

氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对人 血管内皮细胞钙转运的影响

徐雅琴, 唐朝枢, 张钧华, 曹静, 宁涛¹, 柯杨¹

(北京医科大学第一医院心血管病研究所; 1. 北京医科大学临床肿瘤学研究所, 北京 100034)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 抗氧化剂; 维生素E; 钙; 内皮, 血管; 信号转导

[摘要] 为探讨氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对内皮细胞钙转运功能的影响, 揭示氧化型低密度脂蛋白毒性作用的分子机制和预防措施, 采用体外培养的人脐静脉内皮细胞, 单独给予氧化型低密度脂蛋白及同时给予氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂维生素E, 分别测定细胞钙摄取和释放功能, 并测定细胞及上清液乳酸脱氢酶活性, 计算细胞死亡率。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白呈剂量依赖性增加细胞死亡率, 同时刺激内皮细胞钙摄取增加, 对钙释放无影响, 维生素E可抑制氧化型低密度脂蛋白的上述作用。结果提示, 氧化型低密度脂蛋白刺激内皮细胞钙摄取可能是其致内皮细胞损伤的机制, 维生素E通过抑制此作用而达到细胞保护的效应。

[中图分类号] R329.2⁺5

[文献标识码] A

The Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein and Antioxidant on Calcium Transportation of Human Vascular Endothelial Cells

XU Ya-Qin, TANG Chao-Shu, ZHANG Jun-Hua, CAO Jing, NING Tao, and KE Yang

(The Department of Cardiology, First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China)

MeSH Oxidized Low Density Lipoprotein; Antioxidants; VitaminE; Calcium; Endothelium, Vascular; Signal Transduction

ABSTRACT **Aim** To examine the effects of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and antioxidant on calcium transportation of human vascular endothelial cells, then explore the molecular mechanism of cytotoxicity induced by ox-LDL.

Methods Confluent primary cultures of human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were exposed respectively to ox-LDL or ox-LDL and vitamin E in medium. The uptake and release of calcium by hUVEC were measured. The mortality of hUVEC were assessed by the measurement of LDH. **Results** Ox-LDL enhanced the mortality of hUVEC and the uptake of calcium by hUVEC with a dose-dependence manner, while vitamin E inhibited these effects. **Conclusions** Ox-LDL may stimulate the uptake of calcium by hUVEC, leading to hUVEC injury. Vitamin E could protect hUVEC from such cytotoxic effect by inhibiting cellular uptake of calcium.

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱发的内皮细胞损伤是导致动脉粥样硬化、高血压等血管损伤性疾病的重要因素,但其详尽机制还不甚明了。有研究显示,氧化型低密度脂蛋白可引起剂量依赖的细胞内游离钙浓度升高,同时造成内皮细胞损伤,推测Ca²⁺信号转导通路的激活可能是氧化型低密度脂蛋白内皮损伤的机制,但这种钙浓度升高是由于细胞摄取细胞外钙增加和/或细胞内钙释放引起尚不清楚^[1,3]。本工作通过检测氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)钙摄

取和释放功能的影响以及抗氧化剂维生素E的干预保护作用,以期揭示氧化型低密度脂蛋白毒性作用的分子机制和预防措施。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞系由北京市肿瘤研究所提供,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)购自北京协和医科大学基础所, Nicardipin 和维生素E购自Sigma公司, ⁴⁵Ca为Dupont NEN产品, RPMI1640购自Gibco公司。

1.2 人脐静脉内皮细胞系培养

人脐静脉内皮细胞系用含10%胎牛血清的1640

[作者简介] 徐雅琴,女,1968年12月出生,北京医科大学第一医院心内科博士。

培养基培养, 细胞汇集成单层达 80%, 0.01% 胰酶 37℃消化 5 min, 以 1×10^5 cells 接种于 24 孔板, 贴壁 24 h, 换无血清培养基培养 24 h, 然后分组加药。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

参照张林华等^[2]方法分离制备人血清低密度脂蛋白, 采用考马斯亮兰法做低密度脂蛋白蛋白定量, 低密度脂蛋白在含 5 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 中氧化 20 h (37℃)。低密度脂蛋白氧化修饰程度通过测定硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)值, 氧化型低密度脂蛋白产生的丙二醛是低密度脂蛋白的 4.3 倍。

1.4 实验分组

对照组; Ox- LDL (25 mg/L) 组; Ox- LDL (50 mg/L) 组; Ox- LDL (100 mg/L) 组; 维生素 E (50 mg/L) + Ox- LDL (50 mg/L) 组; Nicardipin (1 $\mu\text{mol/L}$) + Ox- LDL (50 mg/L) 组

1.5 细胞钙摄取功能测定

2×10^5 内皮细胞无血清培养 24 h, 分组加药, 37℃孵育 8 h, 冷 PBS 洗 3 遍, KRB 液(含葡萄糖 11 mmol/L、HEPES 30 mmol/L、0.1% 牛血清白蛋白、NaCl 136 mmol/L、KCl 4.0 mmol/L、 CaCl_2 1.0 mmol/L 及 MgCl_2 1.0 mmol/L, pH 7.35) 37℃预孵育 10 min, 加⁴⁵ CaCl_2 1 mCi/L, 37℃孵育 5 min, 冰浴下刮下细胞置于滤膜上, 抽干加闪烁液, 液闪仪测定滤膜放射性计数。

1.6 细胞钙释放功能测定

⁴⁵Ca 负荷操作同上述, 加⁴⁵ CaCl_2 1 u, 37℃孵育 10 min 后, 冷 PBS 洗 5 遍, 无 Ca 的 KRB 液 37℃预孵育 2 min, 取 0.2 mL 孵育液, 加闪烁液, 液闪仪测定放射性计数。

1.7 乳酸脱氢酶活性测定

采用 Wrablewski 等^[5]报道的方法分别测培养液和细胞内乳酸脱氢酶活性, 细胞死亡率 = 培养液乳酸脱氢酶活性 ÷ (细胞内乳酸脱氢酶活性 + 培养液乳酸脱氢酶活性) × 100%。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析组间 q 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白及维生素 E 对内皮细胞钙摄取及释放的影响

氧化型低密度脂蛋白(25、50 和 100 mg/L) 呈浓度依赖性刺激内皮细胞钙摄取增加(69%、131% 和 192%, $P < 0.01$), 预先加维生素 E 和钙通道拮抗剂

nicardipin 处理则抑制了此效应。但不同浓度的氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞钙释放无明显影响, 预先加维生素 E 及钙通道拮抗剂后亦未产生明显影响(表 1, Table 1)。

2.2 氧化型低密度脂蛋白及维生素 E 对内皮细胞死亡率的影响

与对照组相比, 氧化型低密度脂蛋白(25、50、100 mg/L) 呈浓度依赖性增加内皮细胞死亡率($P < 0.05$), 预先加维生素 E 和钙通道阻断剂 nicardipin 后细胞死亡率明显下降($P < 0.01$), 见表 1(Table 1)。

表 1. 维生素 E 和不同浓度氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞钙转运功能及内皮细胞死亡率的影响

Table 1. The effects of vitamin E and different ox- LDL concentration on the calcium transportation and the mortality of endothelial cells ($\mu\text{mol}/10^6$ cells, $n = 6$)

Groups	Ca^{2+} uptake	Ca^{2+} release	Mortality
Control	520 ± 158	78 ± 23	7.03 ± 0.21
Ox- LDL (25 mg/L)	880 ± 183 ^a	73 ± 14	9.02 ± 1.35 ^b
Ox- LDL (50 mg/L)	1204 ± 386 ^a	78 ± 17	15.78 ± 2.53 ^b
Ox- LDL (100 mg/L)	1519 ± 518 ^a	107 ± 45	19.22 ± 3.68 ^b
VitE+ ox- LDL	620 ± 247 ^c	94 ± 12	10.57 ± 1.69 ^c
Nicardipin+ ox- LDL	436 ± 181	74 ± 17	11.31 ± 1.32

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

3 讨论

近年来, 关于氧化型低密度脂蛋白与细胞特异性受体结合激活细胞内第二信使途径进而产生一系列生物学效应的信号转导通路的研究越来越受到关注。其中, 氧化型低密度脂蛋白引起细胞内游离钙浓度升高被认为是氧化型低密度脂蛋白造成内皮细胞损伤的机制之一。细胞浆 Ca^{2+} 源于细胞外 Ca^{2+} 内入和细胞内 Ca^{2+} 库(如内质网)释放, 细胞外 Ca^{2+} 主要通过 Ca^{2+} 通道进入细胞, 而细胞内 Ca^{2+} 主要通过质膜钙泵、 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ 交换释放出细胞外。此外, 肌浆网上钙泵对钙的摄取也参与了细胞内 Ca^{2+} 浓度调节。

本研究应用不同浓度的氧化型低密度脂蛋白刺激 hUVEC, 引起浓度依赖性内皮细胞死亡率增加, 这与其他学者研究结果一致^[6]。同等浓度的氧化型低密度脂蛋白作用内皮细胞时发现, 氧化型低密度脂蛋白对细胞钙释放功能无影响, 而呈浓度依赖地促进细胞钙摄取增加, 应用钙通道阻断剂可有效抑制此效应, 表明氧化型低密度脂蛋白刺激细胞 Ca^{2+} 摄

入是通过质膜钙通道进行的,而且这可能是氧化型低密度脂蛋白导致内皮细胞损伤的机制之一。

氧化型低密度脂蛋白刺激钙通道开放的机制目前尚不清楚,膜脂质过氧化是刺激钙通道开放的重要因素之一。本研究用抗氧化剂维生素 E 处理,有效拮抗氧化型低密度脂蛋白刺激 Ca^{2+} 摄入的作用,提示氧化型低密度脂蛋白可能通过氧化应激反应促进细胞钙内流。Mabile 等^[1]研究表明,维生素 E 可显著抑制氧化型低密度脂蛋白引起的内皮细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的升高,同时减轻氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞的毒性作用,这与我们的实验结果一致。

参考文献

- [1] Mabile L, Fitoussi G, Periquet B, et al. α -Tocopherol and trolox block the early intracellular events (TBARS and calcium rises) elicited

by oxidized low density lipoproteins in cultured endothelial cells[J].

Free Radical Biology & Medicine, 1995, **19** (2): 177-187

- [2] 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21** (3): 257-260
- [3] Negre-Salvayre A, Fitoussi G, Reaud V, et al. A delayed and sustained rise of cytosolic calcium is elicited by oxidized LDL in cultured bovine aortic endothelial cells [J]. *FEBS Lett*, 1992, **299**: 60-65
- [4] Boissonneault GA, Wang Y, Chung BH, et al. Oxidized low density lipoproteins delay endothelial wound healing: Lack of effect of vitamin E [J]. *Ann Nutr Metab*, 1995, **39** (1): 1-8
- [5] Wrablewski F, LaDue GS. Lactate dehydrogenase activity in blood [J]. *Proc Soc Exp Med*, 1955, **90**: 210
- [6] Zhao B, Zhang Y, Lin B, et al. Endothelial cells injured by oxidized low density lipoproteins [J]. *Am J Hematol*, 1995, **49** (3): 250-252

(此文 1999-08-15 收到, 2000-02-30 修回)

(此文编辑 文玉珊)

·消息·

1998 年中国科技期刊影响因子排序前 100 名中的生物医学期刊

名次	期刊名称	影响因子	名次	期刊名称	影响因子
2	中国科学 D	1.077	61	植物生理学报	0.469
5	理化检验化学分册	0.870	63	生物化学与生物物理学报	0.458
9	中华传染病杂志	0.783	73	中华内科杂志	0.438
10	中华结核和呼吸杂志	0.757	74	中华微生物学和免疫学杂志	0.423
11	药物分析杂志	0.749	75	生态学报	0.420
14	中华心血管病杂志	0.725	76	药学学报	0.418
24	中华病理学杂志	0.635	78	营养学报	0.415
26	分析测试学报	0.597	80	中华肝脏病杂志	0.412
29	植物学报	0.579	83	神经解剖学杂志	0.411
31	中华肿瘤杂志	0.578	86	中华医学杂志	0.408
35	病毒学报	0.547	87	中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.403
36	中华放射学杂志	0.546	89	科学通报	0.399
37	遗传学报	0.544	92	中华神经科杂志	0.395
45	中华妇产科杂志	0.508	92	中华外科杂志	0.395
49	植物生态学报	0.488	95	中华神经外科杂志	0.394
52	中国科学 E	0.487	96	膜科学与技术	0.393
55	中国科学 B	0.485	98	沈阳药科大学学报	0.392
58	中华骨科杂志	0.472	99	实验生物学报	0.391
58	中华消化杂志	0.472	100	高分子材料科学与工程	0.390