

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0186-03

氧化型高密度脂蛋白对细胞凋亡及细胞内钙离子浓度的影响

李莹¹, 张泉三¹, 曾智²

(1. 青岛市市立医院急诊科, 山东省青岛市 261001; 2. 四川大学华西医院心内科, 四川省成都市 610042)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高密度脂蛋白; 脂质过氧化; ECV304 细胞; 动脉粥样硬化; 细胞凋亡; 钙离子

[摘要] 目的 通过研究氧化型高密度脂蛋白对培养的内皮细胞致凋亡以及细胞内钙离子浓度的影响, 阐述其致动脉粥样硬化机理, 并探讨其引起细胞损伤的机制。方法 用铜离子引发脂质过氧化过程, 制备氧化型高密度脂蛋白, 用 MTT 检测法检测细胞活性, PI 染色法检测细胞凋亡。结果 氧化型高密度脂蛋白可诱导内皮细胞发生凋亡; 细胞内钙离子浓度则随氧化型高密度脂蛋白浓度的升高呈现逐渐下降的趋势。结论 氧化型高密度脂蛋白引起细胞损伤的机制可能与钙离子浓度升高有关, 体内氧化型高密度脂蛋白通过内皮细胞凋亡的途径损伤血管内皮, 引发动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Oxidized High Density Lipoprotein on Apoptosis and Intracellular Free Calcium Concentration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LI Ying¹, ZHANG Quansan¹, and ZENG Zhi²

(1. Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 261001; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of West China University, Chengdu 610042, China)

[KEY WORDS] Oxidized High Density Lipoprotein; Endothelium; Atherosclerosis; Apoptosis; Intracellular Free Calcium Concentration; PI Staining; Scanning Electronic Microscopy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of oxidized high density lipoprotein (ox-HDL) on apoptosis and intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of human umbilical endothelial vein cells and to infer its possible mechanism of this ECV304 injury. **Methods** Ox-HDL was incubated with Cu^{2+} , and different concentrations of ox-HDL was incubated with endothelial cells. PI staining test was conducted to analyze apoptosis index, and $[Ca^{2+}]_i$ was determined by fluo-3/AM, the injury of cells was observed by scanning electronic microscopy (SEM). **Results** High concentration ox-HDL can induce the injury and apoptosis of ECV304 cells; the level of intracellular free calcium concentration also increase with the increasing concentration of the ox-HDL. In detail, with the prolongation of incubation period, the endothelial injury, apoptosis and intracellular calcium also increased. **Conclusions** High concentration ox-HDL showed synergistically injurious effects on endothelial cells, which aggravated the apoptosis and intracellular free calcium concentration of ECV304 cells. This may at least partly attribute to the hypothesis that the increase of intracellular calcium may mediate the apoptosis of the endothelial cells, which plays a role in the development of atherosclerosis.

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) 具有抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作用^[1]。但是高密度脂蛋白发生氧化修饰后其性质发生了显著变化, 其硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reaction substance, TBARS) 含量增加、共轭二烯 (CD) 生成、负电荷增加、电泳迁移率增加^[2], 使氧化型

HDL (oxidized HDL, ox-HDL) 具有较强的致 As 作用。本实验旨在研究不同浓度 ox-HDL 对内皮细胞形态、凋亡率及细胞内钙离子浓度的影响, 并探讨 ox-HDL 引起细胞损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与分组

从液氮罐中取出冻存的内皮细胞株 ECV304 投入 37℃ 温水中, 摇动使其尽快解冻。按常规方法复苏、培养和传代。以含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 完全培养基 (含青霉素和链霉素各 10^5 u/L), 置于 37℃、5% CO_2 潮湿孵箱中培养, 2~3 天细胞即可

[收稿日期] 2003-06-10 [修回日期] 2005-01-20

[作者简介] 李莹, 硕士研究生, 联系电话为 0532-2789120, E-mail 为 alying@hotmail.com。张泉三, 副教授, 联系电话为 0532-2789167。曾智, 教授, 联系电话为 028-85452005, 为本文通讯联系人。

长满为单层, (11)因子相关抗原检测为阳性。

实验共分为 6 组。第 1 组为空白对照组; 第 2 组加入 75 mg/L HDL, 第 3 组加入 75 mg/L ox-HDL; 第 4 组加入 100 mg/L ox-HDL; 第 5 组加入 200 mg/L ox-HDL; 第 6 组加入 300 mg/L ox-HDL。各项观察与检测分别在 24 h、48 h 和 72 h 时进行。

1.2 脂蛋白的分离和氧化修饰

采用一次性密度梯度超速离心法分离人血浆 HDL(包括 HDL₂ 和 HDL₃)等^[3], 采用 Cu²⁺ 介导法进行氧化修饰, 每 0.5 g 蛋白/L HDL 与 10 μmol/L 的 CuSO₄ 于 37 °C、5% CO₂ 潮湿孵箱中共同孵育 24 h, 然后以 20 倍体积的 10 mmol/L PBS(pH7.4) 透析 24 h 以上, 每 8 h 换液一次, 以去除 Cu²⁺ 和可溶性的过氧化产物。硫代巴比妥酸反应产物荧光检测法测定 HDL 氧化前后丙二醛的含量分别为 0.20 和 8.88 μmol/g 蛋白。

1.3 PI 染色流式细胞仪测定细胞凋亡^[4]

10⁶ 细胞胰酶消化后, 培养基洗涤一次, -20 °C 75% 乙醇固定过夜。染色前 PBS 洗涤细胞 2 次, PI 100 μL、PI 4 °C 避光染色 10 min, 流式细胞仪记录激发波长 488 nm 处的红色荧光, Lysis 软件分析测定细胞凋亡。

1.4 Fluor-3 负载法检测细胞内钙离子浓度^[5]

培养于盖片上的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)以 100 mg 蛋白/L 脂蛋白作用 24 h 后, 用无血清培养基洗 3 次, 37 °C 避光孵育于含 5 μmol/L Fluor-3/AM (Bio Rad) 的无血清培养基中, 60 min 后用不含 Fluor-3/AM 的同样培养基冲洗 3 次, 在激光共聚焦扫描显微镜下观察荧光强度, 检测条件同上。

1.5 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 显著性检验采用方差分析。

2 结果

2.1 氧化型高密度脂蛋白对内皮细胞的凋亡率的影响

氧化型高密度脂蛋白(200 mg/L)作用 72 h 后, 内皮细胞凋亡率与空白组相比升高($P < 0.05$); Ox-HDL(300 mg/L)作用 48 h 和 72 h 后, 内皮细胞凋亡率与空白组相比也明显升高(均 $P < 0.01$)。说明一定浓度的 Ox-HDL 作用内皮细胞一定时间后可导致内皮细胞凋亡率增加, 且 300 mg/L ox-LDL 组内皮细胞凋亡率大于 200 mg/L ox-LDL 组(表 1, Table 1)。

表 1. 氧化型高密度脂蛋白对内皮细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Effect of oxidized high density lipoprotein on the apoptosis of ECV304

分 组	24 h	48 h	72 h
对照组	2.10 ± 0.40	2.15 ± 0.81	2.30 ± 0.30
HDL (75 mg/L) 组	2.05 ± 0.30	2.08 ± 0.80	2.26 ± 0.25
Ox-HDL (75 mg/L) 组	2.31 ± 0.12	2.41 ± 0.14	2.58 ± 0.15
Ox-HDL (100 mg/L) 组	2.48 ± 0.31	2.54 ± 0.83	3.20 ± 0.25
Ox-HDL (200 mg/L) 组	3.13 ± 0.60	4.40 ± 1.10	4.60 ± 1.20 ^a
Ox-HDL (300 mg/L) 组	6.80 ± 2.51	8.53 ± 0.51 ^b	10.60 ± 2.51 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 氧化型高密度脂蛋白对细胞内钙离子浓度的影响

氧化型 HDL(100 mg/L)作用于内皮细胞 48 h, 可明显引起内皮细胞内钙离子浓度较对照组升高(70.2 ± 0.49 比 41.5 ± 8.1, $P < 0.05$)。当 ox-HDL 浓度上升为 200 mg/L 和 300 mg/L 时, 胞内钙离子浓度随之升高, 分别为 95.8 ± 11.6 和 128.6 ± 18.5, 与对照组相比 $P < 0.05$ 。说明 ox-HDL 可直接作用于内皮细胞, 引起细胞内钙离子浓度升高, 从而造成内皮细胞的损伤。

2.3 氧化型高密度脂蛋白对内皮细胞的形态学的影响

倒置相差显微镜下可以看到(图 1, Figure 1), 200 mg/L 氧化型高密度脂蛋白作用 24 h 时细胞排列有些杂乱、皱缩变形, 部分细胞核内染色质浓集、边聚、核仁消失、核内空旷, 变圆、略浮起的细胞增多, 但未脱壁; 200 mg/L 和 300 mg/L 氧化型高密度脂蛋白作用 48 h 时, 较多细胞肿胀变圆、边界欠清、核仁消失、并可见部分细胞已浮起、形成小片脱失区, 而且氧化型高密度脂蛋白浓度为 300 mg/L 时, 24 h 即可出现上述变化。

3 讨论

细胞凋亡是细胞在自身基因调控下, 启动其内部机制, 由内源性 DNA 内切酶激活而发生的一种主动性死亡的过程^[6]。在 As 斑块中, 细胞凋亡和增殖明显加剧^[7]。本实验发现, 随氧化型高密度脂蛋白浓度的增加和作用时间延长, 内皮细胞损伤程度逐渐加重, 不但呈现损伤的形态学改变还可引起内皮细胞凋亡。因此, 改善血脂水平, 防止各种因素对脂蛋白成份的氧化, 将会在一定程度上预防动脉粥样硬化的发生^[8]。

氧化型高密度脂蛋白不但可引起细胞凋亡, 还

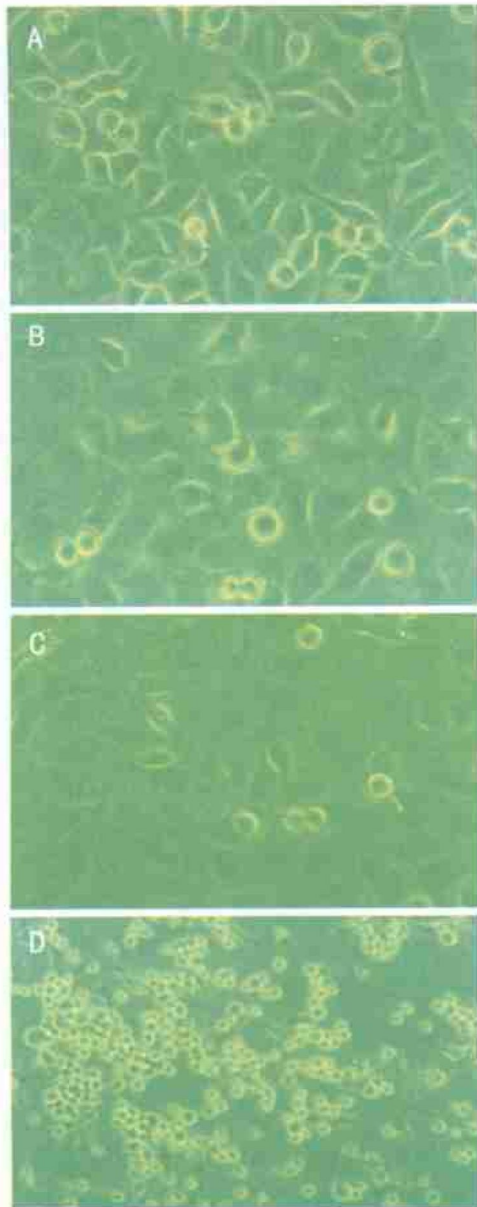


图 1. 氧化型高密度脂蛋白对内皮细胞形态学的影响(100×) A 为 200 mg/L ox-HDL 作用 24 h, 部分细胞皱缩, 间隙增宽, 少量细胞变圆, 可见染色体边聚、核内空旷、核仁消失。B 为 200 mg/L ox-HDL 作用 48 h, 一些细胞已变圆略浮起, 周围尚存较多形态正常的细胞, 显示已经有损伤作用。C 为 300 mg/L ox-HDL 作用 48 h, 左侧细胞肿胀变形、边界模糊、细胞内颗粒增多, 右侧细胞变圆浮起, 显示出较重的损伤作用。D 为 300 mg/L ox-HDL 作用 72 h, 细胞大多变圆浮起, 胞浆内有较多空泡, 显示干预因素对细胞有较强毒性作用。

Figure 1. Effect of ox-HDL on the cytomorphology

可以促进细胞膜 Ca^{2+} 内流, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度增

加^[9]。内皮细胞内游离钙浓度的突然大幅度升高或达到一定的浓度, 可导致内皮细胞损伤及死亡^[10]。本实验发现, 高浓度 ox-HDL 作用一定时间后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度明显上升, 而且随 ox-HDL 浓度的升高, Ca^{2+} 变化呈现剂量依赖性。因此, Ca^{2+} 信号转导通路的激活可能是氧化型高密度脂蛋白造成内皮细胞损伤的机制^[11]。但这种钙浓度的升高是否由于细胞摄取细胞外钙和(或)细胞内钙释放以及其与细胞凋亡的关系目前均不清楚。近年来, 关于氧化型脂蛋白与细胞特异受体结合激活细胞内第二信使而产生一系列生物效应的信号转导通路的研究越来越受到关注^[12]。ox-HDL 引起细胞内 Ca^{2+} 水平升高的机制可能与 ox-LDL 类似^[13]: 激活肌醇磷脂途径, 促进细胞内 Ca^{2+} 的释放; ④氧化脂蛋白使细胞膜胆固醇含量和微粘度增加以及腺苷酸环化酶、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降, 从而促进了细胞外 Ca^{2+} 内流。

[参考文献]

- [1] Kwiterovich Po Jr. The antiatherogenic role of high density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*, 1998, **82** (9A): 13Q-21Q
- [2] Francis GA. High density lipoprotein oxidation in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1483** (2): 217-235
- [3] Liu Bv, Jiang Y, Fu MD. Oxidative modification of semi LDL, VLDL and HDL in vivo. *Atherosclerosis*, 1997, **134** (1-2): 224
- [4] Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Nakamura H, et al. Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells. *Ann Clin Biochem*, 2000, **37** (Pt2): 179-186
- [5] Thomas MJ, Chen Q, Zabalawi M, Anderson R, Wilson M, Weinberg R, et al. Is the oxidation of high density lipoprotein lipids different than the oxidation of low-density lipoprotein lipids? *Biochemistry*, 2001, **40** (6): 1719-724
- [6] Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**: 61-74
- [7] Matsunaga T, Iguchi K, Nakajima T, Koyama I, Miyazaki T, Inoue I, et al. Glycated high density lipoprotein induces apoptosis of endothelial cells via a mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **287** (3): 714-720
- [8] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Cir Res*, 1998, **82**: 1111-120
- [9] Hurtado I, Fiol C, Gracia V. In vitro oxidized HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages. *Atherosclerosis*, 1996, **125**: 39-46
- [10] Bombelli T, Karsan A, Tait JF. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*, 1997, **89**: 2429-442
- [11] Isumi Y, Shoji H, Sugo S. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 1998, **139**: 838-846
- [12] Totani L, Cumashi A, Piccoli A. Polymorphonuclear leukocytes induces PDGF release from $\text{IL-1}\beta$ -treated endothelial cells: role of adhesion molecules and serine proteases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1534-540
- [13] Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: Colocalization with interleukin 1 beta converting enzyme. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 251-255

(此文编辑 朱雯霞)