

氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞表达 基质细胞衍生因子 1 α 的影响

吕运成^{1,2}, 王佐^{1,3}, 万炜², 危当恒^{1,3}, 姜志胜¹, 唐朝克¹, 王贵学³

(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 解剖学教研室, 湖南省衡阳市 421001;

3. 重庆大学生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆市 400044)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质细胞衍生因子 1 α ; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 动脉粥样硬化; 大鼠

[摘要] 目的 为探讨氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞上基质细胞衍生因子 1 α 表达的影响。方法 原代培养的大鼠血管平滑肌细胞, 与氧化型低密度脂蛋白共同孵育, 用逆转录聚合酶链反应检测基质细胞衍生因子 1 α mRNA, 免疫印迹检测其蛋白表达变化, 观察氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞表达基质细胞衍生因子 1 α 的剂量-时间效应。结果 原代培养的大鼠血管平滑肌细胞有基础水平的基质细胞衍生因子 1 α 表达, 且在 0~50 mg/L 范围内, 基质细胞衍生因子 1 α 表达量随氧化型低密度脂蛋白浓度增加而增加, 50 mg/L 可使基质细胞衍生因子 1 α 上调约 5 倍; 经 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白刺激 0~48 h, 其峰值在 12 h, 随后逐渐下降, 但仍维持在基础水平的 3 倍左右。结论 氧化型低密度脂蛋白上调大鼠血管平滑肌细胞的基质细胞衍生因子 1 α 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Expression of Stromal Cell Derived Factor-1 α in Rat Vascular Smooth Muscle Cell

LV Yunn Cheng^{1,2}, WANG Zuo^{1,3}, WAN Wei, WEI Dang-Heng, JIANG Zhi-Shehng¹, TANG Chao-Ke^{1,2}, and WANG Gui-Xue¹

(1. The Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University; 2. The Anatomy Division of Nanhua University, Hengyang, 421001, China; 3. Bioengineering College of Chongqing University and Key Lab for Biomechanics Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing, 400044, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell Derived Factor-1 α ; Oxidized Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cell; Atherosclerosis; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) expression in rat vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods and Results** Primary rat VSMC was incubated with different concentrations/time of ox-LDL. SDF-1 α mRNA and protein was revealed by RT-PCR and Western blot respectively. SDF-1 α was constitutionally expressed in rat VSMC and was concentration dependently up regulated by ox-LDL within 0~50 mg/L. 5 folds up regulation was induced by 50 mg/L ox-LDL; SDF-1 α expression was peaked at 12 h and then followed with a decline, but maintained at 3 folds level of basal expression. **Conclusion** Oxidized LDL powerfully induces upregulation of SDF-1 α in rat vascular smooth muscle cell.

基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell derived factor 1 α , SDF-1 α) 具有多种生物学功能。研究发现, 它在细胞迁移、胚胎发育、介导免疫缺陷病毒感染中起重要作用^[1]。由于参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成的细胞特别是来自血液中的细胞 (如单核细胞、血小板) 上有 CXCR4 受体, 所以, 近几年来 SDF-1 α 在 As 性疾病中的作用也开始引起重

视^[2~4]。作为血管壁主要细胞成分的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC), 在 As 性疾病的过程中起着重要的作用, 其是否表达 SDF-1 α , 目前没有任何直接的细胞学证据。故本文就是为了证实原代培养的 VSMC 能否表达 SDF-1 α , 并在此基础上研究氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 对 SDF-1 α 表达的影响。

[收稿日期] 2007-06-29 [修回日期] 2007-07-03

[基金项目] 中国博士后基金 (2005038472); 教育部重点科技基金项目 (104158); 湖南省自然科学基金 (06JJ5051)。

[作者简介] 吕运成, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机理, 联系电话为 13407341500, E-mail 为 lyc2cay99@163.com。通讯作者王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子靶标及筛药平台, E-mail 为 nb12@263.net。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠由南华大学实验动物部提供。新鲜冰冻血浆购自衡阳市中心血站。胎牛血清购自北京元

亨圣玛生物技术研究, DME 和 RPMI1640 购自 Invitrogen 公司。Trizol 为 Invitrogen 公司产品, 反转录试剂盒为 Promega 公司产品, $2 \times$ Taq PCR MasterMix 为天为时代公司产品。羊抗鼠 SDF-1 α 一抗及兔抗羊二抗均购于武汉博士德公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

将新鲜冰冻血浆解冻后作超速离心。首先 4°C 、42 000 r/min 离心 18 h, 吸除极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白, 收集下层液体, 加入溴化钾调整密度后再超离心 (4°C 、42 000 r/min) 20 h, 收集顶层橙黄色液体即得 LDL, 置 $10 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 液, 37°C 温育透析 24 h, 用含 $100 \mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 液室温透析 24 h, PBS 液 4°C 透析 24 h, 每 8 小时换液一次。过滤除菌, 4°C 保存。

1.3 大鼠血管平滑肌细胞原代培养

大鼠断头放血后, 无菌条件下取出胸腹主动脉段, 置于含 Hank's 液的小培养皿中漂洗 3 次, 洗净后剥除外膜, 纵行剖开血管, 刮掉内膜, 将剩余组织剪成 1 mm^2 的小块, 种植于培养瓶壁。置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 5~6 h 后, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放回培养箱内静止培养, 每 3 天换液一次。10 天后可见组织块长出细胞。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

将 $\alpha\text{-LDL}$ 处理后的 VSMC, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 $2 \mu\text{g}$ 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再取 $10 \mu\text{L}$ 逆转录产物进行 PCR 扩增。 94°C 温育 5 min 后, 94°C 变性 30 s $\rightarrow$ 60°C 复性 30 s $\rightarrow$ 72°C 延伸 30 s , 共 30 个循环, 末次循环 72°C 延伸 10 min。SDF-1 α 的引物序列: 上游 $5'$ -GGA CGC CAA GGT CGT CGC CGT G-3', 下游 $5'$ -TCG GGT CAA TGC ACA C-3'。PCR 扩增产物长度为 222 bp。 β -actin 的引物序列: 上游 $5'$ -AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3', 下游 $5'$ -CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3'。PCR 扩增产物长度为 138 bp。反应结束后, 取反应产物 $5 \mu\text{L}$ 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 β -actin 基因灰度值, 以二者的比值代表 SDF-1 α mRNA 的表达相对量。

1.5 Western blot 检测

在收获好的细胞中加入三去污剂裂解缓冲液裂解细胞, 于 4°C 离心 10 min, 弃除沉淀。取 $16 \mu\text{L}$ 蛋白质溶液加入 $5 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液中, 在 100°C 加热 10 min 以使蛋白质变性。用 15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转 PVDF 膜, 丽春红染色观

察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。封闭液封闭 2 h, 按 1:200 加入羊抗鼠 SDF-1 α 一抗, 4°C 培育过夜, TBST 洗 3 次, 1:2 000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗, 室温培育 1 h, TBST 洗 3 次, 用免疫印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 获取各条带的光密度值。

1.5 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白促进大鼠血管平滑肌细胞上基质细胞衍生因子 1 α 表达量效关系

基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α) 在培养的 VSMC 上有基础水平的表达, $\alpha\text{-LDL}$ 明显上调大鼠 VSMC 表达 SDF-1 α 。在 0~50 mg/L 的范围之内, 随 $\alpha\text{-LDL}$ 浓度升高, SDF-1 α 的表达亦逐渐增加, 2 mg/L 的 $\alpha\text{-LDL}$ 就具有显著上调 SDF-1 α 的作用, 当浓度为 50 mg/L 组, 其较对照组上调约 5 倍 (图 1)。

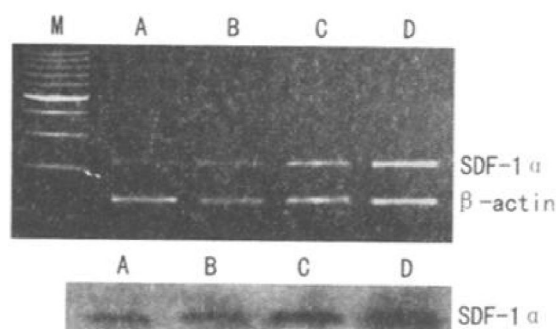


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞上基质细胞衍生因子 1 α 表达的影响 上图为 RT-PCR 检测 VSMC 经不同浓度的 $\alpha\text{-LDL}$ 处理 48 h 后 SDF-1 α mRNA 表达的改变。下图为 Western blot 检测 VSMC 经不同浓度的 $\alpha\text{-LDL}$ 处理 48 h 后 SDF-1 α 蛋白表达的改变。A 为 0 mg/L 组; B 为 2 mg/L 组; C 为 10 mg/L 组; D 为 50 mg/L 组。

表 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞上基质细胞衍生因子 1 α 表达的影响

浓度	mRNA	蛋白
0 (对照)	0.166 ± 0.02	0.499 ± 0.02
2 mg/L $\alpha\text{-LDL}$	0.379 ± 0.04^a	0.723 ± 0.02
10 mg/L $\alpha\text{-LDL}$	0.586 ± 0.02^a	0.844 ± 0.04^a
50 mg/L $\alpha\text{-LDL}$	0.811 ± 0.09^b	1.519 ± 0.05

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子 1 α 的表达的时效关系

用 50 mg/L 的 ox-LDL 与大鼠 VSMC 孵育 0~48 h, 当把 ox-LDL 加进去后立即终止转录反应(0 h), SDF-1 α 瞬时表达增高, 其约为基础水平的 3 倍($P < 0.05$), 随着 ox-LDL 处理时间的延长, SDF-1 α 的表达亦上调, 12 h 出现一个峰值, 随后逐渐回落, 但 48 h 的表达水平仍显著高于 0 h(图 2)。

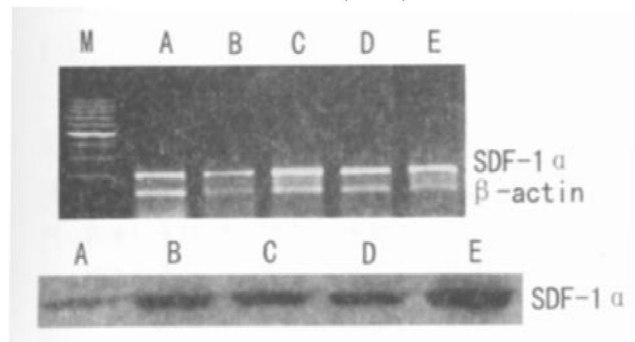


图 2. 平滑肌细胞经 50 mg/L 的 ox-LDL 处理不同时间后基质细胞衍生因子 1 α 表达的变化 上图为 RT-PCR 检测 VSMC 经 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 0、12、24、36、48 h 后 SDF-1 α 表达的变化。下图为 Western blot 检测 VSMC 经 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 0、12、24、36、48 h 后 SDF-1 α 表达的变化。A 为 0 h 组; B 为 12 h 组; C 为 24 h 组; D 为 36 h 组; E 为 48 h 组。

表 2. 平滑肌细胞经 50 mg/L 的氧化型低密度脂蛋白处理不同时间基质细胞衍生因子表达的变化

处理时间	mRNA	蛋白
0 h (对照)	0.040 ± 0.03	1.222 ± 0.02
12 h	1.754 ± 0.06 ^a	2.991 ± 0.19 ^a
24 h	1.444 ± 0.07 ^a	2.392 ± 0.42 ^a
36 h	1.567 ± 0.05 ^a	2.635 ± 0.31 ^a
48 h	3.155 ± 0.29 ^b	5.422 ± 0.50 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

动物水平的研究结果证实 SDF-1 α 与 As 密切相关。Abi-Younes 等^[2] 采用免疫组织化学及 Western blot 检测到 SDF-1 α 在斑块中高表达, 而正常动脉壁中未见表达, 并确认其主要在 VSMC 和内皮细胞等中表达。Andreas Schober 等^[3] 在载脂蛋白 E^{-/-} 鼠动脉内膜损伤后恢复覆盖的过程中亦检测到 SDF-1 α 的高表达, 并用双荧光染色法证实其表达的绝大部分位于 VSMC 上。Hideyasu Sakihama 等^[4] 在小鼠模型因移植排斥反应而出现的 As 病灶中检测到 SDF-1 α 表达上调。本文在培养的大鼠原代血管 VSMC 中

检测到极低水平的 SDF-1 α 表达, 可能是由于体内环境与培养条件的差异导致细胞基因表达谱的改变, 但经 ox-LDL 处理后 SDF-1 α 表达明显上调。

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 的致 As 作用已经被公认。然而, 其是否与血液来源的细胞参与 As 形成相关, 目前这方面的研究较少。由于血液中众多的细胞上均有 SDF-1 α 的孤寡受体 CXCR4, 如单核/淋巴细胞、血小板、造血干细胞等, 故 SDF-1 α 可能在血液来源的参与 As 形成的细胞中发挥重要作用。一旦 ox-LDL 进入内皮下, 其就可以渗透到中层的平滑肌层, 促进 VSMC 大量分泌 SDF-1 α 并释放进入血液, 从而激发血液中的细胞往血管病变区域迁移, 并最终到达内皮下方。单核细胞在变成巨噬细胞后大量吞噬脂质而成为泡沫细胞。有趣的是, 作者在用 transwell 做迁移分析时发现, SDF-1 α 对单核细胞有趋化作用, 但单核细胞用佛波酯处理变成巨噬细胞, SDF-1 α 就没有趋化作用了, 进一步发现, SDF-1 α 对吞噬了 ox-LDL 而泡沫化的 THP-1 细胞也不具有促迁移作用, 如果是这样, 就可以解释为什么单核细胞一旦迁移到内皮下后, 要想从内皮下再迁移出来就十分困难的现象了, 其很可能是 SDF-1 α 的浓度梯度和 SDF-1 α 对巨噬细胞/泡沫细胞不起趋化作用的综合结果。

最近作者又在另一个实验中发现 SDF-1 α 具有促进单核细胞与 VSMC 黏附的活性^[5], 而加入 SDF-1 α 抗体可明显抑制 VSMC/单核细胞的黏附。这就提示 SDF-1 α 在炎症细胞的募集中发挥重要作用, 从而促进许多血管壁炎症性疾病特别是 As 的发生发展。进一步探讨 SDF-1 α 在动物模型中与血管壁炎症细胞募集的关系, 对预防和控制人类血管壁炎症性疾病包括 As 的发生发展将具有重要价值。

[参考文献]

- [1] 吕运成, 王佐. 基质细胞衍生因子 1 α 及其特异受体 CXCR4 与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (4): 523-525.
- [2] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circulation Research*, 1999, 86: 131-138.
- [3] Andreas Schober, Sandra Knarren, Micheal Lietz, Elisa A. Lin, Christian Weber. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, 108: 2491-497.
- [4] Hideyasu Sakihama, Taro Masunaga, Kenichiro Yamashita, Taku Hashimoto, Manabu Inobe, Satoru Todo, et al. Stromal Cell Derived Factor-1 and CXCR4 Interaction Is Critical for Development of Transplant Arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, 110: 2924-930.
- [5] 王佐, 吕运成, 危当恒, 姜志胜, 李国华, 姚峰, 等. 基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠血管平滑肌细胞与单核细胞黏附的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (9): 759-762.

(此文编辑 李玲玲)