

[文章编号] 1007-3949(2004)12-04-0383-04

• 实验研究 •

氧化型低密度脂蛋白经血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 途径诱导血管内皮细胞损伤

朱惠莲, 侯孟君, 李 燕, 郑佩英, 凌文华

(中山大学公共卫生学院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 细胞生物学; 氧化低密度脂蛋白致血管内皮细胞损伤的机制; 细胞培养; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 氧化型低密度脂蛋白; 血管内皮细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨氧化型低密度脂蛋白致血管内皮细胞损伤的作用, 并从血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的途径探讨损伤作用的机制。用¹²⁵I 标记的氧化型低密度脂蛋白进行放射性配基结合实验及配基竞争性抑制实验检测培养的人脐静脉内皮细胞中存在的特异性氧化型低密度脂蛋白受体, 2,4-二硝基苯肼法测定乳酸脱氢酶活性, 台盼兰染色、相差显微镜下观察细胞的形态学变化并计数细胞的存活率。结果发现, 人脐静脉内皮细胞膜上存在与氧化型低密度脂蛋白高亲和力的结合位点, Scatchard 分析 Kd 为 38.4 ± 18.8 mg/L、Bmax 为 181.5 ± 55.5 ng/10⁶ cells。氧化型低密度脂蛋白与人脐静脉内皮细胞作用 24 h, 随着氧化型低密度脂蛋白剂量的增加, 不仅显著增加人脐静脉内皮细胞释放乳酸脱氢酶的量, 而且使人脐静脉内皮细胞的存活率下降, 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 受体阻滞剂聚肌苷酸和爱兰苔胶可以阻断氧化型低密度脂蛋白的上述损伤作用。结果提示, 血管内皮细胞表达氧化型低密度脂蛋白受体血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1, 氧化型低密度脂蛋白诱导对血管内皮细胞的损伤作用可能是通过血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的受体途径。

[中图分类号] O2

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein Induced the Injury of Endothelial Cells Via Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1

ZHU Hui-Lian, HOU Meng-Jun, LI Yan, ZHENG Pei-Ying, and LING Wei-Hua

(School of Public Health, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Lectin-Like Oxidized LDL Receptor-1; Oxidized LDL; Endothelial Cells; Atherosclerosis; Lactate Dehydrogenase; Cell Viability

[ABSTRACT] **Aim** To explore the injured effects of endothelial cells by oxidized low density lipoprotein and its mechanism via lectin like ox-LDL receptor 1. **Methods** The specific ox-LDL receptor of cultured umbilical vein endothelial cells (hUVEC) was examined by their binding of ¹²⁵F labeled ox-LDL and by the inhibiting effects of competitors on ox-LDL binding to Lectin like ox-LDL receptor-1 (LOX-1). Lactate dehydrogenase (LDH) was determined by the method of 2,4-dinitrobenzohydrazine. Cell viability were detected by trypan blue dye and observed under phase difference microscope. **Results** hUVEC membrane was observed to possess a high affinity ox-LDL binding site (Determined by Scatchard plot, its Kd is 38.4 ± 18.8 mg/L and Bmax is 181.5 ± 55.5 ng/10⁶ cells). Incubation of hUVEC with ascending dose of ox-LDL for 24 hours. The ascending doses of ox-LDL significantly increase LDH leakage into culture media (from 0.111 ± 0.012 ku/g protein to 0.770 ± 0.044 ku/g protein). Accordingly, viability of hUVEC decrease in response to ox-LDL (from 95.6% ± 3.8% to 80.7% ± 4.9%). The effects of ox-LDL is blocked partially by LOX-1 chemical blockers, polyinosinic acid and carrageenan. **Conclusion** hUVEC possess endothelial receptors for ox-LDL (LOX-1). Ox-LDL-mediated injury to hUVEC may be induced by LOX-1.

大量研究表明, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 在致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的病理过程中起关键的作用^[1,2]。

以往发现的 A 类清道夫受体、CD36、SR-BI、MARCO 和 CD68 等可介导巨噬细胞摄取 ox-LDL, 但内皮细胞摄取 ox-LDL 的分子机制不明。血凝素样 ox-LDL 受体 1 (lectin-like ox-LDL receptor-1, LOX-1) 是新发现的存在于血管内皮细胞表面的 ox-LDL 特异性受体, 它与已知的上述 ox-LDL 清道夫受体没有任何结构上的同源, 是血管内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体^[3]。本研究在培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) 中观察

[收稿日期] 2004-03-29 [修回日期] 2004-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金杰出青年基金(30025037)资助

[作者简介] 朱惠莲, 在读博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉硬化发病机理及营养防治研究, E-mail 为 helenzhu@gzsums.edu.cn。凌文华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉硬化发病机理及营养防治研究。侯孟君, 在读博士, 研究员, 研究方向为动脉硬化发病机理。

LOX-1 与 ox-LDL 的结合作用, 并探讨 ox-LDL 对内皮细胞损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐带来自中山大学附属第一医院健康产妇分娩后的新生儿脐带。血管内皮生长因子、Lowry's 试剂盒、聚肌苷酸和爱兰苔胶购自 Sigma 公司; LOX-1 引物由上海生物工程有限公司合成, 羊抗人 LOX-1 多克隆抗体以及鼠抗羊 IgG 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; TRIzol Reagent 购自 GIBCOBRL 公司, 逆转录聚合酶链反应试剂盒购自 Invitrogen 公司。 ^{125}F ox-LDL 由本校核医学研究所标记。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备、氧化及乙酰化

采用密度梯度超速离心法分离 LDL。新鲜健康人血浆购自中山大学附属第一医院血库。血浆用 NaBr 调密度至 1.2。在离心管至下而上分别铺入密度为 1.200 的血浆、密度为 1.063 和 1.020 的密度液。于 4℃、50 kr/min 离心 5 h。纯化的 LDL 在 4℃ 的透析液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 300 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 15 mmol/L NaN_3 , pH7.6) 中透析 36 h。用 0.45 μm 微孔滤膜除菌保存。用 Lowry's 法测定 LDL 的蛋白含量。把拟氧化的 LDL 在无 EDTA 的 PBS 中 4℃ 透析 36 h, 然后加入含 CuSO_4 的 PBS 液, 使 Cu^{2+} 的终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 37℃ 氧化 18 h。氧化结束后加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 EDTA 终止氧化。然后置于含 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 液中透析 24 h。并于 4℃ 避光保存备用。把拟乙酰化 LDL 按每 16 mg 蛋白的 LDL 中加入 1 mL 0.15 mol/L 的 NaCl, 再加入 1 mL 饱和醋酸钠, 在冰浴中把总量相当于 LDL 蛋白量 1.5 倍醋酸酐以小液滴 (2 μL /滴) 方式在不断搅拌下 1 h 内加入, 加入后混合液继续搅拌 30 min, 届时反应液移入透析袋中, 于 4℃ 下透析 24 h。并于 4℃ 避光保存备用。用琼脂糖凝胶电泳法鉴定 LDL、ox-LDL 和 ac-LDL 的纯度。并用 TBA 法测定 LDL、ox-LDL 和 ac-LDL 的氧化修饰程度。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

无菌条件下取脐带, 挤出脐带血管中的血液, 放入灭菌的含双抗的 PBS 瓶中, 2 h 内进行内皮细胞的分离和培养。将约 15 mL 0.125% 胰蛋白酶 EDTA 消化液 (0.25% 胰酶: 0.02% EDTA = 1:1) 注入 25 cm 左右的新生儿脐静脉中, 于 37℃ 培养箱内消化 15 min, 收集消化液, 1.5 kr/min 离心 15 min, 接种于培养瓶中, 加入 5 mL PRM-1640 培养基 (含 20% 胎牛血清、

100 mg/L 血管内皮生长因子、300 mL/L L-谷氨酰胺、100 mg/L 肝素、100 ku/L 青霉素和 100 ku/L 链霉素), 置 5% CO_2 培养箱中 37℃ 培养, 首次 8 h 换液, 以后每两天换液一次, 待细胞汇合时进行传代。取第 4、5 代亚汇合状态的 hUVEC 分组进行后续实验。

1.4 放射性配基结合实验

取两组 6 孔培养的汇合成单层的 hUVEC (每孔约含 2.5×10^6 贴壁细胞), 分为总结合组和非特异性结合组。将培养基弃去, 用 PBS 洗 3 次, 然后加入 2 mL 预冷的含 10% FBS 的 PRM-1640 培养基, 在 4℃ 培养 30 min 后, 弃去培养基。总结合组每孔分别加入终浓度为 2、4、8、16 及 32 mg/L ^{125}F ox-LDL 的上述培养基 1 mL, 非特异性结合组同时加入非标记的 ox-LDL 800 mg/L, 37℃ 培养箱中孵育 2 h, 弃去培养基, 用预冷含 2 g/L BSA 的 Tris-Buffer (50 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl; pH7.4) 快速冲洗细胞 3 次, 然后用上述无 BSA 的 Tris-Buffer 洗涤 2 次, 每次 5 min。最后加入 0.2 mol/L NaOH 0.5 mL 裂解液, 于室温下在摇床上裂解 3~4 h, 将裂解液收集于塑料离心管, γ 放射测定仪进行计数。以结合的与游离的配体浓度比 (B/F) 对结合的配体进行 Scatchard 作图, 计算 ^{125}F ox-LDL 与 hUVEC 细胞膜上 LOX-1 亲和力大小 (解离常数 Kd) 以及细胞膜上 LOX-1 的最大结合容量 (Bmax)。重复 4 次。

1.5 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的竞争性抑制实验

取 6 孔培养的汇合成单层的 hUVEC (每孔约含 2.5×10^6 贴壁细胞), 弃培养基, 用 PBS 洗 3 次, 然后加入 2 mL 预冷的含 10% FBS 的 PRM-1640 培养基, 在 4℃ 培养 30 min 后, 弃去培养基。每孔分别加入 1 mL 终浓度为 8 mg/L 的 ^{125}F ox-LDL 的上述培养基后, 再分别加入 50 倍 (400 mg/L) 未标记的 r-LDL、ox-LDL、ac-LDL 以及 250 mg/L LOX-1 受体阻滞剂聚肌苷酸和爱兰苔胶, 再进行放射配基结合试验。其余操作步骤同前。重复 4 次。

1.6 乳酸脱氢酶活性及培养的人脐静脉内皮细胞存活率测定

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定采用 2,4-二硝基苯肼法。取培养的亚汇合状态的单层 hUVEC, 分别加入终浓度为 0、10、20、50、100 及 200 mg/L ox-LDL; 另两孔分别加入 250 mg/L 聚肌苷酸或爱兰苔胶预先培养 2 h, 再加入 50 mg/L ox-LDL 培养 24 h, 然后测定每孔培养基 LDH 释放量。hUVEC 存活率采用台盼兰染色法。单层细胞用 0.1% 台盼兰染色, 台盼兰可以透入死亡的细胞, 但不能进入成活

的细胞,因此相差显微镜下见死亡细胞兰染,而成活的细胞在镜下透亮,计数 200 个细胞,计算存活率。

1.7 统计学方法

所有实验数据用 SPSS10.0 建立数据库,多组比较采用方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用 S-N-K 检验。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对培养的人脐静脉内皮细胞形态学的影响

相差显微镜下观察可见,培养的 hUVEC 呈铺路石状镶嵌排列,细胞为扁平多角形,边界清楚,胞浆丰富;人第 11 因子相关抗原的 SP 免疫组织化学可见细胞浆内有棕黄色的阳性染色颗粒,证实培养的细胞为内皮细胞;透射电镜下观察到胞浆内有特征性标志的 Weibel-Palade 小体(W-P 小体),其横切面呈圆形或椭圆形,纵切面呈杆状,均可见小管状结构。但加入 ox-LDL 24 h 后,hUVEC 明显收缩,呈长梭形,细胞间隙明显增大,细胞间出现孔状空隙,胞浆内见较多空泡,胞核膜模糊,有较多的细胞变圆脱落,培养基中有细胞碎片。

2.2 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 受体结合试验

由图 1(Figure 1)可见在细胞数量固定的时候,随着¹²⁵I-ox-LDL 的增加,与 hUVEC 的结合量也增加,Scatchard 曲线(图 2, Figure 2)呈斜率为负值的直线($r = 0.975, P < 0.001$),¹²⁵I-ox-LDL 与 hUVEC 特异结合反应的 Kd 值为 38.4 ± 18.8 mg/L, hUVEC 细胞膜上 LOX-1 的 Bmax 为 181.5 ± 55.5 ng/ 10^6 cells。

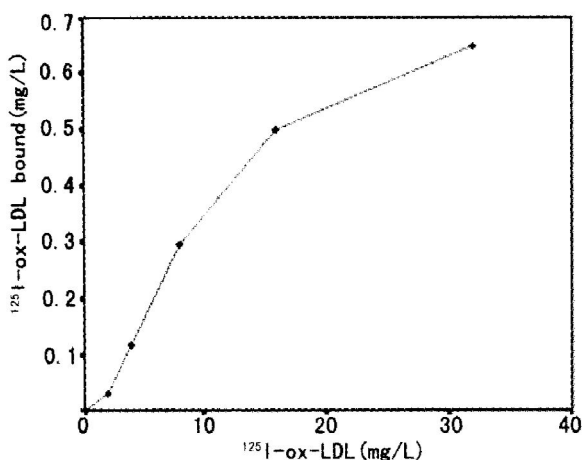


图 1. ¹²⁵I 标记的氧化型低密度脂蛋白与人脐静脉内皮细胞的结合曲线

Figure 1. Binding curve of ¹²⁵I ox-LDL and hUVEC

2.3 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的竞争抑制实验

过量未标记的 ox-LDL 及 LOX-1 受体阻滞剂聚肌苷酸与爱兰苔胶可显著降低 hUVEC 与¹²⁵I-ox-LDL 结合,而过量未标记的 nr-LDL 和 ac-LDL 对 hUVEC 与¹²⁵I-ox-LDL 的结合没有影响(表 1, Table 1)。

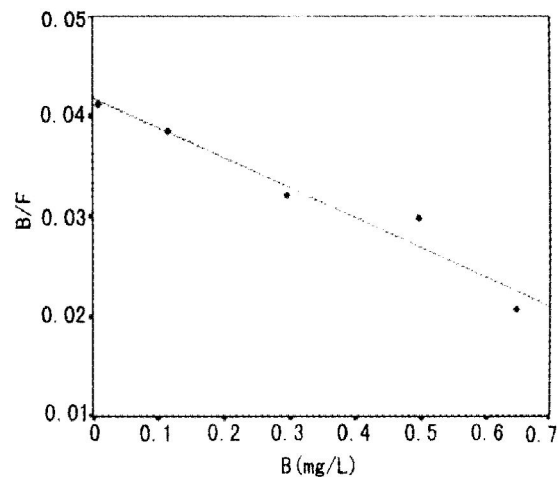


图 2. ¹²⁵I 标记的氧化型低密度脂蛋白与人脐静脉内皮细胞结合的 Scatchard 分析

Figure 2. Scatchard plot from the binding of ¹²⁵I ox-LDL and hUVEC

表 1. 不同化合物对人脐静脉内皮细胞结合¹²⁵I 标记的氧化型低密度脂蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1. Effects of different LDL and LOX-1 blockers on ¹²⁵I ox-LDL binding in hUVEC

分组	¹²⁵ I-ox-LDL 结合率/对照组
¹²⁵ I-ox-LDL(对照组)	100.0% \pm 13.3%
¹²⁵ I-ox-LDL+ 400 mg/L ox-LDL	35.4% \pm 8.0% ^a
¹²⁵ I-ox-LDL+ 250 mg/L 聚肌苷酸	53.2% \pm 6.2% ^a
¹²⁵ I-ox-LDL+ 250 mg/L 爱兰苔胶	53.9% \pm 6.0% ^a
¹²⁵ I-ox-LDL+ 400 mg/L nr-LDL	102.6% \pm 18.6%
¹²⁵ I-ox-LDL+ 400 mg/L ac-LDL	98.1% \pm 9.5%

a: $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.4 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞释放乳酸脱氢酶的影响

在培养的 hUVEC 中加入不同剂量的 ox-LDL(0 ~ 200 mg/L),随着 ox-LDL 剂量的增加,培养基中 LDH 的量显著增加($P < 0.01$),预先用聚肌苷酸或爱兰苔胶与 hUVEC 培养 2 h,则可以显著降低 hUVEC 释放 LDH 的量($P < 0.01$)。见表 2 (Table 2)。

2.5 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞存活率的影响

50 mg/L ox-LDL 与 hUVEC 培养显著降低 hUVEC 的存活率, 预先用聚肌苷酸或爱兰苔胶与 hUVEC 培养 2 h, 再加入 50 mg/L ox-LDL, 则不影响培养 hUVEC 的存活率(表 3, Table 3)。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白、聚肌苷酸和爱兰苔胶对培养的人脐静脉内皮细胞释放乳酸脱氢酶的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2. Effects of ox-LDL, poly(I) and carrageenan on LDH release in cultured hUVEC

分 组	乳酸脱氢酶含量 (ku/g protein)
0 mg/L ox-LDL	0.064 ± 0.022
10 mg/L ox-LDL	0.111 ± 0.012 ^a
20 mg/L ox-LDL	0.354 ± 0.023 ^a
50 mg/L ox-LDL	0.530 ± 0.028 ^a
100 mg/L ox-LDL	0.686 ± 0.025 ^a
200 mg/L ox-LDL	0.770 ± 0.044 ^a
50 mg/L ox-LDL+ 250 mg/L 聚肌苷酸	0.323 ± 0.018 ^b
50 mg/L ox-LDL+ 250 mg/L 爱兰苔胶	0.294 ± 0.024 ^b

a: $P < 0.01$, 与 0 mg/L ox-LDL 组相比; b: $P < 0.01$, 与 50 mg/L ox-LDL 组相比。

表 3. 氧化型低密度脂蛋白、聚肌苷酸或爱兰苔胶对培养的人脐静脉内皮细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3. Effects of ox-LDL, poly(I) and carrageenan on cell viability of hUVEC

分 组	存活率
0 mg/L ox-LDL	95.6% ± 3.8%
50 mg/L ox-LDL	80.7% ± 4.9% ^a
50 mg/L ox-LDL+ 250 mg/L 聚肌苷酸	89.6% ± 4.1%
50 mg/L ox-LDL+ 250 mg/L 爱兰苔胶	90.7% ± 5.0%

a: $P < 0.01$, 与 0 mg/L ox-LDL 组相比。

3 讨论

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)在致动脉粥样硬化的病理过程中起着关键的作用。ox-LDL 不仅可以降低 NO 介导的血管舒张作用并促进白细胞募集于血管壁^[4], 而且还诱导与内皮细胞凋亡有关的基因, 如 bcl-2 和 fas 的表达, 从而损伤血管内皮细胞^[5]。近年发现血管内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 是通过 LOX-1 的受体途径, 这个受体在结构上属于 C 型血凝素家族, 与已发现的 ox-LDL 清道夫受体没有任何结构上的同源性。LOX-1 与 ox-LDL 特异结

合, 介导 ox-LDL 进入血管内皮细胞, 不仅引起内皮细胞功能紊乱, 而且促进白细胞募集于血管壁, 促进 As 的发生与发展。另外研究还发现, ox-LDL 可以上调血管内皮细胞 LOX-1 mRNA 及蛋白的表达^[6], 提示 LOX-1 的表达在摄取 ox-LDL 和引起细胞损伤方面起着重要的作用。

本研究以培养的 hUVEC 为研究对象, 证实 hUVEC 存在一个 Kd 为 38.4 ± 18.8 mg/g 的与 ox-LDL 高亲和的 LOX-1 受体, 用不同浓度的 ox-LDL 与 LOX-1 一起培养, LOX-1 与 ox-LDL 的结合量随着 ox-LDL 浓度的增加而增多, 与此同时细胞形态结构的损伤与细胞死亡率也相应地增加, 但 nr-LDL 和 ac-LDL 却没有上述作用。ox-LDL 与 LOX-1 的结合而导致的 hUVEC 损伤可以部分被 LOX-1 受体的化学阻滞剂聚肌苷酸和爱兰苔胶阻断, 提示 ox-LDL 诱导内皮细胞的损伤是通过 LOX-1 的受体机制进行。

天然低密度脂蛋白(nr-LDL)受到氧化修饰以后会产生脂质过氧化物, 脂质过氧化过程中产生的醛自由基可在载脂蛋白 B100 的赖氨酸残基形成 Schiff 碱, 从而使 ox-LDL 颗粒带上负电荷, 因而易于与 A 类清道夫受体的带正电荷的胶原样结构的区域结合^[7], 因此 A 型清道夫受体可识别多种带负电荷的大分子配基, 包括 ox-LDL、ac-LDL, 识别谱较广。但在本研究中, LOX-1 受体只能识别 ox-LDL 而非 ac-LDL, 因此 LOX-1 与 ox-LDL 的结合机制可能不能简单用 ox-LDL 所带的负电荷的机制来解释。因此进一步阐明 ox-LDL 与 LOX-1 结合的受体-配体作用的分子机制, 可为 As 的治疗提供一个新的目标。

[参考文献]

- [1] Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 199-206
- [2] 艾宝民, 夏敏, 唐志红, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响及可能机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 114-117
- [3] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Aiba Y, Tanaka T, et al. A novel receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 1997, **386** (6): 73-77
- [4] 李素敏, 郭恒怡, 吴其夏. 弱氧化型低密度脂蛋白的致动脉粥样硬化作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 271-274
- [5] Li DY, Yang BC, Mehta JL. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PI3K, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol*, 1998, **275** (2 pt 2): H568-H576
- [6] Li DY, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein 1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 2000, **101** (25): 2 889-895
- [7] Moriwake H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, et al. Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (10): 1 541-547

(此文编辑 文玉珊)