

氧化型低密度脂蛋白对培养的内皮细胞 一氧化氮合成和释放的影响

樊燕蓉 刘虹 薛龙增 卢是月 施蓉芬 姚汝琳

(海军医学高等专科学校, 南京 210099)

主题词 脂蛋白, 低密度; 氧化; 内皮细胞; 乳酸脱氢酶; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 动脉粥样硬化

摘要 为观察氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞一氧化氮生成的影响, 采用体外细胞培养方法将含不同浓度氧化型低密度脂蛋白的 DMEM 培养液(氧化型低密度脂蛋白终浓度分别为 0 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L), 与内皮细胞共同孵育(37℃、5% CO₂) 24 h 后, 分别测上清液中乳酸脱氢酶活性和一氧化氮含量及细胞中一氧化氮合酶活性, 并用细胞化学染色法记数各组细胞一氧化氮合酶阳性染色细胞数。结果发现, 随着培养液中氧化型低密度脂蛋白浓度升高, 上清液中乳酸脱氢酶活性增加和一氧化氮含量下降, 细胞中一氧化氮合酶活性和一氧化氮合酶阳性染色细胞数下降, 可见, 氧化型低密度脂蛋白可损伤血管内皮细胞, 降低细胞中一氧化氮合酶活性, 抑制一氧化氮产生, 这可能是氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的原因之一。

The Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Releasing Nitric Oxide from Cultured Endothelial Cells

FAN Yan- Rong, LIU Hong, XUE Long- Zeng, LU Shi- Yue, SHI Rong- Fen and YAO Ru- Lin

(Naval Medical College, Nanjing 210099, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Oxidized; Endothelial Cell; Lactate Dehydrogenase; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Atherosclerosis

ABSTRACT Aim This study was to seek the effect of oxidized low density lipoprotein(ox- LDL) on the activity of nitric oxide synthase (NOS) and releasing nitric oxide(NO) from culture endothelial cells in vitro. **Methods** The endothelial cells were exposed to different

doses of ox- LDL from 0 to 200 mg/L and incubated (37℃、5% CO₂) for 24 hours, and the activity of LDH and NO amounts in the supernatant and the activity of NOS in endothelial cells were measured, and NOS positive staining cells were stained using NADPH- diaphorase (NADPH- d) histochemical method. **Results** Ox- LDL could increase the activity of LDH and decrease the NO amounts in the supernatant, and the activity of NOS and numbers of NOS positive staining cell decrease in a dose effect manner. **Conclusion** All those

suggested that ox- LDL could directly damage endothelial cell, and decrease the activity of NOS of endothelial cell, and NO releasing from endothelial cell. This may be one of mechanisms that ox- LDL bring atherosclerosis.

近年来的基础研究表明, 一氧化氮(nitric oxide, NO)是由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)以左旋精氨酸(L- arg)和分子氧为底物形成, 它可以调节血管张力, 并通过环一磷酸鸟苷依赖性机制抑制平滑肌细胞的有丝分裂, 还可以抑制血小板粘附和聚集。最近的研究发现, 动脉粥样硬化斑块中 NOS 的活性和其基因表达的水平下降, 提示: 一氧化氮合成障碍可能参与了动脉粥样硬化的发生发展^[1]。众所周知, 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox- LDL)是导致动脉粥样硬化发生的重要因素, 内皮细胞损伤功能障碍是动脉粥样硬化的起始环节, 而氧化型低密度脂蛋白对内皮细

胞一氧化氮合成和释放的影响是目前人们关注的问题, 因此我们以 ox- LDL 作用于体外培养的内皮细胞, 观察它对内皮细胞 NO 生成的影响, 以期探讨 NO 在动脉粥样硬化发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 氧化型低密度脂蛋白的制备

人血浆 LDL($d = 1.023 \sim 1.063$ kg/L), 采用两次性密度梯度超速离心法制备, 收集的 LDL 于 4℃ PBS 中透析 48 h, 无 EDTA 的 LDL(1 g/L)置含 10 μmol/L Cu²⁺ 的 PBS 中, 37℃ 温育 4 h, 修饰后的 LDL 置含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 超滤除菌后 4℃ 保存, ox- LDL 的巴比妥酸反应物质为 6.842 μmol/g。

1.2 血管内皮细胞培养

牛血管内皮细胞以 $1 \times 10^8/L$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL。实验分为四组: 对照组 (即 DMEM 中未加任何物质) 和三个 ox-LDL 剂量组 (即培养基中 ox-LDL 终浓度分别为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L), 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后, 收集细胞及上清液。

1.3 生化指标测定

上清液中的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性采用 2,4-二硝基苯肼比色法, NO 含量采用硝酸还原酶法测定, 细胞中 NOS 活性测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒。

1.4 细胞中一氧化氮合酶染色

将内皮细胞以 $1 \times 10^8/L$ 接种于放有盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 实验分组同前, 培养 24 h 后, 收集盖玻片, 用 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 2% 多聚甲醛液中固定 30 min, 用 0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次, 加入孵育液 (含 1.2 mmol/L NADPH、0.5 mmol/L NBT、0.3% Triton X-100) 于 37°C 孵育 30 min, 以 0.01 mol/L PBS 终止反应, 置于载玻片上, 甘油明胶封片。显微镜下计数阳性细胞数, 每个玻片上间隔计数 3 个高倍视野, 并在倒置相差显微镜下拍片。

1.5 统计学分析

各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 t 检验和 t' 检验计算。

2 结果

2.1 细胞上清液中乳酸脱氢酶活性

由表 1 (Table 1) 可见, 随培养液中 ox-LDL 浓度增大, 细胞上清液中 LDH 活性增加, 细胞受损严重, 有剂量-效应关系。

表 1. 细胞上清液中乳酸脱氢酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. LDH release in endothelial cells supernate ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	LDH (u/L)
Control	6	62.22 \pm 17.10
Ox-LDL (50 mg/L)	6	130.38 \pm 21.61 ^a
Ox-LDL (100 mg/L)	6	174.31 \pm 25.60 ^{ab}
Ox-LDL (200 mg/L)	6	254.69 \pm 38.03 ^{acd}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (50 mg/L) group; d: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (100 mg/L) group

2.2 细胞上清液中一氧化氮含量

由表 2 (Table 2) 可见, 随培养液中 ox-LDL 浓

度增大, 细胞上清液中 NO 含量减少, 有剂量-效应关系。

表 2. 细胞上清液中一氧化氮含量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. NO level in endothelial cells supernate ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	NO (μmol/L)
Control	6	82.57 \pm 9.76
Ox-LDL (50mg/L)	6	28.63 \pm 4.12 ^a
Ox-LDL (100mg/L)	6	19.92 \pm 2.23 ^{ab}
Ox-LDL (200mg/L)	6	5.85 \pm 1.15 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (50 mg/L) group; c: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (100 mg/L) group

2.3 内皮细胞 NADPH- 心肌黄酶染色与细胞中一氧化氮合酶活性

在倒置相差显微镜下观察, 典型的一氧化氮合酶阳性细胞胞浆是深蓝色, 胞核不着色, 对照组阳性细胞较多 (见图 1a, Figure 1a), 随着 ox-LDL 剂量增高, 阳性细胞越来越少 (见图 1b、1c、1d, Figure 1b、1c、1d), 细胞中 NOS 活性测定也得到相同的结果 (见表 3, Table 3)。

表 3. 一氧化氮合酶阳性细胞数和细胞中一氧化氮合酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The activity of NOS and numbers of NOS positive staining cell ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

Groups	numbers of NOS positive staining cell	NOS (u/mg pro)
Control	79.3 \pm 6.5	26.367 \pm 2.25
Ox-LDL (50 mg/L)	50.5 \pm 10.3 ^a	15.829 \pm 2.54 ^a
Ox-LDL (100 mg/L)	35.3 \pm 8.3 ^{ab}	13.414 \pm 1.78 ^a
Ox-LDL (200 mg/L)	23.5 \pm 7.2 ^{abc}	5.072 \pm 4.11 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (50 mg/L) group; c: $P < 0.01$, compared with ox-LDL (100 mg/L) group

3 讨论

血管内皮细胞的损伤和功能改变是动脉粥样硬化发生的始动因素, 由于内皮损伤而继发引起脂质浸润、平滑肌细胞大量增殖形成动脉粥样硬化病变。研究显示: ox-LDL 在内皮细胞的损伤中占重要地位, 我们在实验中发现, 随 ox-LDL 剂量增大上清液 LDH 活性升高, 说明细胞受损严重, 这可能与 ox-LDL 中溶血卵磷脂毒性相关。

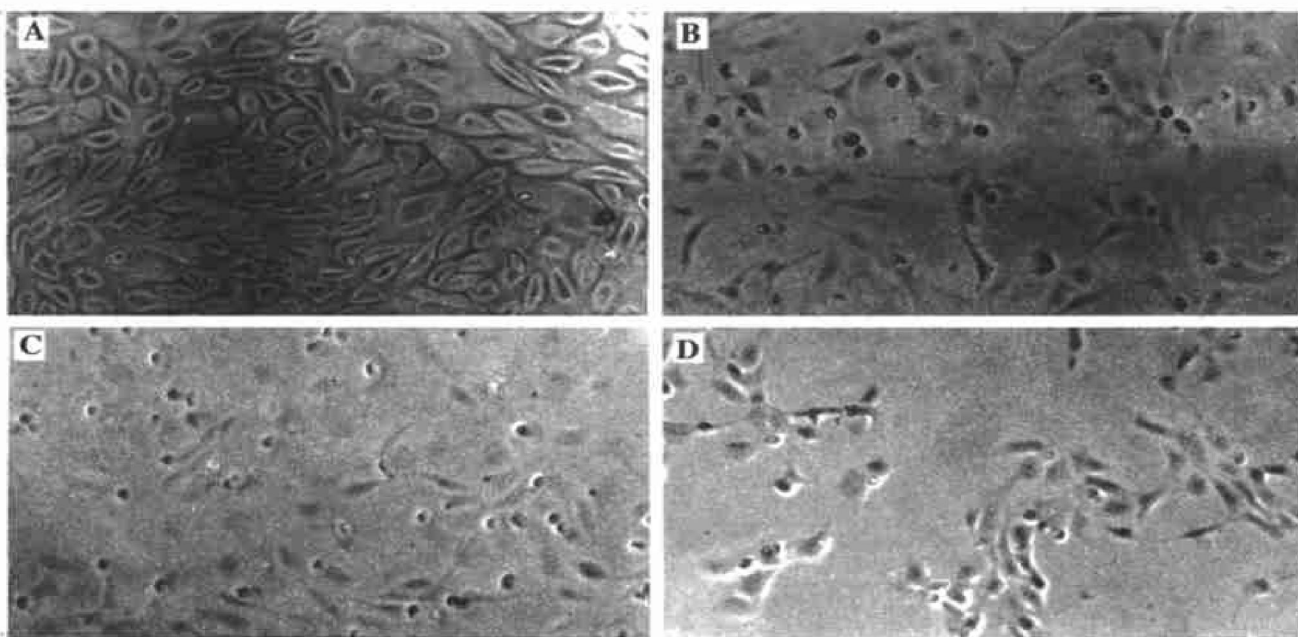


图 1. 内皮细胞 NADPH- 心肌黄酶染色照片.

Figure 1. Photo of endothelial cells using NADPH- diaphorase histochemical method. A: control group, B: ox- LDL (50 mg/L) group, C: ox- LDL (100 mg/L) group, D: ox- LDL (200 mg/L) group

近年来研究发现,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^[2],动脉粥样硬化斑块中 NOS 活性下降,在高胆固醇血症兔动脉壁 NOS mRNA 表达量下降, NOS 活力降低,血清中 NO 含量下降^[3]。动物实验中发现,长期补充 NO 前体物 L- 精氨酸可抑制动脉粥样硬化形成^[4],促进动脉粥样硬化病变消退^[5],而长期给予 NOS 抑制剂抑制内源性 NO 生成后,可明显促进动脉粥样硬化形成^[6]。说明 NOS/NO 生成不足与动脉粥样硬化发生有一定关系。

ox- LDL 作为一个强致动脉粥样硬化因子,不仅表现在它可直接损伤内皮细胞本身,而且可促进单核细胞粘附和趋化、促进血管平滑肌细胞增殖,而且近来发现,它对 NO 的合成和活性也有影响,与 ox- LDL 孵育的巨噬细胞受 γ - 干扰素和脂多糖刺激释放的 NO 减低^[7], ox- LDL 对缓激肽促使牛主动脉内皮细胞释放的 NO 活性有抑制作用,且随 ox- LDL 浓度的增高其抑制效应增强^[8], Galle 等用生物测定的方法证明 LDL 可直接灭活 NO,认为 NO 可能是在脂蛋白分子的疏水区中灭活,在我们的实验中, ox- LDL 可直接抑制血管内皮细胞释放 NO,其原因与 ox- LDL 直接抑制血管内皮细胞 NOS 活性相关。

综上所述,我们认为 ox- LDL 直接损伤血管内皮细胞,抑制细胞 NOS 活性,致 NO 合成和释放障碍,这些可能是导致动脉粥样硬化发生的一个原因。

参考文献

- 1 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
- 2 Chester AH, O'Neil GS, Moncada S, et al. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet*, 1990, 336: 897- 900
- 3 罗心平,李勇,范维琥,等. 高脂血症对兔动脉壁一氧化氮系统的影响及药物的干预效果. 中国心血管杂志, 1998, 3(2): 73- 76
- 4 Cook JP, Singer AH, Tsao PS, et al. Antiatherosclerosis effects of Larginine in the hypercholesteremic rabbits. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 168- 172
- 5 Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, et al. Regression or progression, dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16: 44- 50
- 6 Cayte AJ, Palacino JJ, Horten K, et al. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointimal formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 753- 759
- 7 Yang X, Cai b, Sciacca RR, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthetase in macrophages by oxidized low density lipoproteins. *Circ Res*, 1994, 74(2): 318- 328
- 8 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB, et al. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest*, 1992, 89: 10- 18

(此文 1999- 07- 06 收到, 1999- 11- 05 修回)

(此文编辑 朱雯霞)