

氧化型低密度脂蛋白和维生素 E 对人脐静脉内皮细胞产生一氧化氮及合酶的影响

严金川^① 刘乃丰 陈日新

南京铁道医学院附属医院心内科, 南京 210009)

主题词 脂蛋白, 低密度; 氧化剂; 抗氧化剂; 脐静脉; 内皮细胞; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 维生素 E

摘要 为研究氧化型低密度脂蛋白和维生素 E 对人脐静脉内皮细胞产生一氧化氮及合酶的影响, 应用一氧化氮及一氧化氮合酶试剂盒测定培养的人脐静脉内皮细胞一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白能显著抑制培养的内皮细胞一氧化氮的产生, 从对照组的 126 ± 24 mmol/g 下降为 41 ± 8 mmol/g; 并能明显降低一氧化氮合酶的活性, 具有浓度和时间效应。抗氧化剂维生素 E 显著增加氧化型低密度脂蛋白刺激内皮细胞产生一氧化氮含量以及一氧化氮合酶活性。提示氧化型低密度脂蛋白可以通过抑制内皮细胞一氧化氮合酶的活性而抑制其产生一氧化氮。维生素 E 通过增加一氧化氮合酶活性而增加内皮细胞产生一氧化氮。

Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and Vitamin E on Nitric Oxide Production and Nitric Oxide Synthase Activity in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

YAN Jin-Chuan, LIU Nai-Feng and CHEN Ri-Xin

Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Nanjing Rail Medical College, Nanjing 210009, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Oxidants; Antioxidants; Umbilical Veins; Endothelial Cells; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Vitamin E

ABSTRACT **Aim** To study the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and antioxidant vitamin E (Vit E) on nitric oxide (NO) production and nitric oxide synthase (NOS) in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods** The level of NO and NOS activity were measured by NO and NOS kits in hUVEC. **Results** ox-LDL significantly decrease NO production from 126 ± 24 mmol/g to 41 ± 8 mmol/g and the activity of NOS in a dose- and time-dependent manners in hUVEC. Vit E can markedly increased ox-LDL-induced NO production and the activity of NOS in hUVEC. **Conclusion** ox-LDL can markedly attenuate the NO synthesis, the possible mechanism of this effect was attributed to the decrease of NOS activity. Vita min E can elevated the production of NO via increasing the NOS activity.

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是血管内源性松弛因子的主要成份, 是一种新发现的细胞信使分子。它在维持血管张力、抑制血管平滑肌增殖及血小板粘附和积聚中起重要作用。内皮细胞的损害是心血管疾病, 特别是动脉粥样硬化关键致病环节^[1,2]。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在血管内皮功能紊乱中起重要作用, 抗氧化剂可以抑制 LDL 的氧化, 对内皮细胞起保护作用。本文旨在探讨 ox-LDL 和抗氧化剂对内皮细胞 NO 产生的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

新生儿脐带由附属医院产房提供, 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品, RPMI1640 培养基、II 型胶原酶、维生素 E 系美国 Sigma 公司产品, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 为北京军事医学科学院产品, 721 分光光度计为上海第三仪器厂产品。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

参照 Lorenzi 等^[3] 无菌条件下取健康新生儿脐带 25 ~ 30 cm, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 冲洗干净后, 灌入 0.1% II 型胶原酶 12 ~ 15 mL, 37℃ 孵育 15 min, 分离、调节细胞数在 3×10^8 / L, 用 RPMI1640 培养基 (含 20% 胎牛血清) 接种于 6 孔进口培养板, 2 ~ 3 d 后细胞铺满板底, 换液后即可用于实验, 内皮细胞鉴定采用 VIII 因子相关抗原免疫组织化学染色法。

^①现在镇江市第四人民医院心内科, 江苏省镇江市 212001

1.3 低密度脂蛋白分离和氧化型低密度脂蛋白的制备

以不连续密度梯度超速离心快速分离人血浆低密度脂蛋白(选用慢加速程序,加速、减速各 45 min, 5 000 g, 匀速 90 min), 将低密度脂蛋白与 PBS 4℃ 透析 24 h, 按 Steinbrecher 等^[4]方法进行氧化修饰, Cu^{2+} 的终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 37℃ 孵育。

1.4 实验分组

实验分为 4 大组 16 小组进行, 第一大组为对照组, 内皮细胞培养基中不加 ox-LDL。第二大组为 ox-LDL 组, 培养基中分别加入不同浓度的 ox-LDL (50、100 和 200 mg/L) 作用 24 h, 以及同一浓度 ox-LDL (100 mg/L) 作用不同时间 (6、12、24 和 48 h)。第三大组为维生素 E 组, 培养基中分别加入不同浓度的维生素 E (50 和 100 mg/L) 作用 24 h, 以及同一浓度维生素 E (100 mg/L) 作用不同时间 (6、12、24 和 48 h)。第四大组为维生素 E 加 ox-LDL 组, 实验前 4 h 在培养基中加入 100 mg/L 的维生素 E, 然后加入不同浓度的 ox-LDL (50、100 和 200 mg/L) 作用 24 h。

1.5 内皮细胞产生一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性的测定

亚硝酸/硝酸根离子 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) 为 NO 的稳定代谢产物, 已被证实为指示 NO 产生水平的优良指标, 分别收集各组培养基, 测定方法按照 NO 试剂盒说明书(北京军事医学科学院生产)操作。用 Griess 法测定, 标本与 Griess 试剂 [1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 2.5% 磷酸] 反应, 721 分光光度计检测, 从亚硝酸钠标准曲线上换算 NO 值。以 mmol/g 表示。NOS 活性测定原理是, NOS 催化 L-精氨酸和分子氧反应形成 NO, NO 与亲合性物质生成有色化合物, 在 530 nm 波长下测定吸光度, 代表细胞 NOS 活性。细胞破碎采用超声波法裂解, 蛋白定量采用 Lowry 法定量。

酶活性定义为每克组织蛋白中生成 1 μmol NO 为一个活性单位。计算公式为:

$$\text{NOS 活性} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{显色物纳摩尔消光系数}} \times \frac{\text{反应液总体积}}{\text{取液量}} \times \frac{1}{\text{比色光径} \times \text{时间}} \div \text{样品蛋白质含量}$$

注: 显色物纳摩尔消光系数为 38.3×10^6

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用小样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

分别用不同浓度 ox-LDL (50、100 和 200 mg/L) 作用内皮细胞 24 h 后, 测其 NO 含量和 NOS 活性变化。测定结果如表 1 (Table 1) 所示, 可见随着 ox-LDL 浓度增加, 内皮细胞产生 NO 量逐渐减少, 其 NOS 活性逐渐减弱, 具有浓度依赖效应。

表 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

Table 1. Effect of different concentrations (mg/L) of ox-LDL on NO levels and NOS activity in hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	NO (mol/g protein)	NOS (10^3 u/g protein)
Control	126 \pm 24	104 \pm 14
50	86 \pm 16 ^a	76 \pm 11 ^a
100	62 \pm 11 ^a	57 \pm 8 ^a
200	41 \pm 8 ^b	36 \pm 7 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group

2.2 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

用同一浓度的 ox-LDL (100 mg/L) 分别作用内皮细胞不同时间 (6、12、24 和 48 h) 后, 测其 NO 含量和 NOS 活性。测定结果如表 2 (Table 2) 所示, 可见随着 ox-LDL 作用时间延长, 内皮细胞产生 NO 的量逐渐减少, 其 NOS 活性也逐渐减弱, 具有时间依赖效应。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

Table 2. Effect of ox-LDL treated with different time on NO levels and NOS activity in hUVEC ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	NO (mol/g protein)	NOS (10^3 u/g protein)
Control	126 \pm 24	104 \pm 14
6 h	104 \pm 20 ^a	92 \pm 16 ^a
12 h	80 \pm 14 ^a	74 \pm 11 ^a
24 h	62 \pm 11 ^b	57 \pm 8 ^b
48 h	38 \pm 9 ^b	32 \pm 6 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group

2.3 维生素 E 对氧化型低密度脂蛋白抑制内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

实验前 4 h 在培养基中加入 100 mg/L 的维生素 E, 然后加入不同浓度的 ox-LDL 50、100 和 200 mg/L 作用 24 h。结果发现, 维生素 E 组内皮细胞产生 NO 量与未加维生素 E 相比明显升高 (图 1, Figure 1), NOS 活性也随之增强 (图 2, Figure 2)。

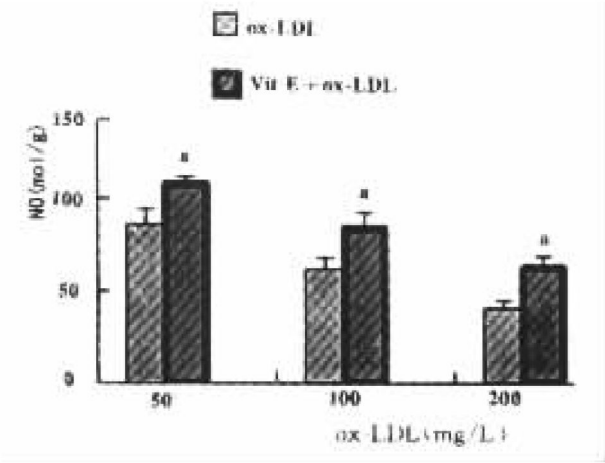


图 1. 维生素 E 对氧化型低密度脂蛋白抑制内皮细胞产生一氧化氮的影响

Figure 1. The effect of Vitamin E on NO levels in ox-LDL-stimulated hUVEC. a: $P < 0.05$, compared with ox-LDL group

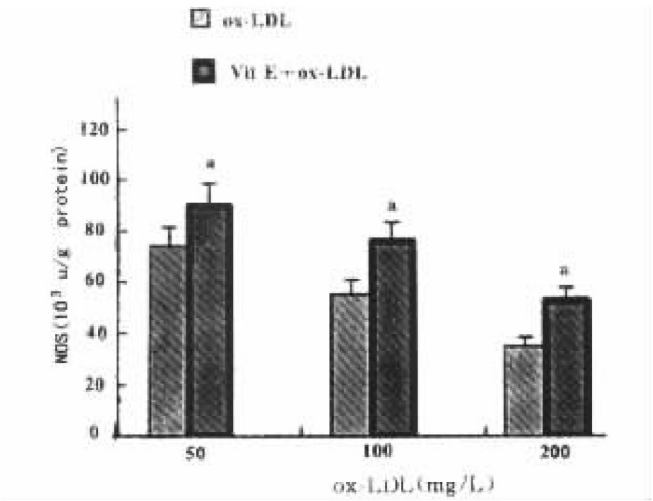


图 2. 维生素 E 对氧化型低密度脂蛋白抑制内皮细胞一氧化氮合酶活性的影响

Figure 2. The effect of Vitamin E on NOS activity in ox-LDL-stimulated hUVEC. a: $P < 0.05$, compared with ox-LDL group

2.4 抗氧化剂维生素 E 对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

分别用不同浓度维生素 E 50 mg/L 和 100 mg/L 作用内皮细胞 24 h 后, 和用同一浓度维生素 E (100 mg/L) 分别作用内皮细胞不同时间 (6、12、24、48 h) 后, 测其 NO 含量和 NOS 活性。测量的结果见表 3 (Table 3) 和表 4 (Table 4), 发现随维生素 E 浓度

增加和作用时间延长, 内皮细胞产生 NO 和 NOS 活性无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 3. 不同浓度维生素 E 对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

Table 3. Effect of different concentrations (mg/L) of Vit E on NO levels and NOS activity in hUVEC. ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	NO (mol/g protein)	NOS (10 ³ u/g protein)
Control	126 ± 24	104 ± 14
50	124 ± 18 ^a	102 ± 17 ^a
100	120 ± 23 ^a	110 ± 14 ^a

a: $P > 0.05$, compared with control group

表 4. 不同作用时间维生素 E 对内皮细胞产生一氧化氮及一氧化氮合酶活性的影响

Table 4. Effect of Vit E treated with different time on NO levels and NOS activity in hUVEC. ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Groups	NO (mol/g protein)	NOS (10 ³ u/g protein)
Control	126 ± 24	104 ± 14
6 h	121 ± 13 ^a	108 ± 12 ^a
12 h	123 ± 17 ^a	102 ± 15 ^a
24 h	126 ± 20 ^a	110 ± 13 ^a
48 h	122 ± 16 ^a	103 ± 18 ^a

a: $P > 0.05$, compared with control group

3 讨论

近年来, 随着 NO 生理功能及生物学性质的进一步阐明^[5], 发现 NO 在很多研究领域产生重大影响; 在病理条件下如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等都有血管壁受损, 表现为 NO 的储备或/和基础 NO 减少。众多临床和实验研究表明, 血浆 LDL 与一氧化氮介导的血管扩张作用呈现负相关^[6]。内皮功能损伤与机体和局部组织抗氧化能力降低和/或自由基产生增多有关, 氧化型低密度脂蛋白在内皮细胞损伤中占重要地位。可以使培养的人脐静脉内皮细胞的抗氧化酶活性下降, 而脂质过氧化物含量增加。我们观察氧化型低密度脂蛋白及抗氧化剂维生素 E 对体外培养的人脐静脉内皮细胞产生 NO 及其合酶活性的影响。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白能明显抑制内皮细胞产生 NO, 具有浓度和时间依赖性; 进一步研究发现, 其 NOS 活性也随氧化型低密度脂蛋白浓度增加及作用时间延长而逐渐降低, 因此, 我们认为氧化型低密度脂蛋

白对内皮细胞产生 NO 的抑制作用是通过降低其 NOS 活性而起作用。这与 Mitchell 等^[7]报道 LDL 通过降低 NOS 活性而抑制 NO 的释放相一致。而且,陈临溪等^[8]发现血管转换酶抑制剂能促进 NOS 的活性而使氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞产生 NO 的抑制作用减轻。Phohl 等^[9]报道氧化型低密度脂蛋白可以破坏内皮细胞受体信号的传递,特别是影响胞浆释放游离钙和一氧化氮依赖性的 cGMP 产生。而钙离子可以快速激活 eNOS 活性,胞内钙离子浓度下降导致 eNOS 活性减弱。另外,Ohara 等^[10]研究发现氧化型低密度脂蛋白能使体内氧自由基生成增多,从而影响内皮细胞 NOS 的活性。因此,我们推测这可能是本实验中氧化型低密度脂蛋白导致内皮细胞 NOS 活性降低的两个重要机制,进一步研究有待深入。有学者研究发现,动脉粥样硬化患者心脑血管壁 NO 的基础和刺激释放量下降,As 斑块中 NOS 活性及其基因表达量下降^[11]。氧化型低密度脂蛋白抑制内皮细胞合成 NO,可能是动脉粥样硬化发病的一个重要机制。众多研究表明,一些病理条件如高血糖、高血压等不仅内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞产生 NO 及其 NOS 活性减弱,而且 NOS 在其基因表达水平亦有明显改变^[12]。尽管我们未做 NOS 的基因表达,但从 NOS 活性被抑制情况来看,氧化型低密度脂蛋白确实对人脐静脉内皮细胞具有危害作用,这对进一步探讨动脉粥样硬化发病机制起重要指导意义。抗氧化剂维生素 E 具有保护内皮细胞的功能,降低氧化型低密度脂蛋白的损害作用,本实验中应用预先加入维生素 E 与内皮细胞共同孵育 4 h 后,然后加入氧化型低密度脂蛋白干预,结果显示:维生素 E 组内皮细胞产生 NO 能力明显增加,其 NOS 活性也显著提高。然而,单用维生素 E 刺激内皮细胞并不增加其 NO 含量和 NOS 活性,说明维生素 E 在氧化型低密度脂蛋白干预内皮细胞时可能通过清除氧自由基而起作用,使 NOS 活性增强,其确切机制有待进一步深入。因此,本研究对进一步

探讨抗氧化剂与内皮细胞功能有着重要意义。

参考文献

- 1 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, **43**: 109 – 112
- 2 Pohl V, Wagner K, Dewit C. Endothelium – derived nitric oxide in control of tissue perfusion and implications. *Eur Heart J*, 1993, **14** (Suppl 1): 93 – 98
- 3 Lorenzi M, Cadliero E, Markey B, et al. Interaction of human endothelial cells with elevated glucose concentrations and native and glycosylated low -density lipoprotein. *Diabetologia*, 1984, **26**: 218 – 220
- 4 Steinbrecher UPS, Parthasarathy DS, Lenke JL, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3 883 – 887
- 5 Fleelisch M, Tepoel M, Zamora R, et al. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature*, 1994, **386**: 62
- 6 Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B. Endothelium mediated coronary blood flow modulation in humans effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 652 – 658
- 7 Mitchell JA, Warner TD, Huang ZJ, et al. Native LDL inhibits the release of endothelial derived relaxing factor by reducing the activity of endothelial nitric oxide synthase. *J Vasc Res*, 1992, **29**: 169 – 172
- 8 陈临溪, 余 麟, 廖瑞芳, 等. 拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (1): 18 – 21
- 9 Phohl U, Heydari N, Galle J. Effects of LDL on intracellular free calcium and nitric oxide-dependent cGMP formation in porcine endothelial cells. *Atherosclerosis*, 1995, **117**: 169 – 173
- 10 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Oxidized low density lipoprotein increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 2 543 – 551
- 11 宋良文, 王雪涛, 张秉钧, 等. 内皮素和一氧化氮合酶在家兔动脉粥样硬化斑块中的表达. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2** (1): 18 – 22
- 12 刘尚喜, 陈 媛. 氧化修饰低密度脂蛋白对巨噬细胞一氧化氮合酶基因表达的影响. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24** (2): 140 – 143

此文 1998 – 09 – 08 收到, 1999 – 02 – 01 修回)

此文编辑 胡必利)