

氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞 功能及膜表面超微结构的影响

郭卿¹, 刘惠亮², 董敏¹

(1. 武警医学院附属医院心内科, 天津市 300162 2 武警总医院心内科, 北京市 100039)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 超微结构; 原子力显微镜

[摘要] 目的 观察人脐静脉内皮细胞在发生脂质过氧化过程中细胞功能及超微结构改变的规律和特点。方法 用 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞作为实验组, 以与氧化型低密度脂蛋白等体积的 PBS 替代作为对照组, 两组均连续培养 0、4、8 及 16 h, 用 MTT 比色法测定并比较各组细胞的增殖状态, 用硝酸还原法测定各组细胞上清液中一氧化氮含量, 用原子力显微镜对比观察各组贴壁人脐静脉内皮细胞表面的超微结构。结果 随着氧化型低密度脂蛋白诱导时间的延长, 实验组人脐静脉内皮细胞的增殖和功能明显减低, 细胞表面隆起逐渐增大, 分布越来越不规则, 并伴随有凹陷或空洞出现; 对照组随着培养时间的延长细胞表面结构变化不大。实验组 0、4、8 及 16 h 粗糙度分别为 13.666 ± 2.196 nm、15.904 ± 2.203 nm、17.688 ± 2.076 nm 及 21.609 ± 1.867 nm, 亚组间两两相比均存在显著性差异 ($P < 0.05$); 而对照组 0、4、8 及 16 h 粗糙度分别为 13.627 ± 2.218 nm、13.659 ± 2.183 nm、13.665 ± 2.175 nm 及 13.974 ± 2.478 nm, 亚组间两两相比无显著性差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 实验组细胞培养 4 h 后膜表面粗糙度存在显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 内皮细胞在发生脂质过氧化过程中功能逐渐减退, 且表面超微结构在较早期就发生了改变, 并随时间推移呈现动态变化。

[中图分类号] R318

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Function and Membrane Surface Ultrastructure in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

GUO Qing¹, LIU Huiliang², and DONG Min¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Chinese Peoples' Armed Police Forces Medical College, Tianjin 300162, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital of Chinese Peoples' Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Ultrastructure; Atomic Force Microscopy

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in function and membrane surface ultrastructure during the lipid peroxidation. **Methods** HUVEC were induced by 100 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) as experiment group then incubated for 0 h, 4 h, 8 h and 16 h. HUVEC in the PBS as control group was processed likewise. Cell viability was measured by MTT assay. The functional status of HUVEC was determined by detecting content of nitric oxide (NO) in the cultured cell supernatant with nitric acid reduction assay. Atomic force microscope (AFM) was used for observation to membrane surface ultrastructure of HUVEC. **Results** The research showed that the proliferation ability of HUVEC in the experimental group were inhibited, cell functions were attenuated, and the longer incubation, the more significant effects. At the same time, the eminences on cell surface became larger, distribution irregularity, even some caveolae and holes appeared. However, there was no change in control groups. Cell surface roughness analysis showed that roughness on 0 h, 4 h, 8 h and 16 h experimental groups were 13.666 ± 2.196 nm, 15.904 ± 2.203 nm, 17.688 ± 2.076 nm and 21.609 ± 1.867 nm, respectively. There were significant differences between each two ($P < 0.05$). In the comparison, the control group were 13.627 ± 2.218 nm, 13.659 ± 2.183 nm, 13.665 ± 2.175

[收稿日期] 2010-08-12

[作者简介] 郭卿, 硕士, 医师, 主要从事动脉粥样硬化研究, Email为 guoqing1009@sina.com。通讯作者刘惠亮, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化及冠状动脉介入治疗研究, Email为 lh518@sina.vip.com。董敏, 硕士, 医师, 主要从事动脉粥样硬化研究。

nm and 13.974 ± 2.478 nm, respectively, and no significant differences between each two ($P > 0.05$). Compared with the control group roughness in the experimental groups after 4 hours' induction was significantly higher ($P < 0.05$).

Conclusions It was demonstrated that the cell function of endothelial cells were weakened and membrane surface ultrastructure changed in an early stage of lipid peroxidation, and perform a time-dependent rule.

低密度脂蛋白胆固醇是动脉粥样硬化的独立危险因素,氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)可加速泡沫细胞形成、内皮细胞紊乱、平滑肌细胞增殖等损伤的进展^[1,2]。通过 ox-LDL 与人脐静脉内皮细胞(HUVEC)共培养建立的氧化应激模型已被广范用于动脉粥样硬化的研究^[3,4]。原子力显微镜(AFM)是在扫描隧道显微镜基础上发展起来的一种扫描探针显微镜,它将细小的硅或氮化硅探针连于悬臂末端,再利用探针对样品表面进行扫描。人们通过一个激光装置来监测探针随样品表面起伏而产生的悬臂偏移,进而由计算机处理后获取样品表面的形貌信息。本研究应用原子力显微镜观察了体外培养的 HUVEC 在发生脂质过氧化损伤过程中,细胞功能及膜表面超微结构的改变,以探索内皮细胞从功能受损进展到结构改变的规律和特点。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

超净台(北京冠鹏仪器设备厂),MCO-15A 细胞培养箱(SANYO 公司),NanoScope IIIa 原子力显微镜(Digital Instruments Inc., Santa Barbara CA, USA),NSC-11 AFM 探针(上海爱建纳米科技有限公司),酶联免疫检测仪(Molecular Devices 公司),紫外分光光度计(岛津 UV-1601 型)。iv 型胶原酶和胰蛋白酶(Gibco 公司),Medium 200 培养基和低血清生长添加剂 LSGS(Cascade Biologics 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),ox-LDL(协和医科大学基础医学院生物化学研究室),兔抗人 V β 因子相关抗原多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),一氧化氮(NO)测试盒(南京建成生物工程研究所),MTT、DMSO 和牛血清白蛋白(Sigma 公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

参照文献[5]方法并加以改进。取健康产妇剖宫产所得脐带,用 37℃、0.1% iv 型胶原酶灌注脐静脉,37℃消化 15~20 min,收集消化液至 50 mL 离心管中,并以 PBS 冲洗脐静脉内腔,一并收集入离心管,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 HUVEC 专用培养基(Medium 200+ LSGS),吹打成内皮细胞悬液,计数并调细胞密度至 1×10^8 /L,种入 25 cm² 培

养瓶,37℃、5% CO₂ 孵箱内培养;24 h 后细胞贴壁,更换培养液,以后每 2~3 天换液 1 次,6~8 天细胞 80%~90% 融合时以 0.125% 胰蛋白酶消化, HUVEC 专用培养基传代培养。经免疫细胞化学染色, V β 因子相关抗原染色阳性鉴定内皮细胞。实验用第 3~4 代细胞。

1.3 实验分组

入组前以无添加剂培养基(Medium 200+ 2% 胎牛血清)培养细胞 24 h 使所有细胞同步化于 G₀/G₁ 期。加入 ox-LDL 使其终浓度为 100 mg/L,继续培养细胞为实验组,加入与 ox-LDL 等体积的 PBS 继续培养细胞为对照组;两组均按培养时间不同各分 4 个亚组,分别培养 0 h、4 h、8 h 和 16 h。

1.4 人脐静脉内皮细胞增殖活性测定

参照文献[6]方法,用 0.125% 胰酶消化细胞,以内皮细胞专用培养基重悬,调细胞密度至 2×10^8 /L,接种至 96 孔培养板,每孔加入细胞悬液 200 μ L(空白孔不加细胞),37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 细胞即可达 80%~90% 融合,并实现各孔细胞同步化生长。按分组方案处理细胞,每亚组设 12 个复孔。空白孔内加入蒸馏水,用于酶标仪测定时调零。其余各孔吸弃上清液 20 μ L,加入 20 μ L MTT 溶液,CO₂ 培养箱内孵育 4 h 弃培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,混悬 15 min,于 490 nm 波长下测定 OD 值。

1.5 细胞上清液中一氧化氮含量测定

用 0.125% 胰酶消化细胞,以内皮细胞专用培养基重悬,调细胞密度至 2×10^8 /L,接种至 24 孔培养板,每孔加入细胞悬液 1 mL,37℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 细胞即可达 80%~90% 融合,并实现各孔细胞同步化生长。按分组方案处理细胞。每孔吸上清液 100 μ L,硝酸还原法测定 NO 含量,按测试盒操作说明进行。

1.6 人脐静脉内皮细胞标本制备及观察

将 HUVEC 传代至直径为 35 mm 的塑料培养皿,按分组方案处理。吸弃所有上清,加入 37℃ PBS 漂洗 2 min \times 3 次,4% 多聚甲醛固定 5 min,蒸馏水漂洗 10 min \times 3 次,超净台内风机吹干。常温下将培养皿置于 NanoScope IIIa AFM 载物台上,在倒置显微镜下随机选择分叉少、融合好的细胞,针对胞

浆分布区进行扫描。扫描过程选择轻敲模式,调整激光至针尖,调整探测器激光光斑至坐标中心原点,自动调频,自动降针直至针尖接触细胞后开始扫描。每个细胞随机选择2个中心,进行1 μm 范围扫描;扫描速率为1 Hz。依样本表面高度起伏可获得Height相图片,经平滑处理后应用系统分析软件进行粗糙度分析。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。Kolmogorov-Smirnov 和 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验; Levene's 法检验多组间方差齐性; 配对 t 检验比较配对资料两组间差异, SNK-q 检验法比较多组两两间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

HUVEC 成功分离、贴壁、生长并传代。细胞呈短梭形或多角形,融合成单层,核仁清晰可见。经免疫细胞化学染色^[7],培养的内皮细胞95%以上胞浆内含有棕色颗粒, VEGF 因子染色阳性,证实为内皮细胞(图1)。

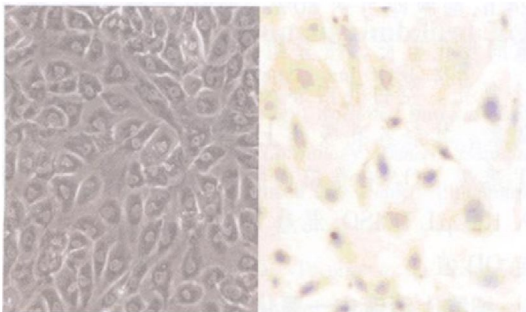


图1. 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

Figure 1. Culture and identification of HUVEC

2.2 人脐静脉内皮细胞增殖活性的变化

在8 h和16 h两个时间点,对照组与实验组相比 OD 值存在显著性差异 ($P < 0.05$)。对照组细胞培养16 h与0 h、4 h及8 h相比 OD 值均存在显著性差异 ($P < 0.05$),生长曲线呈上升趋势;实验组细胞培养16 h与0 h、4 h及8 h相比 OD 值均存在显著性差异,且实验组细胞培养8 h与0 h相比 OD 值也存在显著性差异 ($P < 0.05$),生长曲线呈下降趋势(图2)。

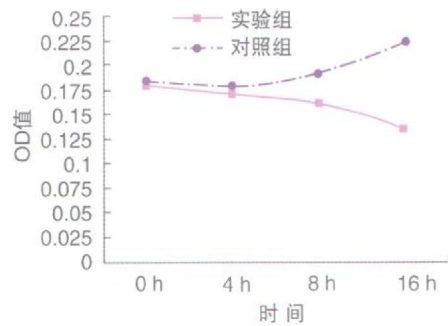


图2. 两组细胞的生长曲线

Figure 2. Cell growth curve in the two groups

2.3 人脐静脉内皮细胞培养上清液中 NO 含量的变化

实验组8 h亚组 OD 值小于0 h亚组 ($P < 0.05$),实验组16 h亚组 OD 值小于0 h、4 h及8 h亚组 ($P < 0.05$)。提示实验组随时间延长 NO 含量逐渐下降。对照组各亚组 OD 值无明显差异 ($P > 0.05$ 表1)。

表1. 实验组和对照组 NO 含量 ($n = 12$ mmol/L)

Table 1. NO content in experimental group and control group

时 间	对照组	实验组
0 h	120.27 \pm 5.89	120.74 \pm 6.12 ^a
4 h	117.86 \pm 5.04	120.81 \pm 6.12 ^a
8 h	120.12 \pm 6.14	102.72 \pm 3.60 ^{ab}
16 h	119.74 \pm 6.37	87.14 \pm 6.23 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 实验组中四个亚组两两相比; b为 $P < 0.05$ 与对照组同一时间点相比。

2.4 人脐静脉内皮细胞表面超微结构的变化

实验组0 h时细胞表面1 μm 范围内颗粒分布均匀,大小、高度基本一致,直径为50~80 nm;对照组0 h时细胞表面颗粒分布均匀,大小基本一致;实验组与对照组粗糙度相比无显著性差异 ($P > 0.05$ 图3)。实验组4 h时细胞表面颗粒分布不均,开始成团聚集,个别隆起明显高于其周围颗粒,表现为Height相中的亮区;对照组4 h时细胞表面颗粒分布均匀,大小基本一致;实验组与对照组粗糙度相比存在显著性差异 ($P < 0.05$ 图4)。实验组8 h时细胞表面隆起与实验组4 h时相比更加明显,出现少量凹陷或孔洞,表现为Height相中的暗区;对照组8 h时细胞表面颗粒分布均匀,大小基本一致;实验组与对照组粗糙度相比存在显著性差异 ($P < 0.05$ 图5)。实验组16 h时细胞表面起伏明显增加,颗粒

聚集成各种大小的团块,分布无规律,凹陷或孔洞数量明显增加,位于团块之间;对照组 16 h时细胞表面颗粒依然分布均匀,大小基本一致;实验组与对照组粗糙度相比存在显著性差异($P < 0.05$ 图 6)。实验组中各亚组粗糙度两两相比均存在显著性差异;对照组中各亚组粗糙度两两相比无显著性差异(表 2)。

表 2. 实验组与对照组细胞表面粗糙度比较 (nm)

Table 2. Comparison of cell surface roughness in experimental group and control group

时 间	对照组	实验组
0 h	13.627 ± 2.218	13.666 ± 2.196 ^a
4 h	13.659 ± 2.183 ^c	15.904 ± 2.203 ^{ab}
8 h	13.665 ± 2.175 ^c	17.688 ± 2.076 ^{ab}
16 h	13.974 ± 2.478 ^c	21.609 ± 1.867 ^{ab}

a为 $P < 0.05$ 实验组中四个亚组两两相比; b为 $P < 0.05$ 与对照组同一时间点相比。

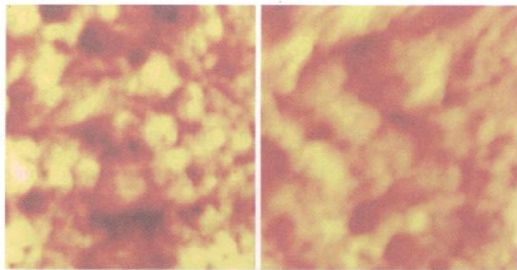


图 3. 实验组(左)和对照组(右)培养 0 h 人脐静脉内皮细胞膜表面超微结构($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

Figure 3. HUVEC surface ultrastructure cultured 0 h in experimental group (left) and control group (right)

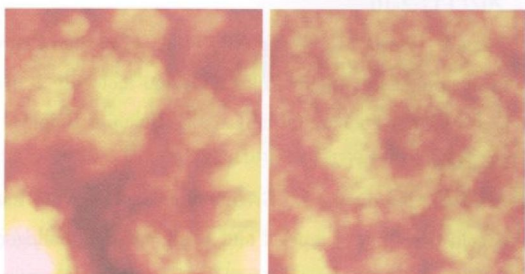


图 4. 实验组(左)和对照组(右)培养 4 h 人脐静脉内皮细胞膜表面超微结构($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

Figure 4. HUVEC surface ultrastructure cultured 4 h in experimental group (left) and control group (right)

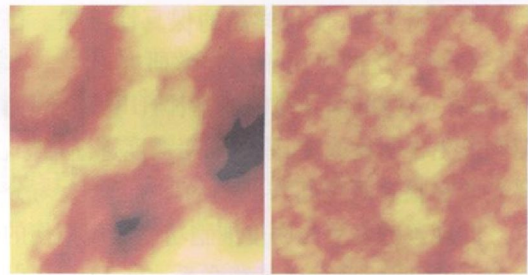


图 5. 实验组(左)和对照组(右)培养 8 h 人脐静脉内皮细胞膜表面超微结构($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

Figure 5. HUVEC surface ultrastructure cultured 8 h in experimental group (left) and control group (right)

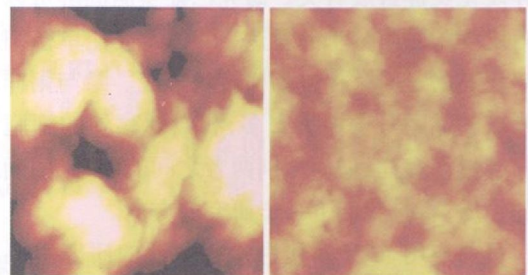


图 6. 实验组(左)和对照组(右)培养 16 h 人脐静脉内皮细胞膜表面超微结构($1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

Figure 6. HUVEC surface ultrastructure cultured 16 h in experimental group (left) and control group (right)

3 讨 论

内皮细胞构成血管的内表面,其功能与结构的损伤将拉开动脉粥样硬化形成的序幕,而 NO 水平则是反映血管内皮细胞功能的重要指标。本研究中, HUVEC 在与 ox-LDL 共培养 8 h 后,细胞的生长曲线开始下移、NO 含量出现减低,说明 HUVEC 增殖和功能开始出现抑制,至 16 h 这种抑制表现的更为突出。这种现象可能与细胞凋亡相关, ox-LDL 可以上调内皮细胞 Lectin 样 ox-LDL 受体 1 (LOX-1) 诱发并加速细胞凋亡^[3], 也可以通过增加细胞内超氧阴离子的生成进而激活 NF- κ B 途径导致细胞凋亡^[8]。但 NO 的减少也不能简单的归因于细胞数目减少,微观上我们不排除单个内皮细胞产生 NO 减少或 NO 消耗过多的可能。Blair 等^[9]的研究表明 ox-LDL 可以在转录和转录后阶段降低内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的表达,并通过吞饮作用将 eNOS 蛋白由细胞膜微囊池转移到胞内的其它膜池来降低 eNOS 活性,进而减少 NO 的产生。

由于 AFM 探针的针尖只有几纳米大小,所以由针尖扫描所得的图像也可达到纳米级的分辨率;另外 AFM 在样品制备^[10]方面比扫描电镜更胜一筹,

因其样品无需染色,使得样品的保真性更强。目前AFM已经被广泛的应用于生物学研究^[11,12]。本研究中,随着ox-LDL诱导时间的延长,HUVEC表面超微结构发生了明显改变,膜表面粗糙度逐渐增加,其主要表现在膜表面隆起与凹陷的增加、增大与分布紊乱。此现象的发生与内皮细胞功能出现损伤的时间一致,两者间似乎存在某些联系。ox-LDL在促进内皮细胞吞饮增强时^[9],势必造成细胞表面凹陷的形成与增多。动脉粥样硬化斑块从发生、发展到转归的全过程就是一个慢性炎症过程^[13],构成斑块表层的内皮细胞,其表面超微结构改变可能也与动脉粥样硬化炎症进展有关。研究已证实胆固醇可以上调内皮细胞黏附分子的表达^[14],进而促使单核细胞向内皮黏附、迁移,促进粥样斑块形成。参与粥样硬化形成的黏附分子种类繁多,我们观察到的细胞表面隆起形态多样,如何甄别两者之间的联系、明确隆起的性质,将是我们下一步研究的方向。

目前应用AFM对蛋白进行定性的研究主要有两种方法:一种是通过特异形状或大小的标记物来标记蛋白,再应用AFM寻找标记物^[15];另一种是通过生物化修饰的AFM针尖,检测针尖与样品蛋白间的作用力,来明确蛋白性质以及生物力学方面的信息^[16]。随着AFM相关技术以及新的软件产品的开发,人类对细胞表面颗粒的识别和浏览必将成为现实。这将有助于人们对包括动脉粥样硬化在内的各种疾病发病机制的研究。

根据本研究结果表明,HUVEC在发生脂质过氧化过程中功能逐渐减退,表面超微结构在较早期就发生了改变,并随时间推移呈现动态变化;AFM可以成为生物膜表面超微结构重现和定性的有力工具。

[参考文献]

- [1] He SY, Qian ZY, Tang FT, et al. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms [J]. *Life Sci* 2005, 77(8): 907-921.
- [2] Naderi GA, Asgary S, Sarrafzadegan N, et al. Antioxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 246(1-2): 193-196.
- [3] Chen XP, Xun KL, Wu Q, et al. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of reactive oxygen species [J]. *Vascul Pharmacol* 2007, 47(1): 1-9.
- [4] 刘芃, 刘映峰, 徐琳, 等. 氧化低密度脂蛋白刺激内

皮细胞程序性死亡配体-1的表达 [J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(22): 3737-740.

- [5] Baudin B, Bruneel A, Bosselet N, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Nat Protoc* 2007, 2(3): 481-485.
- [6] 龙石银, 崔慧辉, 张彩平, 等. 二苯乙烯苷对H₂O₂诱导人脐静脉内皮细胞核因子-κB、肿瘤坏死因子-α表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(7): 510-513.
- [7] Cordell JL, Pulford KA, Bigema B, et al. Detection of normal and chimeric nucleophosmin in human cells [J]. *Blood* 1999, 93(2): 632-642.
- [8] Cimacini L, Pasini AF, Garbin U, et al. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-κB through an increased production of intracellular reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12633-638.
- [9] Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, et al. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasma membrane caveolae and impairs eNOS activation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(45): 32512-519.
- [10] Muller DJ, Engel A. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins [J]. *Nat Protoc* 2007, 2(9): 191-197.
- [11] Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: A quantitative atomic force microscopy investigation [J]. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1768(5): 268-276.
- [12] Lombardo M, De Santo MP, Lombardo G, et al. Atomic force microscopy analysis of normal and photoablated porcine corneas [J]. *J Biomech*, 2006, 39(14): 2719-724.
- [13] Hansson GK. Atherosclerosis—an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007 [J]. *Atherosclerosis* 2009, 202(1): 2-10.
- [14] Yuan Y, Vema LK, Wang NP, et al. Cholesterol enrichment upregulates intercellular adhesion molecule 1 in human vascular endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1534(2-3): 139-148.
- [15] Amtz Y, Jourdainne L, Greiner-Wacker G, et al. Immunogold detection of types I and II chondrocyte collagen fibrils: an in situ atomic force microscopic investigation [J]. *Microsc Res Tech* 2006, 69(4): 283-290.
- [16] Fuhmann A, Ros R. Single molecule force spectroscopy: a method for quantitative analysis of ligand-receptor interactions [J]. *Nanomedicine* 2010, 5(4): 657-666.

(此文编辑 文玉珊)