法

1.1 高密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白的制备

人血浆 HDL、LDL 采用密度梯度离心法制备(HDL: $d=1.063\sim1.21$, LDL: $d=1.04\sim1.063$)。LDL 用 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 氧化修饰^[11]。HDL、ox-LDL 用 220 nm 滤器(Gelman)除菌, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。蛋白定量采用 Lowry 法。

1.2 人脐动脉平滑肌细胞的培养

人脐动脉剥离中膜,贴块培养。培养基为 RPMI 1640(GIBCO),其中含 20%胎牛血清(GIBCO)、 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。取 4~8 代细胞用于实验,根据实验需要分别接种于 96 孔板(Costar)、6 孔板(Costar)和 75 cm^2 培养瓶(NUNC)中。当细胞长至 70%融合时,加入不同浓度的 ox-LDL 培养 24 h,在最后 20 h 加入 γ -干扰素(北京邦定生物医学公司)和脂多糖(Sigma),使其终浓度分别为 200 ku/L 、 5 mg/L ;或者先加入不同浓度的 HDL 培养 19 h,随后再加入 50 mg/L ox-LDL、 γ -干扰素/脂多糖培养 24 h。测定培养基中的亚硝酸盐(NO_2^-)浓度、平滑肌细胞中 iNOS 以及 iNOS mRNA 水平。

1.3 亚硝酸盐的测定

参照文献^[12]的方法。取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 培养基,加入等量的 GRIESS 试剂,室温放置 10 min,再加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 水,用 RA-50 半自动生化分析仪(TECHNICON)于

546 nm 测定吸收度。以 NaNO_2 作标准曲线。

1.4 诱导型一氧化氮合酶免疫组织化学染色

将载玻片上的细胞固定(9.3%甲醛,45%丙酮),一抗为兔抗人 iNOS 多克隆抗体(AFFINITY BIOREAGENTS, INC),二抗为羊抗兔 IgG-生物素,ABC(Vector Lab)染色。

1.5 逆转录—聚合酶链反应

应用总 RNA 提取试剂盒(Promega)提取细胞 RNA。以反转录试剂盒(Promega)逆转录 RNA。然后进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)。PCR 所用引物为 5'-GCCTCGCTCTGGAAAGA-3' (bases 1425~1441, sense), 5'-TCCATGCAGACAACCTT-3' (bases 1908~1924, antisense)^[13]。反应条件: $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ 35 s \rightarrow $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min \rightarrow $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 25~30 个循环。每组样品同时对作为内对照的看家基因 GAPDH 进行扩增。PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳。

1.6 统计分析方法

测定结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,样本差异的显著性采用 t 检验。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对 γ -干扰素/脂多糖诱导的平滑肌细胞一氧化氮释放的抑制作用

如图 1 (Figure 1)所示, 15 mg/L ox-LDL 能显著抑制 NO 的释放,ox-LDL 浓度达到 50 mg/L 时,与对照组相比, NO_2^- 从 $25.2\pm1.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 降至 $4.8\pm1.3\text{ }\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$)。随着浓度的增加,ox-LDL 的抑制作用逐渐增强。

2.2 高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白抑制的血管平滑肌细胞一氧化氮释放的影响

培养基中加入 HDL 预先孵育,能拮抗 ox-LDL 的作用,促进血管平滑肌细胞释放 NO (图 2, Figure 2)。与对照组相比, 0.25 g/L HDL 即能使得培养基中 NO_2^- 显著增加 ($P<0.05$); HDL 浓度为 1.5 g/L 时, NO_2^- 增加了 4.5 倍。HDL 作用是浓度依赖性的。

2.3 高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白抑制的一氧化氮合成酶表达的作用

将细胞接种于盖玻片上,进行免疫组织化学染色。以不加 HDL 和 ox-LDL 组作为对照。

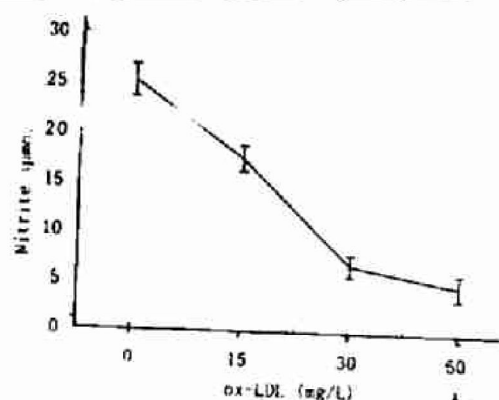


Figure 1. Effect of ox-LDL on the production of NO in vascular smooth muscle cell ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

结果见图 3 (Figure 3)。与对照组相比较, ox-LDL 组血管平滑肌细胞中只有少量的棕色颗粒,提示 iNOS 的表达受到抑制。与 ox-LDL 组相比较, HDL 处理组平滑肌细胞中含有大量棕

色颗粒,表明 HDL 能促进 ox-LDL 抑制的 iNOS 的表达。

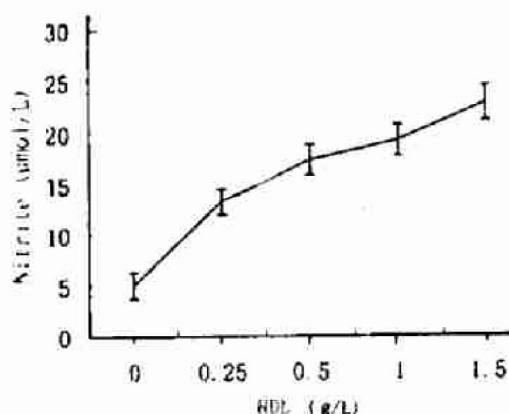


Figure 2. Effect of HDL on the production of NO inhibited by ox-LDL in vascular smooth muscle cell ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

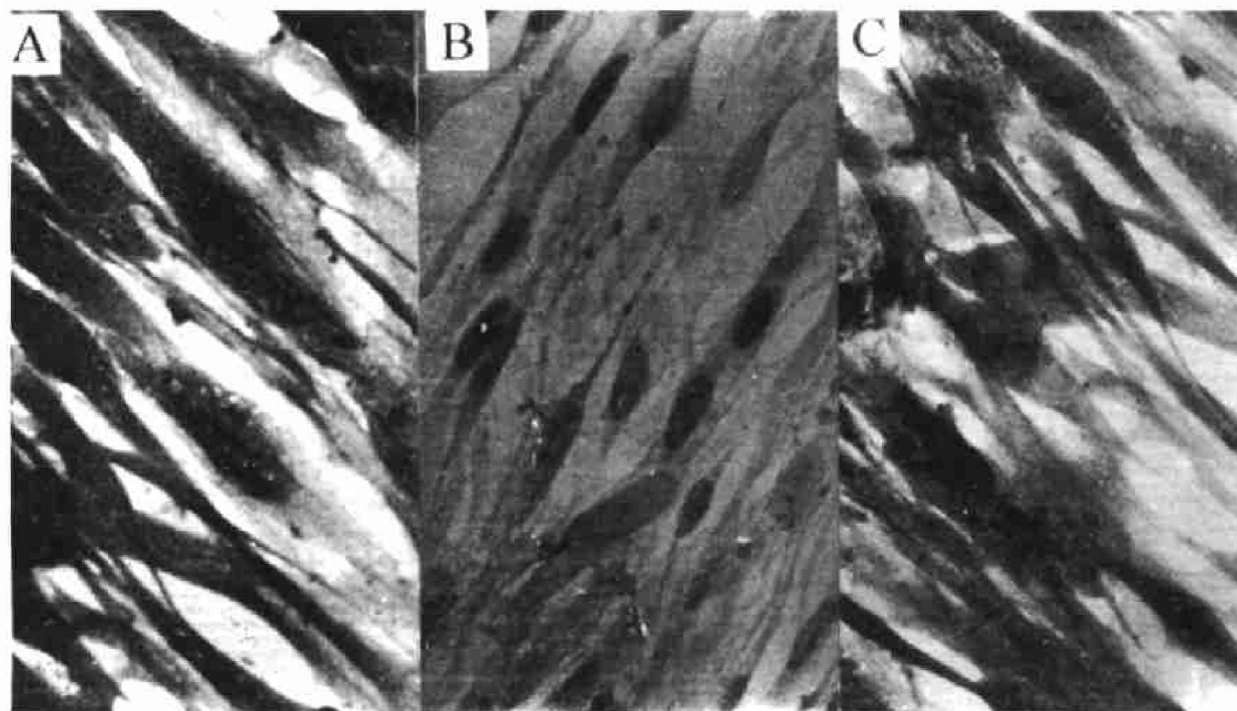


Figure 3. Effect of HDL on the expression of iNOS inhibited by ox-LDL in vascular smooth muscle cell ($\times 400$).
A: control group. B: ox-LDL group. C: HDL+ox-LDL group.

2.4 高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白抑制的一氧化氮合酶 mRNA 水平的作用

从细胞中提取总 RNA, 进行逆转录-聚合酶链反应。以不加 HDL 和 ox-LDL 组作为对

照。取 5 μ L PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 结果见图 4 (Figure 4)。与对照组相比, ox-LDL 组 iNOS mRNA 水平下降, 而 HDL 组 PCR 产物的含量明显高于 ox-LDL 组, 表明

ox-LDL 抑制 iNOS 基因的转录,而 HDL 能促进被 ox-LDL 抑制的 iNOS 基因的转录。各组间看家基因 GADPH 的 mRNA 水平无明显差别。

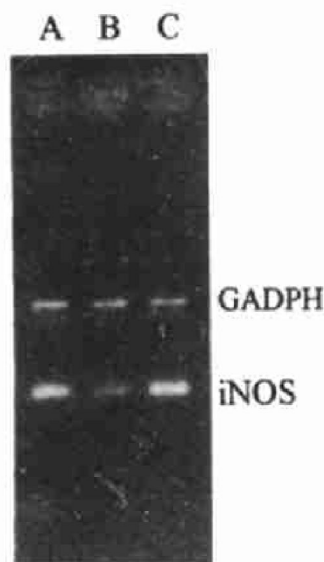


Figure 4. Effect of HDL on the level of iNOS mRNA inhibited by ox-LDL in vascular smooth muscle cell.

A: HDL+ox-LDL group. B: ox-LDL group. C: Control group.

3 讨论

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)对 As 的发展具有重要作用,能造成胆固醇的积累和泡沫细胞的形成。LDL 主要由载脂蛋白 B 和脂质构成。LDL 氧化的结果使得其中的一部分卵磷脂转变成溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC)。在 ox-LDL 中,载脂蛋白 B 对 iNOS 并无抑制作用^[6],而 LPC 却具有广泛的生物活性,对细胞膜功能、G 蛋白、细胞内信号传导、离子运输和基因表达都有作用。LPC 能抑制内皮细胞依赖性动脉舒张,其作用不能被 L-精氨酸所逆转^[13]。研究发现 LPC 能直接从 ox-LDL 转移到内皮细胞膜上和细胞内^[14],通过膜物理性质的改变影响 G 蛋白与受体的结合,使 Gi 蛋白依赖性信号通路发生改变^[15]。LPC 也能抑制磷酸肌醇的水解,使得细胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[16]。但 LPC 并不能直接抑

制 iNOS 活性,可能通过影响细胞信号传导,与钙调蛋白亚单位反应而抑制 iNOS 的活性^[4]。

高密度脂蛋白(HDL)具有抗 As 功能^[9]。研究表明 HDL 和载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I)具有抑制 LDL 脂质过氧化的作用^[17]。利用载脂蛋白 A I 转基因小鼠证实载脂蛋白 A I 能降低 ox-LDL 的电泳迁移率,中和 ox-LDL 中的脂过氧化物^[18]。二豆蔻酰磷脂酰胆碱(dimyristoylphosphatidylcholine, DMPC)/载脂蛋白 A I 的复合物能降低 ox-LDL 在巨噬细胞中积累胆固醇酯,抑制 ox-LDL 作为清道夫受体配体的活性^[19]。HDL 和 DMPC/载脂蛋白 A I 复合物能吸收 ox-LDL 中的 LPC,降低 LPC 向内皮细胞膜的转移,保护内皮细胞,改善 ox-LDL 所抑制的内皮细胞依赖性动脉舒张^[20]。

在本实验中我们从 NO、iNOS 及其 mRNA 水平对 HDL 改善 ox-LDL 抑制的 NO 释放进行了研究,发现 HDL 能显著拮抗 ox-LDL 抑制的血管平滑肌细胞中 NO 的产生。这可能与 HDL 抑制 ox-LDL 活性有关。NO 能抑制血管平滑肌细胞的增殖、血小板聚集、白细胞粘附^[1-3]。HDL 间接促进 NO 的产生,可能是 HDL 抗 As 作用机理的一个方面。

参考文献

- 1 Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 651~655.
- 2 Garg UC, Hassid A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1989, 83: 1774~1777.
- 3 Moncada S, Higgs A. Mechanism of disease. *N Engl J Med*, 1993, 329: 2002~2012.
- 4 Beasley D, Eldridge M. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically induce NO synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1994, 266 (4): R1197~1203.
- 5 Bolton EJ, Jessup W, Stanley KK, et al. Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cell and their failure to secrete nitric oxide. *Atherosclerosis*, 1994, 106: 213~223.

- 6 Witztum JL, Steiberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1 785~792.
- 7 Yang X, Cai B, Sciacca RS, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophage by oxidized low-density lipoproteins. *Circ Res*, 1994, **74**: 318~328.
- 8 Badimon JJ, Badimon L, Fuater V. Regress of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*, 1990, **85**: 12 134~141.
- 9 黎健, 蒋雷, 刘清华. 载脂蛋白 AⅡ保护内皮细胞的实验研究. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24**: 344~347.
- 10 黎健, 刘清华, 蒋雷, 等. 载脂蛋白 CⅢ拮抗低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 32~36.
- 11 刘尚喜, 周玫, 陈瑗. 低密度脂蛋白的氧化和丙二醛的比较研究. *生物化学与生物物理学报*, 1992, **24**: 569~574.
- 12 Green LC, Wagner DA, Gogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131~138.
- 13 Jenkins DC, Chles IG, Baylis SA, et al. Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation. *Br J Cancer*, 1994, **70**: 847~849.
- 14 Ohgushi M, Kugiyama K, Fukunaga K, et al. Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 1 525~532.
- 15 Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, et al. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxation of porcine coronary arteries: role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 1991, **83**: 2 012~020.
- 16 Inoue N, Hirata K, Yamada M, et al. Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res*, 1992, **71**: 1 410~421.
- 17 Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, et al. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis*, 1993, **100**: 13~18.
- 18 Hayek T, Oiknine J, Dankver G, et al. HDL apolipoprotein AⅠ attenuates oxidative modification of low density lipoprotein; studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, **33**: 721~725.
- 19 Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, et al. Reconstituted high density lipoprotein reduces the capacity of oxidatively modified low density lipoprotein to accumulate cholesterol esters in mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis*, 1996, **119**: 191~202.
- 20 Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, et al. Complexes of apo AⅠ with phosphatidylcholine suppress dysregulation of arterial tone by oxidized LDL. *Am J Physiol*, 1997, **273** (Pt2): H1 215~222.

(此文 1998-08-10 收到, 1998-11-11 修回)

(此文编辑: 胡必利)