

# 富含胆固醇的脂蛋白对兔主动脉平滑肌 细胞脂类堆积的影响及机制

从 容 冯友梅 宗义强 王淳本 瞿智玲 邓耀祖

(同济医科大学生物化学教研室, 武汉 430030)

**主题词** 脂蛋白, 低密度; 肌, 平滑, 血管; 受体; 乳铁蛋白; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化; 兔

**摘 要** 为了观察富含胆固醇的脂蛋白对兔主动脉平滑肌细胞脂类堆积的影响及机制, 用富含胆固醇的脂蛋白( $\beta$ - 极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白)与兔主动脉平滑肌细胞温育 48 h 后, 发现  $\beta$ - 极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白都能促进平滑肌细胞内总胆固醇和甘油三酯堆积, 以  $\beta$ - 极低密度脂蛋白的作用更显著。乳铁蛋白作为低密度脂蛋白受体相关蛋白的一种特异配体, 当它与上述脂蛋白共同与平滑肌细胞温育后, 发现乳铁蛋白对脂蛋白所致的平滑肌细胞内脂质堆积有抑制作用。乳铁蛋白与标记的  $\beta$ - 极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白的竞争结合实验也进一步发现乳铁蛋白可明显竞争  $\beta$ - 极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白与平滑肌细胞的结合, 且对  $\beta$ - 极低密度脂蛋白的竞争抑制作用尤为明显。提示  $\beta$ - 极低密度脂蛋白、正常低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白可能主要通过低密度脂蛋白受体相关蛋白介导进入平滑肌细胞, 导致平滑肌细胞内脂质堆积。

## The Effects of Cholesterol- Rich Lipoproteins on Lipid Accumulation in Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells and its Mechanism

CONG Rong, FENG You- Mei, ZONG Yi- Qiang, WANG Chun- Ben, QU Zhi- Ling and DENG Yao- Zu

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

**MeSH** Lipoproteins, LDL; Muscle, Smooth, Vascular; Receptor; Lactoferrin; Foam Cells; Atherosclerosis; Rabbits

**ABSTRACT** **Aim** To observe the effects of cholesterol- rich lipoproteins [ $\beta$ - very low density lipoprotein ( $\beta$ - VLDL), normal low density lipoprotein (n- LDL) and oxidized low density lipoprotein(ox- LDL)] on lipid accumulation in smooth muscle cells (SMCs) and to explore its mechanism. **Methods**  $\beta$ - VLDL, n- LDL or ox- LDL was incubated with rabbit aortic SMCs for 48 hours, total cholesterol (TC) and triglyceride(TG) of the cells were extracted and determined. The increasing concentrations of lactoferrin (specific ligand of LDL receptor- related protein, LRP) were added with  $\beta$ - VLDL, n- LDL or ox- LDL, respectively, in the culture and TC and TG of the SMCs were determined as above. SMCs were incubated at 4°C in M199 containing different concentrations of unlabeled lactoferrin and FITC-  $\beta$ - VLDL, FITC- n- LDL or FITC- ox- LDL, respectively, for 4 hours. The cell surface bound lipoproteins were determined by fluorospectrometry. **Results**  $\beta$ - VLDL, n- LDL and ox- LDL can all increase TC and TG accumulation in SMCs. More TC and TG were accumulated with  $\beta$ - VLDL as compared with n- LDL or ox- LDL. The effects can be inhibited by lactoferrin. Moreover, lactoferrin competed with FITC-  $\beta$ - VLDL, FITC- n- LDL or FITC- ox- LDL on binding to SMCs. **Conclusion**  $\beta$ - VLDL, n- LDL and ox- LDL may contribute to lipid accumulation in SMCs by LRP mediated pathway.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)特征之一是粥样斑块中存在富含脂类的泡沫细胞。细胞化学和超微结构分析证实至少部分泡沫细胞是由平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)转变形成<sup>[1]</sup>。近年来研究表明, SMC 通过受体途径摄取脂蛋白可能是导致其细胞脂类堆积的主要途径之一。迄今已知 SMC 上的脂蛋白受体主要是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)。

LDL 受体可特异性地结合摄取 LDL、 $\beta$ - 极低密度脂蛋白( $\beta$ - very low density lipoprotein,  $\beta$ - VLDL)、乳糜微粒(chylomicron, CM)残粒及极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)残粒, 但当细胞内游离胆固醇增多时可反馈下调 LDL 受体的表达<sup>[1]</sup>, 从而防止胆固醇的进一步堆积。LRP 是一种多功能的细胞表面受体, 可摄取  $\beta$ - VLDL、nr-LDL 和 ox-LDL 等脂蛋白<sup>[2,3]</sup>, 且不受细胞内胆固醇的下调, 反而受其上调。为了解 SMC 是否主要通过 LRP 摄取上述脂蛋白而致泡沫细胞形成, 本文观察了  $\beta$ - VLDL、nr-LDL 及 ox-LDL 对 SMC 脂类堆积的影响, 并初步探讨了 LRP

在 SMC 结合、摄取脂蛋白中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 正常兔主动脉平滑肌细胞的培养

用贴块法培养 SMC<sup>[4]</sup>。

### 1.2 脂蛋白的制备

在加抗氧化剂条件下用密度梯度超离心法<sup>[5]</sup>从正常人血浆中分离得 nrLDL, 从高胆固醇血症兔血浆中分离得  $\beta$ -VLDL。nrLDL 中加入  $\text{Cu}^{2+}$  (终末浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ ) 在室温反应 24 h, 即得 ox-LDL, 其硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, 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[6]稍加改进, Sephadex G-25 过柱分离得标记脂蛋白。

### 1.4 总胆固醇及甘油三酯含量测定

总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量测定按试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司) 操作。细胞内脂类用 Folch 法抽提, 提取液蒸干后用上述试剂盒测定 TC、TG 含量。

### 1.5 乳铁蛋白 (Lactoferrin) 和脂蛋白与平滑肌细胞

## 结合的竞争试验

将一定量的标记脂蛋白和不同量的未标记乳铁蛋白 (LRP 的特异配体) 加入 SMC 中, 以无细胞组为非特异性吸附对照。4℃温育 4 h 后, 用含 0.2% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 和不含 BSA 的 PBS 各洗细胞 3 次, 加 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞, 测定裂解液的荧光强度 (激发光波长 497 nm, 发射光波长 516 nm) 和细胞蛋白含量 (Lowry 法测定), 扣除非特异性结合量, 计算细胞结合标记脂蛋白量。以无未标记乳铁蛋白组的细胞结合量为 100%, 计算乳铁蛋白竞争抑制 SMC 结合标记脂蛋白的百分率。

## 2 结果

### 2.1 各类脂蛋白对总胆固醇含量的影响

以不同浓度的  $\beta$ -VLDL、nr-LDL 和 ox-LDL 与 SMC 温育 48 h 后, 细胞内 TC 随脂蛋白浓度的增加而增加 (表 1, Table 1)。结果发现, 三种脂蛋白均可促进 SMC 内 TC 积聚, 尤以  $\beta$ -VLDL 的作用更强 ( $P < 0.01$ )。

表 1. 各类脂蛋白对平滑肌细胞内总胆固醇含量的影响

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

Lipoprotein (content mg prot/L medium)	Control (a)	$\beta$ -VLDL (b)	b/a	nr-LDL (c)	c/a	ox-VLDL (d)	d/a
30		54.55 $\pm$ 8.08 <sup>a</sup>	2.68	30.21 $\pm$ 2.95 <sup>b</sup>	1.48	24.87 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>	1.22
60	20.37 $\pm$ 2.64	65.91 $\pm$ 10.73 <sup>a</sup>	3.24	33.07 $\pm$ 1.76 <sup>b</sup>	1.62	28.98 $\pm$ 3.35 <sup>b</sup>	1.42
90		74.72 $\pm$ 14.26 <sup>a</sup>	3.67	40.18 $\pm$ 3.47 <sup>b</sup>	1.97	38.11 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup>	1.87

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

### 2.2 各类脂蛋白对细胞内甘油三酯含量的影响

图 1 (Figure 1) 表示不同浓度脂蛋白与 SMC 在 37℃温育 48 h 后的细胞内 TG 含量。与对照组比较, 三组脂蛋白均可导致细胞内 TG 含量增加 ( $P < 0.05$ ), 且随培养基中脂蛋白浓度的增加而增加。而三组脂蛋白之间进行比较, 它们对 SMC 内 TG 的堆积也是以  $\beta$ -VLDL 的作用更显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 乳铁蛋白对脂蛋白引起的平滑肌细胞内脂类堆积的影响

以不同浓度的乳铁蛋白 (LRP 的特异配体) 0~160 mg/L 和固定浓度的  $\beta$ -VLDL、nr-LDL 和 ox-LDL (30 mg/L) 分别共同与 SMC 温育 37℃, 48 h 后, 结果表明: 随着培养基中乳铁蛋白浓度的增加, 脂蛋白对 SMC 内 TG、TC 的堆积作用逐渐降低, 这表明乳铁蛋

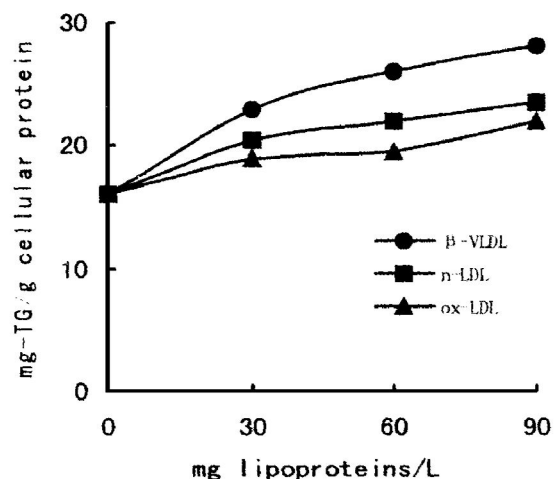


图 1. 不同浓度脂蛋白对平滑肌细胞甘油三酯浓度的影响  
Figure 1. Effects of increasing concentrations of  $\beta$ -VLDL, nr-LDL or ox-LDL on TG content in SMC

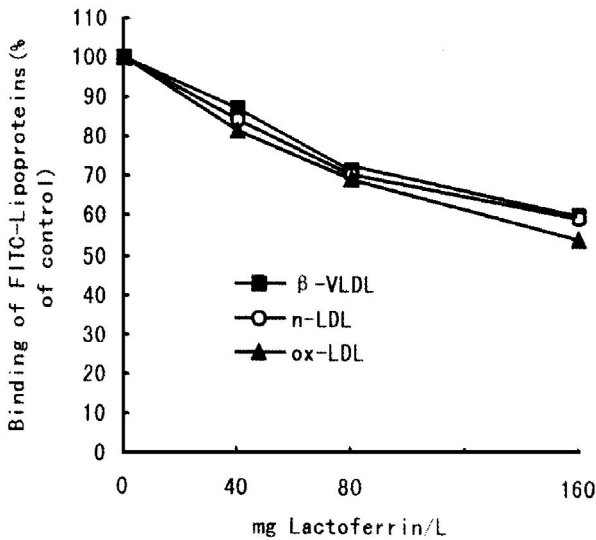


图 2. 乳铁蛋白对脂蛋白所致的平滑肌细胞内的总胆固醇堆积的抑制作用

Figure 2. Inhibition of increasing concentrations of Lactoferrin on accumulation of TC in SMC exposed to β-VLDL, n-LDL or ox-LDL

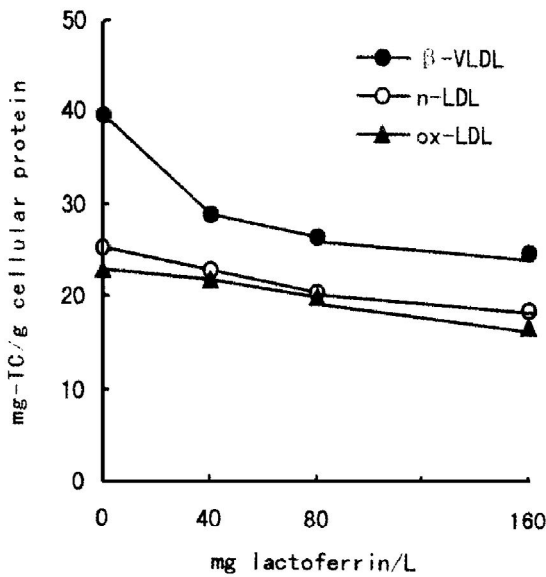


图 3. 乳铁蛋白对脂蛋白引起的平滑肌细胞内甘油三酯堆积的抑制作用

Figure 3. Inhibition of increasing concentrations of Lactoferrin on accumulation of TG in SMC exposed to β-VLDL, n-LDL or ox-LDL

白对脂蛋白进入 SMC 有竞争抑制作用(图 2 和 3, Figure 2, 3)。

#### 2.4 乳铁蛋白与荧光素异硫氰酸酯标记的脂蛋白的竞争结合

用不同浓度的非标记乳铁蛋白与同一浓度的 FITC-β-VLDL、FITC-n-LDL 和 FITC-ox-LDL 竞争结合 (0~160 mg/L), 观察 SMC 结合 FITC-脂蛋白的量的变化(图 4, Figure 4)。结果表明, 随着培养液中非

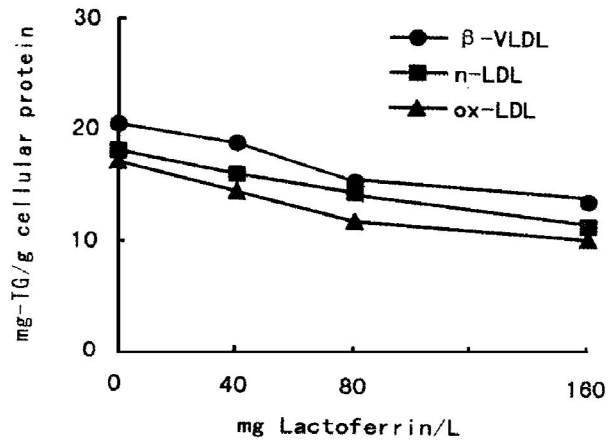


图 4. 乳铁蛋白与 FITC 标记的脂蛋白的竞争结合

Figure 4. Competition of unlabeled Lactoferrin with FITC-β-VLDL, FITC-n-LDL, FITC-ox-LDL for binding by rabbit aortic SMC

标记乳铁蛋白浓度增加, Lactoferrin 对 FITC-β-VLDL、FITC-n-LDL、FITC-ox-LDL 与 SMC 的结合均表现出较明显的竞争抑制作用。由此推断, SMC 可通过 LRP 结合 β-VLDL、n-LDL 及 ox-LDL, 进而摄取其中脂质。

### 3 讨论

我们的实验结果表明, β-VLDL、n-LDL、ox-LDL 都能促进 SMC 内 TC、TG 堆积, 尤以 β-VLDL 的作用更显著。乳铁蛋白作为 LRP 的一种特异配体, 当它和上述脂蛋白共同与 SMC 温育后, 发现乳铁蛋白对脂蛋白所致的 SMC 内脂质堆积有抑制作用。乳铁蛋白与标记的 β-VLDL、n-LDL、ox-LDL 的竞争结合实验也进一步发现 Lactoferrin 可明显竞争 β-VLDL、n-LDL、ox-LDL 与 SMC 的结合, 且对 β-VLDL 的竞争抑制作用尤为明显。故我们推测 SMC 可能主要通过 LRP 介导摄取 β-VLDL、n-LDL 及 ox-LDL。

迄今为止, SMC 表面已肯定的脂蛋白受体是 LDL 受体和 LRP。LDL 受体虽可特异性摄取 LDL、β-VLDL、CM 残粒等脂蛋白, 但是由于 LDL 受体很快地受细胞内胆固醇增高而下调, 故而防止了细胞无限地摄取脂蛋白<sup>[1]</sup>。LRP 是 LDL 受体家族中新发现的一种, 研究发现肝细胞表面的 LRP 具有清除富含载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 的脂蛋白残粒 (类似于 β-VLDL) 的功能<sup>[7]</sup>。巨噬细胞表面的 LRP 可特异的、可饱和的、高亲和力的结合 n-LDL<sup>[3]</sup>。另外 LRP 也可结合 ox-LDL。且 LRP 不受细胞内胆固醇的下调, 反而受其上调。因此我们认为, 尽管 SMC 上有 LDL 受体和 LRP 表达, 但在 SMC 过量摄取脂蛋白脂质形成泡沫细胞的过程中起关键作用的受体可能是 LRP, 因 LRP 受胆固醇的上调, 故细胞可通过

LRP 无限制摄取脂蛋白, 导致 SMC 内脂质堆积。 $\beta$ -VLDL 由于富含胆固醇和载脂蛋白 E, 故它所造成的 SMC 内脂质堆积作用较  $\text{nr}$ -LDL、 $\text{ox}$ -LDL 更显著。

另据文献报道, 在人 As 病变周围的正常 SMC 有 LDL 受体和 LRP 表达, 但在病变部位的 SMC 上则无 LDL 受体表达, 而 LRP 表达增强<sup>[8]</sup>。我们的实验也证实了 LRP 在 SMC 摄取  $\beta$ -VLDL、 $\text{nr}$ -LDL、 $\text{ox}$ -LDL 导致 SMC 内脂质堆积中所起的关键作用, 由此我们推测 LRP 可能是 SMC 摄取脂蛋白(尤其是脂蛋白残粒)转变为泡沫细胞的主要受体, 这对阐明 As 病变中 SMC 来源的泡沫细胞的形成机制, 为 As 的防治提供了重要的理论基础。

#### 参考文献

- 1 Jaakkola Q, Kallioniemi O P, Nikkari T. Lipoprotein uptake in primary cell cultures of rabbit atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1988, **69**: 257- 268
- 2 K•uchenhoff A, B? rbel H R, Robenek H. Interaction of ApoE-containing lipoproteins with the LDL receptor- related protein (LRP). *Am J Physiol*, 1997, **272**: C369- C382
- 3 Wu SM, Pizzo SV. Low density lipoprotein receptor- related protein/ (2- macroglobulin receptor on murine peritoneal macrophages mediates the binding and catabolism of low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **326** (1): 39- 47
- 4 朱阎宏, 邓仲端, 徐增绥, 等. 兔动脉平滑肌细胞培养产生单核细胞趋化因子的观察. *中华医学杂志*, 1991, **71**(9): 505- 508
- 5 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- 172
- 6 杨宇虹, 冯宗忱, 王淳本, 等. 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. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**(4): 305- 309
- 7 Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor- related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 601- 637
- 8 Lupu F, Heim D, Bachmann F, et al. Expression of LDL receptor- related protein/alpha 2- macroglobulin receptor in human normal and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**(9): 1 438- 444  
(此文 1999- 07- 28 收到, 1999- 11- 20 修回)  
(此文编辑 朱雯霞)