

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0023-03

•实验研究•

氧化型低密度脂蛋白诱导猪主动脉平滑肌细胞凋亡

袁中华¹, 杨永宗², 杨小毅², 谭健苗², 万载阳²

(1. 中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 肌, 平滑, 血管; 凋亡; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 主动脉; 细胞培养

[摘要] 为了探讨氧化型低密度脂蛋白是否引起血管平滑肌细胞凋亡, 把体外培养的猪主动脉平滑肌细胞与 15 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白孵育 72 h, 分别使用荧光染色技术和激光共聚焦显微技术观察细胞核的变化, 应用流式细胞仪鉴别凋亡细胞。结果发现, 15 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白作用 72 h 后, 荧光显微镜下可见染色质高度凝集, 有核碎裂现象; 激光共聚焦显微镜下见染色质固缩, 核变小; 流式细胞术鉴别为凋亡细胞。此结果提示, 氧化型低密度脂蛋白能诱导血管平滑肌细胞发生凋亡, 有典型的形态学改变。

[中图分类号] R361.3

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein Induces Apoptosis of Porcine Aortal Smooth Muscle Cells

YUAN Zhong-Hua^{1,2}, YANG Yong-Zong², YANG Xiao-Yi², TAN Jian-Miao², and WAN Zai-Yang²

(1. Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, Hunan 410078; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China.)

[MeSH] Muscle, Smooth, Vascular; Apoptosis; Lipoprotein, LDL, Oxidized; Aorty, Porcine; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. **Methods** The cultured porcine aortal smooth muscle cells incubated with oxidized low density lipoprotein of 15 mg/L for 72 hours in vitro. Then the samples were analyzed by fluorescence microscope, confocal microscope system and flow cytometry. **Results** Apoptosis was triggered by incubated with oxidized low density lipoprotein accompanying with apparently morphological changes. **Conclusion** In the process of which oxidized low density lipoprotein induced vascular smooth muscle cells apoptosis, the abnormal metabolism of cellular cholesterol may be have relation to apoptosis.

细胞凋亡与细胞增殖维持动态平衡, 是生物体新陈代谢所必须的一个环节, 凋亡异常是许多疾病的原因之一, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生直接与凋亡有关。文献[1]报道, 冠状 As 斑块发现大量凋亡细胞, 并且证明 As 中凋亡的细胞大部分是平滑肌细胞^[2]和巨噬细胞。本文旨在观察离体状态下氧化型低密度脂蛋白是否诱导血管平滑肌细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

199 培养基、秋水仙碱 (colchicines, Col)、RNA 酶及 Hoechst33342 为 Sigma 公司产品。其余试剂均为国产分析。80P-7 型超速离心机系日本日立公司产

品; Fxa 型荧光显微镜系日本 Nikon 公司产品; LSM-10 型共聚焦激光扫描显微镜为德国 Opton 公司产品; FCM-1 型流式细胞仪系美国 Becton-Dickinson 公司产品。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

用健康人新鲜血浆制备 LDL。Lowry 法测得 LDL 的蛋白含量为 1.68 g/L (文中所列脂蛋白浓度均以蛋白含量为标准)。然后将 LDL 置含 10 μmol/L Cu²⁺ 的 PBS 中, 37 °C 透析 12 h, 再在 0.01% EDTA 的 PBS 中透析 24 h (4 °C), 除菌保存。采用 Yagi 法^[3]测定脂过氧化物 (lipid peroxide, LPO) 含量, 以硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 为标准, 测得 LDL 含 LPO 由 1.5 μmol/g 升高为 17.2 μmol/g, 成为氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL)。

1.3 血管平滑肌细胞的培养

无菌条件下取猪胸主动脉, 在含 10% 胎牛血清 M199 培养基, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养, 实验用 3~5 代 VSMC。

1.4 实验分组

将 VSMC 分三组: (1) 对照组, 普通培养基继续培

[收稿日期] 2001-06-18 [修回日期] 2001-11-20

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (97JJY2025) 资助。

[作者简介] 袁中华, 男, 1966 年出生, 河南省平舆县人, 讲师, 病理生理学博士研究生, 研究方向为泡沫细胞形成的分子机理。杨永宗, 男, 1937 年出生, 福建省仙游县人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化防治研究, 本文通讯作者。

养; (2) ox-LDL 组: 培养基中加入 15 mg/L ox-LDL 作用 72 h; (3) ox-LDL+ Col 组: 加入 15 mg/L ox-LDL 作用 72 h 后, 再加入终浓度为 10 μ mol/L 的 Col 作用 24 h, 诱导细胞凋亡。

1.5 凋亡细胞的形态观察

将 VSMC 传入 24 孔培养板, 待细胞长满后, 以终浓度 10 μ mol/L 的 DNA 荧光染料 Hoechst 33342 在 37 $^{\circ}$ C 染色 15 min, 无血清培养基洗两次。然后用 PBS 冲洗两次, 丙酮中快速脱水后无色指甲油封片。分别在荧光显微镜及共聚焦激光扫描显微镜下观察凋亡细胞核形态变化。

1.6 流式细胞术鉴别凋亡细胞

待细胞布满培养瓶后, 换成 1% 胎牛血清的 M199 培养基 48 h, 使饥饿细胞同步于 G0 期, 实验分组后, 0.125% 胰酶消化, PBS 冲洗, 于 4 $^{\circ}$ C 70% 乙醇中固定 24 h。离心 (1 kr/min, 10 min), 弃乙醇, 用 PBS 洗两次。再离心 (1 kr/min, 10 min), 弃上清后余下 1.0 mL, 加终浓度为 100 mg/L RNA 酶, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min。再放入冰浴中, 停止 RNA 酶作用。加终浓度为 5 mg/L 溴化乙锭 30 min, 避光, 冰浴中染色。用尼龙网过滤后, 在流式细胞仪上分析。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞凋亡的形态学改变

细胞凋亡的特征性形态学改变是细胞核浓缩, 染色质凝集, 沿核膜分布, 最后细胞核碎裂, 被膜包裹形成凋亡小体。

2.1.1 荧光显微镜观察结果 Hoechst 33342 的

激发峰 340 nm, 荧光发射峰 450 nm。在荧光显微镜下可见细胞核 DNA 发紫蓝色荧光, 对照组的细胞核染色质均匀, 边缘界线明显、光滑。ox-LDL 组染色质浓缩, 有小团块在细胞核中。ox-LDL+ Col 组可见染色质高度凝集, 已有核碎裂的迹象。

2.1.2 激光共聚焦显微镜观察 共聚焦激光扫描显微镜观察发现, 对照组的细胞核染色质分布均匀 (图 1A, Figure 1A), 其它两组细胞核均有不同程度的改变。对 ox-LDL 组的细胞分别切九个断面, 图 1B (Figure 1B) 为第三个断面, 可见核中有染色质团块 (标有十字处), 尚未靠边; ox-LDL+ Col 组细胞核染色质已经固缩成团块, 核变小, 已有碎裂趋势 (图 1C, Figure 1C)。

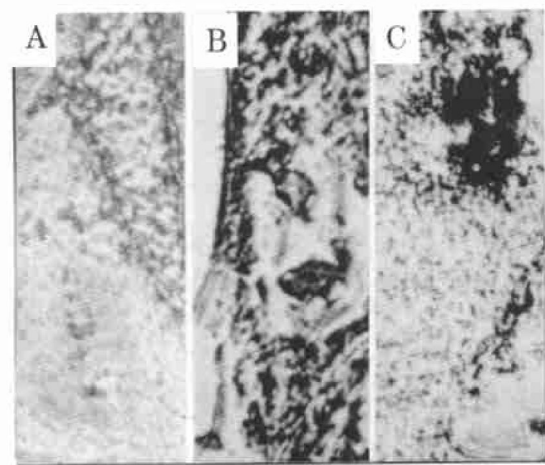


图 1. 血管平滑肌细胞的激光共聚焦显微照片。

Figure 1. The photo of VSMC which were taken under confocal microscope system. A: control group. B: ox-LDL group. C: ox-LDL+ Col group.

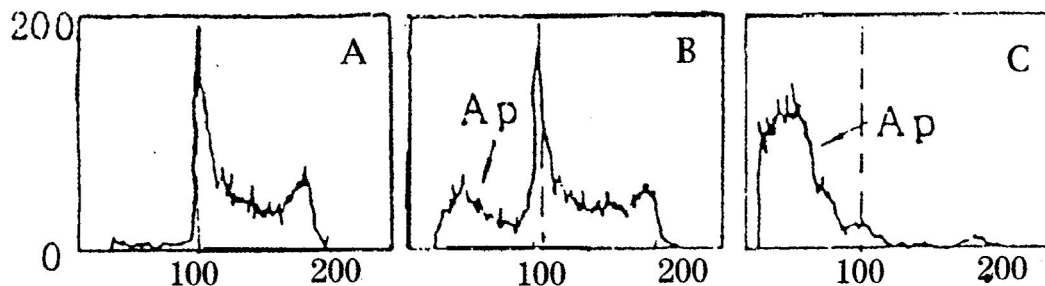


图 2. 血管平滑肌细胞的 DNA 直方图。

Figure 2. The DNA histogram of VSMC. Horizontal axis represents relative content of DNA, vertical axis represents relative cell number. A: control group. B: ox-LDL group. C: ox-LDL+ colchicines group.

2.2 流式细胞术鉴别凋亡细胞的结果

图 2 (Figure 2) 中, 横坐标代表相对 DNA 含量, 纵坐标代表细胞数, 图 2A (Figure 2A) 为对照组, 其第一

个峰 (虚线处) 表示 G1 期, 第二个峰表示 G2+ M 期, 两峰之间为 S 期。由于细胞固定后质膜通透性增强, 凋亡细胞内 DNA 降解, 降解的 DNA 被释放, 在组

方图中将出现低于 G1 期 DNA 含量的亚 G1 峰(图中 Ap 峰), Ap 峰的大小表示凋亡细胞的多寡。ox-LDL 组(图 2B, Figure 2B) 已出现很小的 Ap 峰。ox-LDL+ Col 组(图 2C, Figure 2C) Ap 峰巨大, G1 期细胞较少, S 期和 G2+ M 期细胞也很少。

3 讨论

动脉粥样硬化(As) 研究在引入凋亡概念后进展很快。Escargueil-Blanc I 等^[4]报道 ox-LDL 可诱导淋巴细胞凋亡。De Bono DP 等^[5]报道 H₂O₂ 可使培养的牛主动脉内皮细胞凋亡。在 As 斑块中发现凋亡的 VSMC 已有多家报道^[1,6], 这说明凋亡在血管损伤及 As 斑块的发展中起了一定的作用。

细胞凋亡的典型特征是: DNA 降解形成寡聚核小体, 凝胶电泳上, 表现“梯状谱带”, 染色质固缩为不均一点状结构, 这主要是由于凋亡过程中核酸内切酶活化所致。尽管“DNA 梯子”被认为是凋亡的典型特征, 但已有许多实验室发现用其它方法证实有凋亡存在的情况下, 可不出现“DNA 梯子”或在凋亡的晚期才出现^[7-9]。由此他们得出结论: DNA 降解可能是较典型的, 但在一系列导致凋亡的事件中, 它却不是必须的^[9]。文献[8, 10] 在培养的血管平滑肌细胞凋亡过程中, 并未观察到“DNA 梯子”。本实验也未观察到“DNA 梯子”。检测凋亡较可靠的方法是观察细胞核形态的改变, 虽然特异性高, 但灵敏度低。本文联合使用荧光染色技术及共聚焦激光扫描技术观察细胞核的改变, 发现 ox-LDL 能诱发 VSMC 发生典型的凋亡特征。尤其是使用共聚焦显微镜对凋亡细胞进行光学“切片”, 可以看到典型的凋亡过程, 从染色质边集到染色质积聚成团块。

流式细胞术测定核 DNA 降解是最近几年发展的新手段, 具有很高的灵敏度, 凋亡程度与 Ap 峰的大小有一定的相关性。在这里可以更灵敏地看到 ox-LDL 诱导平滑肌细胞的凋亡。

凋亡的分子机制是目前研究的热点, 大多文献报道与基因的改变、Ca²⁺ 的改变及蛋白酶的变化有关。Bennett MR 等^[11]比较了正常动脉血管与 As 血管中 SMC 凋亡的情况, 发现 As 血管 SMC 更易凋亡。在 As 病变中, ox-LDL 被 VSMC 及巨噬细胞上的清道夫受体吞噬后形成泡沫细胞是其关键环节。我们以前的研究表明^[12, 13]: ox-LDL 在体外能使 VSMC 泡沫

化, 细胞内胆固醇酯大量的聚集。细胞内胆固醇的代谢处于一种非常严谨的自稳态, 细胞内胆固醇酯的积聚由不同通路上的很多酶参与, 比如溶酶体中的胆固醇酯水解酶催化摄入细胞内溶酶体的胆固醇酯水解, 水解释放的游离胆固醇会进一步被细胞利用; 内质网上的乙酰胆固醇酰基转移酶催化细胞内游离胆固醇合成胆固醇酯, 多余的胆固醇酯在细胞内以脂滴的形式储存。本实验又发现 ox-LDL 也能使 VSMC 凋亡, 虽然引起细胞凋亡的原因有很多, 比如脂质过氧化, 而 ox-LDL 本身也含有脂质过氧化产物, 那么除了这些因素以外, 我们认为细胞内胆固醇代谢的紊乱也可能与凋亡的发生有关。

[致谢] 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室黄有国先生、细胞生物室李景福先生提供实验室, 对本文的工作给予热情的指导; 激光共聚焦显微镜室、流式细胞仪室提供仪器。

[参考文献]

- [1] Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*. 1995, **147** (2): 267-277
- [2] 彭刚艺, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 140-144
- [3] Yagi KA. Simple fluorometric assay for liperoxide in blood plasma. *Biochem Med*, 1976, **15**: 212-216
- [4] Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J*, 1994, **8** (13): 1 075-080
- [5] De Bono DP, Yang WD. Exposure to low concentration of hydrogen peroxide caused delayed endothelial cell death and inhibits proliferation of surviving cell. *Atherosclerosis*, 1995, **114** (2): 235-245
- [6] Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 251-266
- [7] Kerr JFR, Winterford CM, Hammon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, **73**: 2 013-026
- [8] Leszczynska D, Zhao Y, Luokkamaki M, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells: protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in nontransformed rat vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*, 1994, **145**: 1 265-270
- [9] Schultze-Osthoff K, Waleczak H, Droge W, et al. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **127**: 15-20
- [10] Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, induces apoptosis. *Circ Res*, 1994, **74**: 525-536
- [11] Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, **95** (5): 2 266-274
- [12] 袁中华, 杨永宗, 杨小毅. 平滑肌细胞源性泡沫细胞模型的复制. *临床与实验病理学杂志*, 1998, **17** (1): 70-72
- [13] 杨永宗, 杨小毅, 袁中华. 消斑肽能逆转平滑肌源性泡沫细胞. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (4): 275-278

(此文编辑 胡必利)