

培养的人动脉平滑肌细胞诱导高密度脂蛋白氧化修饰

江 渝¹, 刘 红², 彭家和¹, 叶治家¹, 何凤田¹, 董燕麟¹

(第三军医大学 1. 基础部生物化学与分子生物学教研室, 重庆市 400038; 2. 新桥医院血液科, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 培养细胞诱导高密度脂蛋白氧化修饰; 蛋白电泳迁移率; 高密度脂蛋白; 人动脉平滑肌细胞; 氧化修饰; 细胞培养

[摘要] 目的 探讨高密度脂蛋白氧化修饰发生的机制。方法 利用体外培养的人动脉平滑肌细胞与人血浆高密度脂蛋白共同温育后, 用琼脂糖凝胶电泳方法观察高密度脂蛋白电泳迁移率, 紫外分光光度法测定高密度脂蛋白共轭二烯的含量, 利用荧光分光光度法测定其硫代巴比妥酸反应物质的量, 用可见分光光度法测定高密度脂蛋白的脂氢过氧化物含量。结果 人血浆高密度脂蛋白与人动脉平滑肌细胞共同培养 48 h 后, 与天然高密度脂蛋白比较, 其电泳迁移率明显增加, 其共轭二烯、硫代巴比妥酸反应物质及脂氢过氧化物的含量均比天然高密度脂蛋白显著增加 ($P < 0.01$)。结论 体外培养人动脉平滑肌细胞能使高密度脂蛋白发生氧化修饰。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Oxidative Modification of High Density Lipoprotein Induced by Cultured Human Arterial Smooth Muscle Cell

JIANG Yu, LIU Hong, PENG Jia-He, YE Zhi-Jia, HE Feng-Tian, and DONG Yan-Lin

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] High Density Lipoprotein; Human Arterial Smooth Muscle Cell; Oxidative Modification; Agarose Gel Electrophoresis Mobility; Thiobarbituric Acid Reaction Substance; Lipid Hydroperoxide; Conjugated Diene

[ABSTRACT] Aim To observe the mechanism of oxidative modification of high density lipoprotein induced by cultured human arterial smooth muscle cell. Methods The oxidative modification of high density lipoprotein was identified by agarose gel electrophoresis mobility change, absorbance at 234 nm by ultraviolet light, level of lipid hydroperoxide by visible light and fluorescence of thiobarbituric acid reaction substance of human plasma high density lipoprotein.

Results The electrophoretic mobility of high density lipoprotein was increased and absorbance at 234 nm, lipid hydroperoxide and thiobarbituric acid reaction substance of high density lipoprotein incubated by cultured human arterial smooth muscle cell were significantly higher than that of the native high density lipoprotein. Conclusion Oxidative modification of high density lipoprotein could be induced by cultured human arterial smooth muscle cell.

大量流行病学、临床病理及动物实验研究表明, 血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 与冠心病和脑卒中等心血管疾病的发生呈负相关。近年来本室^[1,2]及国外的研究发现, HDL 一旦发生氧化修饰后, 即具有较强的致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作用。进一步研究发现, 在实验性高胆固醇血症家兔及内源性高甘油三酯血症患者体内不仅存在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 而且也存在氧化型极低密度脂蛋白 (oxidized very low density lipoprotein,

ox-VLDL) 及氧化型高密度脂蛋白 (oxidized high density lipoprotein, ox-HDL), 说明在某些特殊情况下体内 HDL 可发生氧化修饰。以前对 LDL 和 VLDL 的氧化修饰机制研究较多, 而对 HDL 氧化修饰机制研究报道较少。由于平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 尤其是人动脉 SMC 体外培养较困难等原因, 使有关 SMC 在 As 发生中作用的研究工作受到限制, 迄今尚少见有关培养人动脉 SMC 诱发 HDL 氧化修饰的报道, 我们对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM 培养基 (GIBCO, BRL)、新生小牛血清 (本室制)、HEPES (MERCK)、胰蛋白酶 (DIFCO, 上海化学试剂站进口分装)、配制消化液与 Hank 氏液所需其它试剂均为国产分析纯, L-谷氨酰胺、丙酮酸

[收稿日期] 2004-04-14 [修回日期] 2004-12-29

[基金项目] 重庆市医学科学研究基金项目 (00-2005)

[作者简介] 江渝, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化分子机理研究, 电话为 023-68752262, E-mail 为 yujiang@mail.tmmu.com.cn。何凤田, 博士, 副教授, 主要从事分子免疫学研究工作。董燕麟, 教授, 主要从事蛋白质代谢研究工作。

钠(SIGMA)、青霉素、链霉素、庆大霉素(华北制药厂),二氧化碳温育箱(QUENE, USA)。琼脂糖(agarose)和1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷(TEP)购于美国Sigma公司; 55P-72 冷冻制备型超速离心机(Hitachi, Japan); RF-510 荧光分光光度仪和UV-120-02型紫外分光光度仪(岛津, Japan)。

1.2 人血浆高密度脂蛋白的制备

新鲜人血浆购自重庆市中心血站,采用张林华等^[3]一次性密度梯度超速离心法分离HDL。按Lowry法测定纯化的HDL蛋白含量。分离的HDL置于0.2% EDTA的PBS透析48 h。经琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度符合要求。

1.3 人动脉平滑肌细胞的培养及分组

培养人动脉SMC采用水囊引产胎儿,胎龄18周,引产后立即取材,贴块法原代培养及传代培养,实验组用第10~15代细胞。按传代法制备SMC细胞悬液,接种于大号培养瓶中,细胞密度 $10^7 \sim 10^8/L$,48 h后弃培养基,用Hank氏液洗涤3次,加入适量的无血清培养基(DMEM),继续培养24 h,弃DMEM,加3% LPDS无血清培养基和HDL使其终浓度为50 mg/L;对照组无SMC,仅有HDL和3% LPDS无血清培养基。分别继续培养24和48 h,然后纯化HDL组分,分别测定实验组和对照组HDL的共轭二烯(conjugated diene, CD)、脂氢过氧化物(lipid hydroperoxide, LOOH)及硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reaction substance, TBARS)。重复实验5次以上。

1.4 脂蛋白共轭二烯、脂氢过氧化物和硫代巴比妥酸反应物质的测定

在234 nm波长下,用紫外分光光度计测定共轭二烯光吸收值。在560 nm波长下,用日本岛津UV-120-02型紫外分光光度计测定脂氢过氧化物光吸收值^[4]。在激发光为515 nm、发射光为550 nm条件下用荧光分光光度计测定硫代巴比妥酸反应物质荧光强度值,以四乙氧基丙烷(TEP)为标准,计算TBARS的含量^[4]。

1.5 脂蛋白琼脂糖凝胶电泳

用苏丹黑B预染正常人血浆HDL及ox-HDL,在0.5%琼脂糖凝胶上(10 V/cm)电泳20~30 min。

1.6 统计学处理

采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定

由图1(Figure 1)可见,LDL和HDL与正常人

血清LDL和HDL组分电泳迁移率一致,而经过与人动脉平滑肌细胞保温后的低密度脂蛋白、高密度脂蛋白电泳迁移率则明显增加,表明平滑肌细胞不仅能使低密度脂蛋白发生氧化修饰,而且也能使高密度脂蛋白发生氧化修饰。

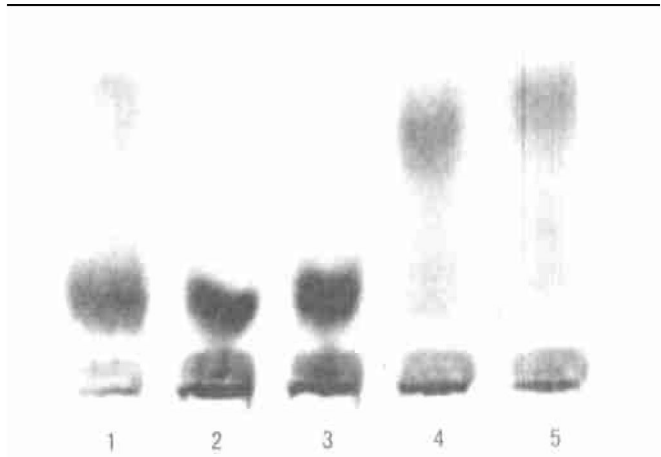


图1. 琼脂糖凝胶电泳 1为正常人血清;2为低密度脂蛋白;3为氧化型低密度脂蛋白;4为高密度脂蛋白;5为氧化型高密度脂蛋白。

Figure 1. Agarose gel electrophoresis

2.2 平滑肌细胞对共轭二烯、脂氢过氧化物和硫代巴比妥酸反应物质水平的影响

实验组共轭二烯234 nm光吸收值、脂氢过氧化物含量及TBARS值均显著高于对照组($P < 0.01$)。表明培养人动脉SMC和HDL保温48 h后,HDL即能发生氧化修饰(表1, Table 1)。

表1. 平滑肌细胞对氧化型高密度脂蛋白组分共轭二烯、脂氢过氧化物和硫代巴比妥酸反应物质的影响

Table 1. Identification of ox-HDL of CD, LOOH, TBARS with SMC culture

分 组	CD (/mg HDL)	LOOH ($\mu\text{mol/g HDL}$)	TBARS ($\mu\text{mol/g HDL}$)
对照组	0.636	7.152	0.476
实验组	1.230 ^a	13.194 ^a	1.100 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

大量流行病学、临床病理及动物实验研究均表明,高密度脂蛋白有抗动脉粥样硬化作用,当在特殊情况如高脂血症^[5,6]时,在体内高密度脂蛋白可发生氧化修饰,氧化型高密度脂蛋白具有致动脉粥样硬化作用。

实验表明,在动脉壁内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞中的脂加氧酶作用下,低密度脂蛋白在体内可发生氧化修饰^[4],其多不饱和脂肪酸双键重排,产生共轭二烯,在 234 nm 呈现特征性吸收峰。因此,低密度脂蛋白发生氧化修饰后,234 nm 光吸收增加。此外,在低密度脂蛋白氧化修饰过程中,脂肪酸氧化断裂生成具有极高反应活性的中间产物如醛类和酮类物质,这二类物质可与载脂蛋白发生结合反应,导致低密度脂蛋白的负电荷增加,因此电泳迁移率比天然低密度脂蛋白增加。当低密度脂蛋白发生氧化修饰后,氧化产物如丙二醛增加,TBARS 也随之增加,脂氢过氧化物(LOOH)含量增加。因此,可用脂蛋白电泳迁移率、234 nm 光吸收、LOOH 及 TBARS 增加来鉴定低密度脂蛋白是否发生氧化修饰。从化学成分分析,与低密度脂蛋白一样,高密度脂蛋白分子也含有多不饱和脂肪酸,推测高密度脂蛋白和低密度脂蛋白一样也能发生氧化修饰而产生类似的化学变化。因此,高密度脂蛋白氧化修饰可用脂蛋白电泳、234 nm 光吸收、LOOH 及 TBARS 等方法来确定。

以往实验研究表明,活体内在某些特殊情况下(如高脂血症等)高密度脂蛋白能发生氧化修饰。本研究通过培养人动脉平滑肌细胞与高密度脂蛋白保温 48 h 后,高密度脂蛋白电泳迁移率、CD、LOOH 及 TBARS 均显著增加($P < 0.01$),表明培养人动脉平滑肌细胞能使高密度脂蛋白发生氧化修饰。推测平滑肌细胞在与高密度脂蛋白保温过程中,激活了平滑肌细胞内脂加氧酶,该酶催化高密度脂蛋白分子内的多不饱和脂肪酸发生氧化,不饱和脂肪酸双键重排,产生共轭二烯,其结果为电泳迁移率增加,LOOH、TBARS 及 CD 含量增高。本实验进一步阐明了血管平滑肌细胞可能是高密度脂蛋白在体内发生氧化修饰的部位。

近年研究表明,高密度脂蛋白易被氧化修饰成氧化型高密度脂蛋白,氧化型高密度脂蛋白可抑制血管内皮细胞和平滑肌细胞一氧化氮合酶的表达,从而减少一氧化氮的产生^[7]。另外,氧化型高密度脂蛋白还可促进一氧化氮失活。因此,氧化型高密度脂蛋白可从减少生成和促进灭活两方面导致一氧化氮的下降。一氧化氮可抑制血管平滑肌细胞增殖和脂蛋白的氧化,从而具有抗动脉粥样硬化作用。这样,氧化型高密度脂蛋白使一氧化氮减少,而一氧化氮减少又使脂蛋白易于氧化,即形成一个促进动脉粥样硬化的恶性循环。我们及国外实验室的研究证实,氧化型高密度脂蛋白可引起培养人动脉平滑

肌细胞胆固醇流出减少,平滑肌细胞 α -fos、PDGF 受体及 cyclinD1 等基因表达增加^[8,9],氧化型高密度脂蛋白可激活核因子 κ B^[10] 信号传导通路,最终导致平滑肌细胞的增殖^[11],而平滑肌细胞的增殖在动脉粥样硬化发生中起重要作用。综合以往研究可得出,氧化型高密度脂蛋白可能在动脉粥样硬化发生发展中发挥重要作用。因此,我们认为在对动脉粥样硬化发病机制的研究中,不仅应注意氧化型低密度脂蛋白和氧化型 V 低密度脂蛋白的形成机制和作用,而且也应加强对氧化型高密度脂蛋白的形成机制和作用的研究。为了防止脂蛋白的氧化和动脉粥样硬化的发生,抗氧化修饰已成为脂蛋白与动脉粥样硬化研究的一个重点。目前已发现不少抗氧化剂可以抑制脂蛋白的氧化^[12],如 BHT 和丙丁酚等,其中一些已被作为药物用于治疗高脂血症及冠心病。这些化合物均能有效抑制脂蛋白的氧化,但却具有某些副作用。一些天然生物抗氧化剂如维生素 E、维生素 C 及胡萝卜素已用于脂蛋白的抗氧化研究。研究发现,体内补充维生素 E 或维生素 C 均可降低脂蛋白对 Cu^{2+} 诱导氧化修饰的敏感性并能预防冠心病的发生。

[参考文献]

- [1] 江渝,刘秉文,覃扬,孙芝琳. 氧化修饰高密度脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞原癌基因 α -fos 及 PDGF 受体基因表达的影响. 华西医科大学学报, 2000, **31**: 37-41
- [2] Liu BW, Jiang Y, Fu MD, Liu Y, Fan P. Oxidative modification of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients and hypercholesterolemic rabbits in vivo. *Molecular Cell Biochem*, 2000, **207**: 131-135
- [3] 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. 生物化学与生物物理学报, 1989, **21**: 257-260
- [4] 朱惠莲,侯孟君,李燕,郑佩英,凌文华. 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. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 383-386
- [5] Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1 785-792
- [6] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1994, **362**: 801-809
- [7] 胡厚源,陈运贞. 氧化修饰高密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞一氧化氮合酶活性的影响及药物干预. 重庆医学, 2000, **29**: 385-387
- [8] 江渝,刘秉文,覃扬,孙芝琳. 氧化修饰高密度脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞周期蛋白 D1 基因表达的影响. 中国生物化学与分子生物学, 1999, **15**: 978-982
- [9] 傅强,刘秉文. 氧化修饰使 HDL 促动脉平滑肌细胞胆固醇流出减少. 生物化学与生物物理学报, 2000, **32**: 248-252
- [10] Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T. NF- κ B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303** (1): 313-319
- [11] Girona J, LaVigne AE, Sola R, Motta C, Masana L. HDL derived from the different phases of conjugated diene formation reduces membrane fluidity and contributes to a decrease in free cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1633** (3): 143-148
- [12] Ferretti G, Bacchetti T, Menanno F, Curatola G. Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). *Atherosclerosis*, 2004, **172** (1): 55-61

(此文编辑 朱雯霞)