

氧化型和正常极低密度脂蛋白对猪主动脉平滑肌细胞脂类堆积的不同影响

杨宇虹 冯宗忱 王淳本 江卫国 赵小松

(同济医科大学生物化学教研室, 武汉 430030)

The Effect of Oxidized and Normal Very Low Density Lipoprotein on Lipid Accumulation in Porcine Aortic Smooth Muscle Cells

YANG Yu-Hong, FENG Zong-Chen, WANG Chun-Ben, JIANG Wei-Guo and ZHAO Xiao-Song

(Department of Biochemistry, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim To observe the different effects of oxidized very low density lipoprotein (ox-VLDL) and normal VLDL (n-VLDL) on lipid accumulation in smooth muscle cells (SMCs) and attempt to explore receptor pathway of ox-VLDL uptaken by SMCs.

Methods The same concentration of ox-VLDL or n-VLDL was incubated with porcine aortic SMCs for 48 hours, total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) of the cells were extracted and determined.

SMCs were incubated at 37°C in RPMI 1640 containing different concentration of FITC-ox-VLDL or FITC-n-VLDL for 4 hours, the cells were washed with phosphate buffered saline and the cell surface bound lipoproteins were determined by fluorospectrometry. Competition experiments were performed as above, except for adding different concentration of unlabeled lipoproteins into the medium.

Results ox-VLDL or n-VLDL (200 mg/L) was incubated with porcine aortic SMCs for 48 hours, causing a 3.2- and 10.6- fold increment of cellular TG in SMCs respectively ($P < 0.01$). less TG was ac-

cumulated with ox-VLDL as compared with n-VLDL ($P < 0.01$). Scatchard plot of the data of binding experiment showed that the K_d of the binding of ox-VLDL or n-VLDL on SMCs were 48.82 mg/L and 37.17 mg/L respectively, and the B_{max} was 2067 μ g ox-VLDL/g cell protein and 2596 μ g n-VLDL/g cell protein respectively. nLDL competed with FITC-ox-VLDL on binding to SMCs as efficient as ox-VLDL, however, acetyl LDL inhibited only 10%.

Conclusion More TG was accumulated in cells exposed to n-VLDL ($P < 0.01$). FITC-ox-VLDL and FITC-n-VLDL were taken up by SMCs via saturable mechanism with low affinity. The K_d of the binding of ox-VLDL on SMCs was greater than that of n-VLDL and the B_{max} was lower than that of n-VLDL. nLDL competed with FITC-ox-VLDL on binding to SMC as efficient as ox-VLDL, acetyl LDL exhibited low competitive effect, indicating that, ox-VLDL was taken up by SMC via LDL or VLDL receptor.

KEY WORDS Lipoproteins, VLDL; Muscle, smooth; Foam cells; Atherosclerosis

摘要 为了观察氧化型及正常极低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞内脂类堆积的不同影响,探索平滑肌细胞摄取氧化型极低密度脂蛋白的受体途径,用 200 mg/L 的氧化型及正常极低密度脂蛋白与猪主动脉平滑肌细胞温育 48 h 后,细胞内甘油三酯含量分别为对照组的 3.2 倍和 10.6 倍 ($P < 0.01$),且两个实验组之间相比,差异也有显著性意义 ($P < 0.01$);细胞内总胆固醇明显升高 ($P < 0.05$),但是两个实验组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。荧光素异硫氰酸酯标记的氧化型极低密度脂蛋白结合试验表明:平滑肌细胞可通过低亲和力受体途径可饱和性地摄取完整的氧化型极低密度脂蛋白 ($K_d = 48.82$ mg/L, $B_{max} = 2067$ μ g/g)。与正常极低密度脂蛋白相比 ($K_d = 37.17$ mg/L, $B_{max} = 2596$

$\mu\text{g/g}$), K_d 值升高, B_{max} 值减小。竞争抑制实验表明, 氧化型极低密度脂蛋白、正常极低密度脂蛋白及正常低密度脂蛋白均对荧光素异硫氰酸酯标记的氧化型极低密度脂蛋白的结合摄取表现出明显的竞争作用(50%), 而乙酰化低密度脂蛋白仅能抑制 10%。提示氧化型极低密度脂蛋白通过低密度脂蛋白受体和/或极低密度脂蛋白受体途径进入平滑肌细胞。

关键词 极低密度脂蛋白, 正常, 氧化; 平滑肌细胞; 脂类堆积; 动脉粥样硬化

流行病学调查发现, 中国人的高脂血症是以高甘油三酯血症为主, 而甘油三酯(triglyceride, TG)主要存在于极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)中。我们的研究发现: 平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)可摄取正常 VLDL(normal VLDL, n-VLDL)^[1], 导致脂类堆积, 巨噬细胞(macrophage, MP)分泌的脂蛋白脂肪酶水解 n-VLDL 中的 TG, 使 VLDL 转变为残粒后, 可加速其被 SMC 摄取。研究表明 n-VLDL 被氧化为氧化型 VLDL(oxidized VLDL, ox-VLDL)后, 更易为 MP 所摄取^[2]。因此本文比较 ox-VLDL 与 n-VLDL 致 SMC 内脂类堆积作用的差别, 并初步探讨了 SMC 摄取 ox-VLDL 及 n-VLDL 的受体途径。

1 材料与方法

1.1 猪主动脉平滑肌细胞培养及分组

按文献[3]稍加改进, 剥取猪主动脉中膜内 1/3~2/3 肌层, 置 0.2% 胶原酶内于 37℃ 消化 6~8 h 后, 离心, 沉淀加含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37℃ 5% CO_2 温育, 3~4 天后完全融合, 出现“峰谷”交错的致密细胞层即可传代。

根据所加入脂蛋白不同将实验分为三组: ①对照组不加脂蛋白; ② ox-VLDL 组加入 ox-VLDL; ③ n-VLDL 组加入 n-VLDL。

1.2 脂蛋白的分离制备

在抗氧化条件下用密度梯度超速离心法^[4]分离得到 VLDL 及低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 经 1% 琼脂糖电泳为单一区带。部分 VLDL 中加入 Cu^{2+} (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$) 在室温(20~25℃)下反应 24 h, 即得 ox-VLDL, 其硫代巴比妥酸反应物质

(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)值明显升高, 电泳迁移率加快。

1.3 荧光素异硫氰酸酯标记脂蛋白

按文献[5]稍加改进, Sephadex G-25 过柱分离得标记脂蛋白(FITC-ox-VLDL 和 FITC-n-VLDL), 微孔滤膜过滤除菌备用。

1.4 甘油三酯和总胆固醇含量测定

将含 200 mg/L TG 的 ox-VLDL 和 n-VLDL 分别与 SMC 在 37℃ 条件下温育 48 h 后测定 SMC 内 TG 和 TC 值。细胞内脂类用 Folch 法抽提, 提取液蒸干后用试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)测定 TG 及 TC 含量。

1.5 细胞结合摄取脂蛋白

将不同浓度(0、50、100、150、200 和 250 mg/L)的 FITC-ox-VLDL 和 FITC-n-VLDL 与 SMC 在 25 mm 培养皿中 37℃ 下温育 4 h, 同时, 加入相同浓度标记脂蛋白培养基于无细胞皿中, 以测定非特异性结合量。然后用 PBS 洗 3 次, 每次 1 min。用 PBS 将细胞混悬, 测定荧光强度(测定条件: 激发光波长 497 nm, 发射光波长 516 nm)和细胞蛋白(Lowry 法), 扣除非特异性结合量, 计算细胞结合标记脂蛋白量。

1.6 脂蛋白与平滑肌细胞结合的竞争试验

在培养有 SMC 的培养皿中各自加入 25 mg/L 的标记脂蛋白和不同浓度(0、50、100、150 和 200 mg/L)的 ox-VLDL 和 n-VLDL, 100 mg/L 的 n-LDL 和乙酰 LDL 的未标记脂蛋白, 以无细胞皿为非特异性吸附对照, 37℃ 温育 4 h, 吸取培养基, 用 PBS 洗细胞 3 次, 再用 PBS 将细胞混悬, 测定细胞悬液的荧光强度(测定条件同上)和细胞蛋白。扣除非特异性结合量, 计算细胞结合标记脂蛋白量。以无未标记脂蛋白皿的细胞结合量为 100%, 计算各种脂蛋白竞争抑制 SMC 结合标记脂蛋白的百分率。

1.7 统计学方法

实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 均数差异进行 t 检验。

2 结果

2.1 氧化型及正常极低密度脂蛋白对平滑肌细胞内脂类含量的影响

从表 1 (Table 1) 可见, ox-VLDL 和 n-VLDL 组细胞内 TG 含量分别为对照组的 3.2 倍和 10.6 倍, 此差异有显著性意义($P < 0.01$), 而且 n-VLDL 组细胞内 TG 的含量比 ox-

VLDL 组明显增多($P<0.01$)。与对照组相比, ox-VLDL 和 n-VLDL 组细胞内 TC 含量明显升高($P<0.05$), 分别为对照组的 1.22 倍和 1.25 倍, 但二者之间无统计学差异($P>0.05$)。由此可见, ox-VLDL 及 n-VLDL 均可引起 SMC 内 TG 堆积, 促使平滑肌细胞转变为泡沫细胞, 而 n-VLDL 促进脂类堆积作用较 ox-VLDL 更强。

Table 1. Accumulation of TG or TC in SMC exposed to ox-VLDL or n-VLDL ($\bar{x}\pm s$, mg/g).

Groups	TG	TC
Control	18.42 \pm 3.12	33.49 \pm 2.80
ox-VLDL	58.85 \pm 14.08 ^a	40.92 \pm 3.64 ^b
n-VLDL	196.86 \pm 26.60 ^{ac}	41.77 \pm 4.12 ^b

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, compared with control group; c: $P<0.01$, compared with n-VLDL group.

2.2 平滑肌细胞对氧化型和正常极低密度脂蛋白的结合摄取

随着培养基中 FITC-氧化型极低密度脂蛋白及 FITC-正常极低密度脂蛋白的浓度加大, 平滑肌细胞表现出对 FITC-氧化型极低密度脂蛋白及 FITC-正常极低密度脂蛋白的可饱和性结合摄取(图 1, Figure 1), 采用 Scatchard 作图对表 1 的结合摄取曲线进行直线回归, 结果见图 2(Figure 2)。平滑肌细胞结合摄取氧化型极低密度脂蛋白的表观解离常数 K_d 为 48.82 mg/L, 最大结合容量 B_{max} 为 2 067 μ g/g 细胞蛋白, $r=0.85$, $P<0.05$ 。平滑肌细胞结合摄取正常极低密度脂蛋白的表观解离常数 K_d 为 37.70 mg/L, 最大结合容量 B_{max} 为 2 596 μ g/g 细胞蛋白。表明平滑肌细胞可通过受体途径摄取完整的氧化型极低密度脂蛋白, 但与结合摄取正常极低密度脂蛋白相比, 平滑肌细胞对氧化型极低密度脂蛋白的亲和力减小, 最大结合容量减小。

2.3 氧化型和正常极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白及乙酰化低密度脂蛋白与标记的氧化型极低密度脂蛋白的竞争结合

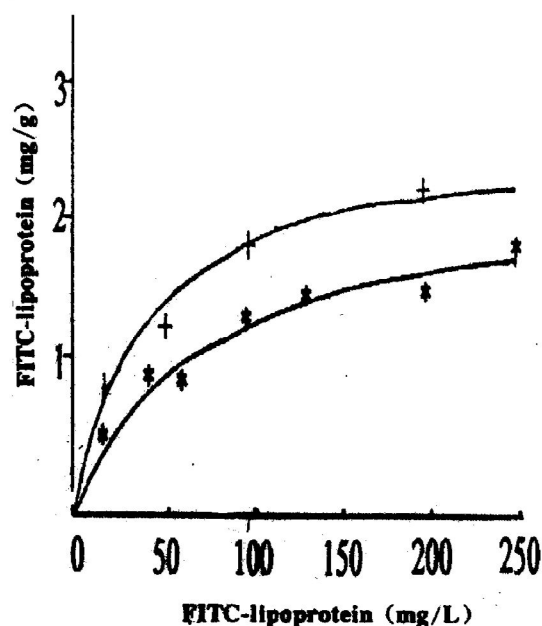


Figure 1. Binding uptake of human FITC-ox-VLDL or FITC-n-VLDL by porcine aortic SMCs. The cells were incubated at 37°C in RPMI 1640 containing indicated FITC-ox-VLDL or FITC-n-VLDL for 4 hours. Data shown are one of three experiments. Each point is the average of duplicate determinations. +: n-VLDL, *: ox-VLDL.

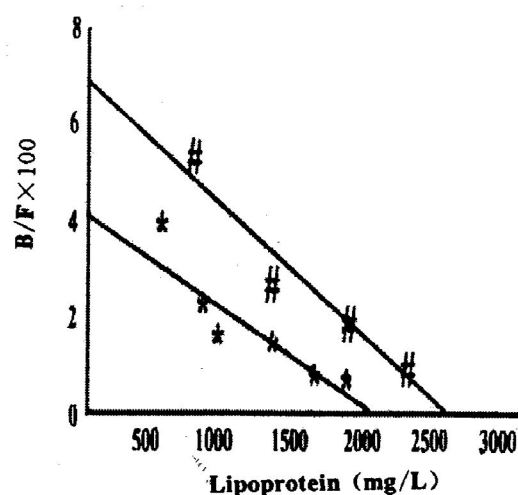


Figure 2. Scatchard plot for binding and uptake of human FITC-ox-VLDL or FITC-n-VLDL by porcine aortic SMCs. Experimental data from figure 1 are plotted. #: n-VLDL, *: ox-VLDL.

如图 3(Figure 3)所示, 随着培养基中非标记脂

蛋白浓度增加,氧化型极低密度脂蛋白和正常低密度脂蛋白均表现出竞争抑制作用,正常低密度脂蛋白竞争受体结合的能力与氧化型极低密度脂蛋白相似。另用 100 mg/L 正常极低密度脂蛋白竞争 FITC-氧化型极低密度脂蛋白与平滑肌细胞的结合,结果与氧化型极低密度脂蛋白相似,而用 100 mg/L 乙酰化 LDL(acetyl LDL, Ac-LDL)竞争 FITC-氧化型极低密度脂蛋白与平滑肌细胞的结合,抑制平滑肌细胞结合 FITC-氧化型极低密度脂蛋白不足 10%。

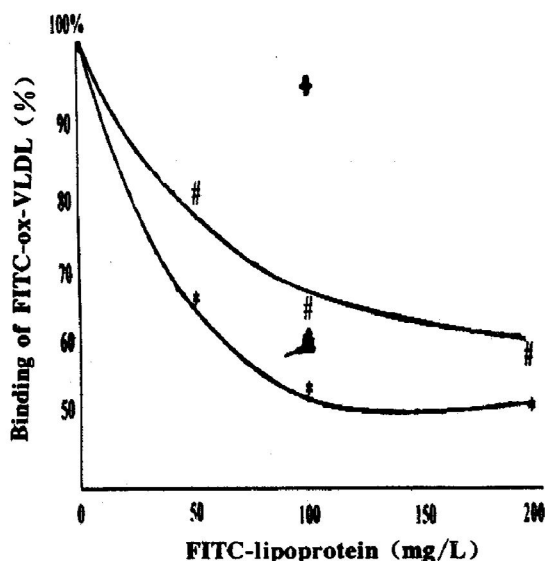


Figure 3. Competition of unlabeled human ox-VLDL (#), nLDL (*), n-VLDL (▲) and AcLDL (+) with homologous FITC-ox-VLDL for binding and uptake by porcine aortic SMCs. The cells were incubated at 37°C with 25 mg/L of FITC-ox-VLDL and increasing concentrations of unlabeled lipoproteins. Each point is the mean of duplicate determinations and representative of two experiments.

3 讨论

实验结果表明,ox-VLDL 和 n-VLDL 都能促使 SMC 细胞内脂类堆积,但 ox-VLDL 引起猪主动脉壁平滑肌细胞内脂类堆积作用不如 n-VLDL 强。SMC 可饱和性摄取 ox-VLDL。ox-VLDL, n-LDL, n-VLDL 竞争 ox-VLDL 与 SMC 结合的作用相似,而 Ac-LDL 的竞争作用很弱,提示 ox-VLDL 可能通过 LDL 受体

和/或 VLDL 受体途径进入 SMC,而清道夫受体基本上不起作用。

早在 1974 年,Bierman 等人发现 SMC 摄取 LDL 及 VLDL 为 HDL 的 10 倍,由此他们认为在 SMC 表面存在特异结合某种脂蛋白的受体,1983 年 Brown 和 Goldstein 等^[6]克隆了人 LDL 受体的 cDNA。但是由于 LDL 受体很快地下调,将 LDL 与 SMC 温育不能导致 SMC 中胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)的大量堆积。Ismail 等^[7]发现,损伤内皮合成的蛋白多糖与 LDL、中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL)或 VLDL 的复合物能加快 SMC 通过 LDL 受体途径结合和降解脂蛋白,导致脂类堆积。我们实验结果表明 ox-VLDL、n-LDL 竞争 ox-VLDL 与 SMC 结合的作用相似,提示 ox-VLDL 可能部分通过 LDL 受体进入 SMC。

Sakai 等^[8]从 THP-1 细胞 cDNA 库中克隆出了人 VLDL 受体 cDNA,它包含与 LDL 受体相似的 5 个功能结构域。在正常动、静脉及粥样斑块的內皮细胞和 SMC 中,存在有 VLDL 受体的表达^[9]。VLDL 受体识别脂蛋白中的载脂蛋白 E,但是 VLDL 受体的结合位点可能与 LDL 受体不同。尽管在 VLDL 受体基因中存在胆固醇调控元件样序列,但其基因的转录并不被胆固醇所下调。而我们实验结果表明 ox-VLDL、n-VLDL 竞争 ox-VLDL 与 SMC 结合的作用相似,提示 ox-VLDL 也可能部分通过接 VLDL 受体进入 SMC。

平滑肌细胞(SMC)表面是否存在清道夫受体,目前报道不一。文献[10]报道,SMC 表面存在 Ac-LDL 受体,但在生理条件下,其活性较低,只有在佛波酯或其他非佛波酯类蛋白激酶 C 激活剂的作用下,活性才会提高,但这时其活性也只有小鼠腹腔巨噬细胞中清道夫受体活性的 30%左右。但文献[11]报道:在 As 的任何一个阶段,As 斑块中的 SMC 都没有表达清道夫受体。我们实验表明 Ac-LDL 抑制 SMC 结合 ox-VLDL 不足 10%,说明清道夫受体基本不起作用。

因此,从 SMC 表面受体分布情况及实验结果,我们推测,与 ox-VLDL 通过清道夫受体进入 MP 不同,ox-VLDL 有可能通过 LDL 受体和/或 VLDL 受体进入 SMC,引起 SMC 脂类堆积。因此,由于 n-VLDL 被氧化后其载脂蛋白 B100 被降解而含量下降,故 ox-VLDL 与 n-VLDL 相比,与受体的亲和力下降,表现为 SMC 结合摄取 ox-VLDL 的 K_d 值升高, B_{max} 值减小,因而使其致 SMC 脂类堆积作用减弱。

参考文献

- 1 王式平,王延风,冯宗忱,等. 兔主动脉平滑肌细胞摄取 nVLDL 的受体途径. 生物化学与生物物理学报, 1992, 24(5): 399.
- 2 赖样进,冯宗忱,王式平,等. 氧化修饰极低密度脂蛋白增强其致动脉粥样硬化作用. 生物化学杂志, 1994, 10(3): 350.
- 3 邓仲端,邱红明,瞿智玲,等. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. 中华病理学杂志, 1993, 22(3): 163.
- 4 王淳本,宗义强,吴万生,等. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白. 同济医科大学学报, 1995, 24(3): 169.
- 5 Takata K, Horiuchi S, Rahim AT, et al. Receptor-mediated internalization of high density lipoprotein by rat sinusoidal liver cells: identification of a nonlysosomal endocytic pathway by fluorescence-labeled ligand. *J Lipid Res*, 1988, 29(9): 1 117.
- 6 Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*, 1983, 52: 223.
- 7 Ismail NA, Alavi MZ, Moore S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1994, 105(1): 79.
- 8 Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, et al. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, 1994, 269(3): 2 173.
- 9 Nakazato K, Ishibashi T, Shindo J, et al. Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in rabbit atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1996, 149(6): 1 831~838.
- 10 Pitas RE. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells: Up-regulation by phorbol esters. *J Biol Chem*, 1990, 265(21): 12 722.
- 11 Luoma J, Hiltunen T, Sarkioja T, et al. Expression of alpha 2 macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 2 014.

(此文 1998-06-26 收到, 1998-11-14 修回)

(此文编辑: 朱雯霞)