

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0298-04

维生素E对氧化型低密度脂蛋白致大鼠主动脉平滑肌细胞毒性及增殖的影响

严金川, 吴宗贵, 何松青, 樊洁¹, 凌玲¹

(第二军医大学长征医院心内科, 上海 200003; 1. 镇江第四人民医院心内科, 镇江 212001)

[关键词] 脂蛋白, 低密度; 肌, 平滑; 细胞毒性; 增生; 抗氧化剂

[摘要] 为探讨抗氧化剂维生素E对氧化型低密度脂蛋白致大鼠主动脉平滑肌细胞毒性作用及增殖的影响, 以乳酸脱氢酶及³H-胸腺嘧啶脱氧核苷、³H-亮氨酸掺入分别测定平滑肌细胞损伤和增殖。结果显示, 维生素E可明显抑制高浓度氧化型低密度脂蛋白(> 300 μg/L)引起的平滑肌细胞释放乳酸脱氢酶, 并能有效抑制低浓度氧化型低密度脂蛋白(< 300 μg/L)引起的平滑肌细胞³H-胸腺嘧啶脱氧核苷、³H-亮氨酸的掺入, 二者均具有剂量依赖性。提示抗氧化剂维生素E对氧化型低密度脂蛋白引起的平滑肌细胞损伤有保护作用, 对其引起的增殖有抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Vitamin E on the Cytotoxicity and Proliferation Induced by Oxidized Low density Lipoprotein in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells

YAN Jin- Chuan, WU Zong- Gui, HE Song- Qing, FAN Jie, and LING Ling

(Department of Cardiology, Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003; 1. Department of Cardiology, The Fourth People's Hospital of Zhenjiang, Zhenjiang, 212001, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Muscle, Smooth; Cytotoxins; Hyperplasia; Antioxidants

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of antioxidant vitamin E (Vit E) on the cytotoxicity and proliferation of aortic smooth muscle cell (SMC) induced by oxidized low density lipoprotein (oxLDL). **Methods** The injury and proliferation of SMC were determined by lactic dehydrogenase (LDH) release kit and the incorporation of ³H-TdR and ³H-Leu into cells respectively. **Results** Vit E could significantly inhibit SMC from releasing LDH induced by high levels of oxLDL and the incorporation of ³H-TdR, ³H-Leu caused by oxLDL at low concentrations in a dose-dependent manner. **Conclusion** Antioxidant Vit E has both protective effects on the injury and inhibition effects on the proliferation of aortic SMC induced by oxLDL.

近来研究表明, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 特别是氧化型 LDL (oxidized LDL, oxLDL) 在致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 中起重要作用^[1]。oxLDL 具有细胞毒性作用, 并能刺激细胞产生各种细胞因子及生长因子, 从而促进 As 的发生和发展^[2]。然而, 近年来越来越多的实验现象和证据表明, 平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 的增殖对 As 和再狭窄起着不可忽视的作用。因此, 本实验中探讨 oxLDL 对 SMC 损伤及增殖作用, 并观察

抗氧化剂维生素E对其干预效果。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

SD大鼠由大学动物房提供, DMEM为Gibco公司产品, 维生素E和胎牛血清为Sigma公司产品, 细胞毒性测定试剂盒为德国Boehringer Mannheim公司产品, ³H-TdR、³H-Leu购自北京原子能公司。

1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞培养和鉴定

参照Ross等^[3]方法, 应用组织贴块法进行SD大鼠主动脉平滑肌原代培养, 细胞传代至3~4代即可用于实验, 调节细胞数在10⁹/L, 用DMEM培养液 (含10%胎牛血清) 接种6孔培养板, 12h细胞贴壁, 换液含0.5%胎牛血清DMEM液过夜, 即可加入oxLDL干预。SMC的鉴定采用α-SM-actin免疫组

[作者简介] 严金川, 男, 1965年10月出生, 博士, 主治医师, 从事急性冠状动脉综合征发病机制研究, 现在东南大学附属中大医院心内科工作。吴宗贵, 男, 1953年2月出生, 教授, 博士研究生导师, 心内科主任, 主要从事急性冠状动脉综合征临床研究。何松青, 男, 1967年9月出生, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事急性冠状动脉综合征发病机制的研究, 现在南京军区总医院心内科工作。

织化学染色阳性及形态学典型的“谷、峰”样生长。

1.3 低密度脂蛋白的分离和氧化修饰

100 $\mu\text{g/L}$ LDL、20 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 、10 mmol/L PBS 缓冲液中, 无菌条件下 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 24 h。用前加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 中止反应。经 0.4% 琼脂糖凝胶电泳苏丹黑 B 染色后, 观察迁移率以验证氧化程度。

1.4 细胞毒性作用测定

严格按试剂盒说明书操作。应用 Vital AB micro 半自动生物化学分析仪, 波长 340 nm, 温度 25 $^\circ\text{C}$, 比色杯光柱 1 cm, 标准液 2.5 mL 与 50 μL 混匀, 测定每分钟平均吸光度变化 ($\Delta A/\text{min}$), $\text{LDH} (\text{u/L}) = \Delta A/\text{min} \times 8\ 095$ 得出。

1.5 细胞增殖测定

DMEM (20% FBS) 培养液将细胞调至 $1.0 \times 10^8/\text{L}$, 24 h 后改用 0.1% FBS DMEM 继续培养 24 h, 使细胞处于 G_0/G_1 期, 加入 oxLDL 进行干预。每孔反应体积 1.0 mL, 作用既定时间后, 更换相同的培养液, 各加入 ^3H -TdR、 ^3H -Leu 1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$, 继续作用 24 h, PBS 洗 1 次, 用多头细胞收集仪转移至 F49 型滤纸上, 用生理盐水洗 2 次, 10% 三氯乙酸固定, 无水乙醇脱水、脱色, 105 $^\circ\text{C}$ 烘烤 15 min 后, 置于闪烁液中, 用 Packard 4000 型液体闪烁计数器测样品放射性 cpm 值。以对照组的 ^3H -TdR、 ^3H -Leu 掺入率为 100%, 比放射性分别为 740 GBq/mmol、3.7TBq/mmol, 各实验组与之比较。

1.6 实验分组

对照组; ④同一浓度维生素 E (100 mg/L) 对高浓度 oxLDL (300~600 $\mu\text{g/L}$) 引起的细胞毒性作用的影响; ④不同浓度维生素 E 对同一浓度 oxLDL (400 $\mu\text{g/L}$) 引起的细胞毒性作用的影响; 同一浓度维生素 E (100 mg/L) 对低浓度 oxLDL (50~300 $\mu\text{g/L}$) 刺激 SMC 增殖的影响; 不同浓度维生素 E 对同一浓度 oxLDL (100 $\mu\text{g/L}$) 刺激 SMC 增殖的影响。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用小样本 t 检验。

2 结果

2.1 维生素 E 对高浓度氧化型低密度脂蛋白促进平滑肌细胞释放乳酸脱氢酶的影响

oxLDL 在 300~600 $\mu\text{g/L}$ 范围作用 24 h 时, 平滑肌细胞 LDH 的活性与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)。并随 oxLDL 浓度增加, LDH 释放增加。而预先 6 h 前加入维生素 E 100 mg/L , LDH 的释放明显受

抑制(图 1, Figure 1)。

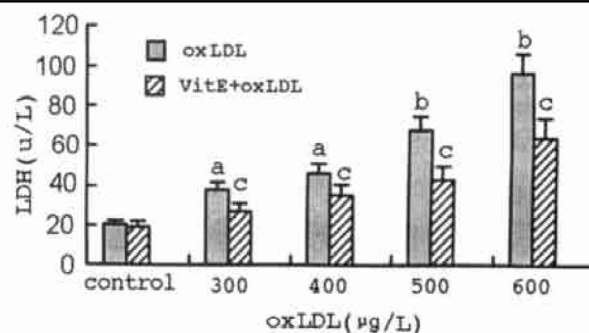


图 1. 维生素 E 对高浓度 oxLDL 促进 SMC 释放 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Figure 1. Effect of Vit E on releasing LDH from SMC induced by oxLDL at high concentrations. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, compared with vitamin E + oxLDL group.

2.2 不同浓度维生素 E 对氧化型低密度脂蛋白促进平滑肌细胞释放乳酸脱氢酶的影响

预先 6 h 前加入不同浓度维生素 E (50、100、200 mg/L), 然后给予 oxLDL (400 $\mu\text{g/L}$) 刺激 24 h, 结果发现随维生素 E 浓度增加, SMC 释放 LDH 减少, 并具有浓度依赖效应。

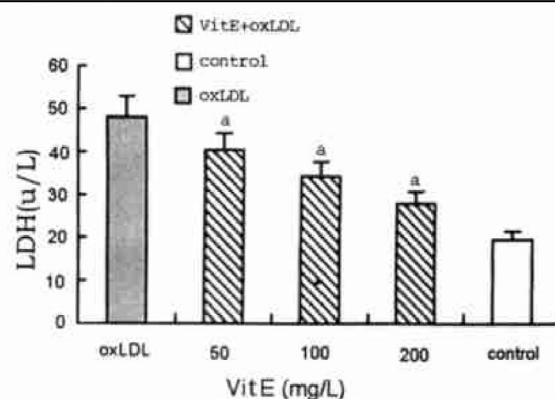


图 2. 不同浓度维生素 E 对 oxLDL 促进 SMC 释放 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Figure 2. Effect of Vit E at different concentrations on releasing LDH from SMC induced by oxLDL. a: $P < 0.05$, compared with control and oxLDL group

2.3 维生素 E 对低浓度氧化型低密度脂蛋白促进平滑肌细胞增殖的影响

oxLDL 在 50~300 $\mu\text{g/L}$ 范围作用 24 h, SMC ^3H -TdR、 ^3H -Leu 掺入量与未加 oxLDL 时有明显差异, 并随 oxLDL 浓度呈剂量依赖性增加。而预先 6 h 前加入维生素 E 100 mg/L , 然后加入上述 oxLDL 干预, 维生素 E 明显抑制 ^3H -TdR、 ^3H -Leu 掺入量

(图3, Figure 3)。以 100 $\mu\text{g/L}$ oxLDL 对 SMC 促增殖作用剂量, 预先加入维生素 E 50~200 mg/L , 维生素 E 同样呈剂量依赖性抑制 oxLDL 引起的 SMC 增殖作用(图4, Figure 4)。

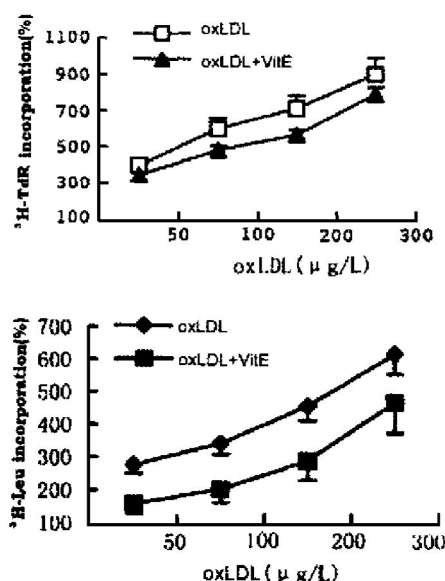


图3. 同一浓度维生素 E 对低浓度 oxLDL 刺激 SMC 增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3. Effect of Vit E on the proliferation of SMC induced by oxLDL at low concentrations

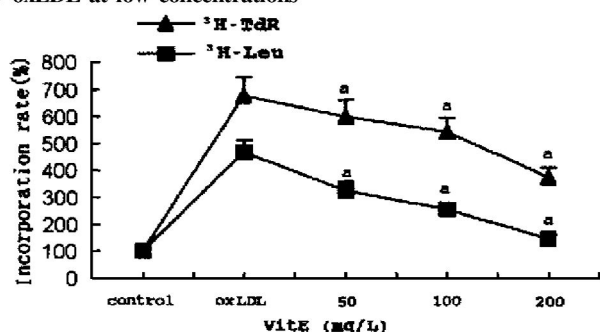


图4. 不同浓度维生素 E 对同一浓度 oxLDL(100 $\mu\text{g/L}$) 刺激 SMC 增殖的影响

Figure 4. Effect of Vit E at different concentrations on the proliferation of SMCs induced by oxLDL. a: $P < 0.05$, compared with oxLDL group

3 讨论

LDL 发生氧化修饰形成 oxLDL 是 LDL 致 As 的关键步骤。oxLDL 具有细胞毒性作用, 可以导致内皮损伤及钙的转运^[4,5], 促进 SMC 增殖, 促进血小板积聚及单核细胞对 SMC 的粘附。

本实验应用 oxLDL 刺激 SMC, 发现在高浓度(>

300 $\mu\text{g/L}$) 时, oxLDL 对 SMC 损伤随浓度增加, 细胞毒性加重。而在低浓度 oxLDL (< 300 $\mu\text{g/L}$) 却对 SMC 具有促增殖作用, 这与 Shanthini 等^[6]发现动物体内灌注低浓度 oxLDL 能刺激 SMC 增殖的报道相一致。近年来, 越来越多的实验现象和证据表明, SMC 的再生和增殖作用在 As 的修复和再狭窄中起重要作用^[7,8], 而且再生和增殖的 SMC 与正常的内皮在某些生化成分和功能上存在差异。SMC 本身可产生许多可溶性因子, 促进增殖和迁移, 然而本实验中 ox-LDL 引起的 SMC 增殖过程与我们以前发现的 oxLDL 能影响胞内信号通路发生变化有吻合之处^[9]。因此, 我们推测可能是 oxLDL 与 SMC 细胞膜上受体结合, 引起细胞本身内在的信号通路发生变化, 从而促发一系列细胞生物学效应, 包括合成和分泌一些可溶性因子。由此而促进 SMC 的增殖和迁移。

维生素 E 是体内重要的抗氧化剂, 大量实验治疗学证据进一步证实了它具有保护内皮细胞的血管壁功能完整性, 抑制 SMC 增殖。本实验中应用维生素 E 预先处理培养的 SMC, 然后给予 oxLDL 干预, 结果发现, 维生素 E 能抑制低浓度 oxLDL 对 SMC 促增殖作用, 并能拮抗高浓度 oxLDL 对 SMC 的损伤作用, 并在一定范围内呈剂量依赖效应, 而实验中维生素 E 本身对 SMC 的毒性和增殖作用无影响(数据未给出)。提示抗氧化剂维生素 E 在 As 中起保护作用具有双重机制, 特别是抑制 SMC 的增殖作用, 这在再狭窄中起重要作用。我们以前的研究发现, 维生素 E 能部分逆转 oxLDL 对内皮细胞一氧化氮-氧化氮合酶通路(NO-NOS)及二酰基甘油-蛋白激酶 C(DAG-PKC) 信号转导系统的影响^[9,10]。维生素 E 的上述双重作用是否与此有关, 尚需进一步研究。

综上所述, 高浓度 oxLDL 对 SMC 具有毒性作用, 低浓度 oxLDL 具有促进 SMC 增殖作用, 抗氧化剂维生素 E 能呈剂量依赖方式逆转上述双重效应。

参考文献

- [1] Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoprotein in atherosclerosis and thrombosis [J]. *FASEB J*, 1994, **8**: 1 279- 284
- [2] Sternberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance [J]. *J Biol Chem*, 1997, **273** (34): 20 963- 969
- [3] Campbell JC, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture [J]. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 1- 60
- [4] 徐雅琴, 唐朝枢, 张钧华. 氧化型低密度脂蛋白和抗氧化剂对豚鼠动脉内皮细胞钙转运的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 32- 34
- [5] 严金川, 吴宗贵, 樊洁, 等. 维生素 E 对氧化型低密度脂蛋白

- 白引起的人脐静脉内皮细胞毒性及增殖影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2000, **2** (5): 132- 135
- [6] Shanthini RW, Marc SP, Gerald M, et al. Exogenous oxidized low density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo [J]. *Circ Res*, 1997, **80**: 37- 42
- [7] Azuma H, Niimi Y, Trada T, et al. Accelerated endothelial regeneration and intimal hyperplasia following a repeated denudation of rabbit carotid arteries: morphological and immunohistochemical studies [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995, **22** (10): 748- 754
- [8] Gohra H, McDonald TO, Verrier ED, et al. Endothelial loss and regeneration in a model of transplant atherosclerosis [J]. *Transplantation*, 1995, **60** (1): 96- 100
- [9] 严金川, 刘乃丰. 氧化 LDL 和抗氧化剂对人脐静脉平滑肌细胞信号转导物 DAG 的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, **15** (6): 491- 492
- [10] 严金川, 刘乃丰, 陈日新. 氧化型低密度脂蛋白和维生素 E 对人脐静脉平滑肌细胞产生一氧化氮及其合酶的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7** (2): 145- 147
- (此文 2001- 02- 15 收到, 2001- 09- 25 修回)
- (此文编辑 文玉珊)