

## 内皮细胞脂质过氧化损伤与平滑肌细胞增殖的关系

夏春枝 邓仲端 李丽珠 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

### The Relationship Between Lipid Peroxidation Injury to Endothelial Cells and the Proliferation of Smooth Muscle Cells

XIA Chun-Zhi, DENG Zhong-Duan, LI Li-Zhu and QU Zhi-Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To understand the interaction of endothelial cells (EC) with arterial smooth muscle cells (SMC), the relationship between lipid peroxidation injury to cultured human umbilical vein EC and the proliferation of cultured arterial SMC was investigated.

**Methods** The lipid peroxidation injury to cultured EC was induced by the treatment of diamide, and the content of terminal metabolite of cellular lipid peroxides malonaldehyde was determined by the method described by Hisayuki. The expression of both basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet derived growth factor BB (PDGF-BB) in EC after exposed to diamide was examined by immunohistochemistry using a mouse anti-human bFGF monoclonal antibody and a mouse anti-human PDGF-BB polyclonal antibody, respectively, and the expression of bFGF in SMC after exposed to the medium conditioned by diamide stimulated EC (dsEC-CM) was examined by the same method as well. The incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into DNA in the cells was used to observe the mitogenic effect of dsEC-CM on SMC.

**Results** Diamide induces lipid peroxidation injury to cultured EC resulting in the increased expression of bFGF and PDGF-BB in the cells. dsEC-CM could in-

duce the expression of bFGF in SMC, and was obviously mitogenic for SMC.

**Conclusions** The lipid peroxidation injury to EC may play a role in atherogenesis through inducing the production of some growth factors that stimulate the proliferation of SMC.

**KEY WORDS** Lipid peroxidation injury; Endothelium; Basic fibroblast growth factor; Platelet derived growth factor; Diamide

**摘要** 用联胺(diamide)作用于培养的人脐静脉内皮细胞引起其脂质过氧化损伤。用抗碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)单克隆抗体和抗血小板源性生长因子BB(platelet derived growth factor BB, PDGF-BB)多克隆抗体进行免疫组织化学染色,以检测内皮细胞暴露于联胺前后bFGF和PDGF-BB的表达;以及其条件培养基对平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)内bFGF表达的影响。用 $^3\text{H}$ -TdR掺入法观察内皮细胞暴露于联胺后其条件培养基对SMC是否有增殖活性。结果显示,联胺引起内皮细胞脂质过氧化损伤后,其PDGF-BB和bFGF表达增多,同时其条件培养基促进SMC表达bFGF,并对SMC有明显的促有丝分裂作用。提示,内皮细胞的脂质过氧化损伤可诱导其产生生长因子,刺激SMC增殖,在动脉粥样硬化斑块形成中起一定的作用。

**关键词** 脂质过氧化损伤; 内皮; 纤维母细胞生长因子; 血小板源性生长因子; 联胺

已知动脉中膜SMC的迁移和增殖在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的形成和发展中起重要作用。SMC的迁移和增殖受到多种因素的影响,尤其是内皮细胞源性及其SMC源性生长因子与其增殖关系最为密切<sup>[1]</sup>,其中bFGF和PDGF-BB的作用颇受关注。近年研究表明,内皮细胞(endothelial cells, EC)的脂质

过氧化损伤与 As 的发生密切相关。然而, EC 脂质过氧化损伤通过什么环节促进 As 的发生, 尚未完全清楚。本实验用联胺造成 EC 脂质过氧化损伤, 以其条件培养基作为生长因子的来源, 观察其是否能促进 SMC 增殖, 以探讨 EC 脂质过氧化损伤与 SMC 增殖的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定

取正常分娩后 4 h 内的新生儿脐带, 用缓冲液洗净血液后, 用胰蛋白酶消化法收集和培养脐静脉 EC。至细胞融合时, 呈单层“铺路石”状排列, 免疫荧光第Ⅳ因子相关抗原检查阳性, 鉴定为 EC。

### 1.2 内皮细胞条件培养基的收集

待 EC 融合后, 换以无血清 DME/F12 混合培养液, 24 h 后收集其培养液, 得正常 EC 条件培养液 (EC conditioned medium, EC-CM)。再换以含  $0.6 \times 10^{-4}$  mol/L 联胺的无血清 DME/F12 混合培养液, 培养 1 h, 弃去该培养液, 缓冲液轻洗两次, 加 DME/F12 混合培养液, 继续培养 24 h, 收集培养液, 得联胺作用 1 h 后的 EC 条件培养液 (medium conditioned by diamide stimulated EC, dsEC-CM)。

### 1.3 培养的内皮细胞及培养液中丙二醛含量的测定

丙二醛 (malonaldehyde) 是细胞过氧化脂质代谢的终产物, 所以测丙二醛的含量可以反映细胞脂过氧化物的水平。丙二醛的测定采用 TBA 法<sup>[1]</sup>。简言之, 将细胞分种于 24 孔培养板, 然后将培养孔分组, 每组 4 孔。实验组加含  $0.6 \times 10^{-4}$  mol/L 联胺的 DME/F12 混合培养液, 对照组加 DME/F12 混合培养液, 培养 1 h 后, 向培养孔中加入 3% 的 SDS 以溶解细胞, 20 分钟后, 从各孔中吸取样品待测。用等量的蒸馏水作空白对照, 以 1, 1, 3, 3-四甲氧基丙烷作标准液, 最后应用日立 F3000 荧光分光光度计测定, 测得值以每孔细胞的丙二醛量表示, 所得数据用两个样本均数的 *t* 检验处理。

### 1.4 兔主动脉平滑肌细胞培养

取 4~6 周龄日本大耳白兔, 无菌条件下取出胸主动脉。SMC 原代培养用组织贴块法<sup>[1]</sup>, 传代培养用胰蛋白酶消化法。

### 1.5 内皮细胞条件培养液对平滑肌细胞的有丝分裂活性

取长势好的第三代 SMC, 消化后调细胞浓度为  $7$

$\times 10^7$  个/L, 分种于 96 孔培养板。对照组加无血清 DME/F12 混合培养液, 实验组分别加 EC-CM 及 dsEC-CM, 用  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法检测各组 SMC 的  $^3\text{H}$ -TdR 掺入量。

## 1.6 免疫组织化学染色

### 1.6.1 联胺诱导内皮细胞 bFGF 和 PDGF-BB 表达

事先在培养瓶内放置盖玻片, 将 EC 接种于其表面, 待细胞融合后, 弃去培养液, 加含  $0.6 \times 10^{-4}$  mol/L 联胺的无血清 DME/F12 混合培养基, 1 h 后换以下不含联胺的无血清培养基, 继续培养 24 h, 取出盖玻片, 冷丙酮固定, 用链霉素生物素标记法 (labelled streptavidin biotin method, LSAB) 进行染色。第一抗体分别是鼠抗人 bFGF 单克隆抗体 (1:10, SANTA CRUZ 公司) 和鼠抗人 PDGF-BB 多克隆抗体 (1:800, SANTA CRUZ 公司)。用 DAB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  显色。

### 1.6.2 联胺作用的 EC-CM 诱导 SMC 的 bFGF 表达

事先在培养瓶内放置盖玻片, 待 SMC 在其表面长满后, 弃去培养液, 缓冲液洗涤, 分别加入正常及联胺作用后 1 h 的 EC-CM, 对照组加无血清 DME/F12 混合培养液, 24 h 后取出盖玻片, 冷丙酮固定, 同样用 LSAB 法进行免疫组织化学染色。第一抗体为鼠抗人 bFGF 单克隆抗体 (1:10, SANTA CRUZ 公司)。

## 1.7 图像分析

用 TJTY-300 型图像处理系统检测细胞内 bFGF 或 PDGF-BB 表达的平均光密度值。

## 2 结果

### 2.1 培养的内皮细胞丙二醛含量

结果表明, 培养的内皮细胞丙二醛的含量在加入  $0.6 \times 10^{-4}$  mol/L 联胺之后为  $2.693 \pm 0.278$ , 高于正常 EC ( $1.155 \pm 0.059$ ), 统计学处理差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 联胺引发内皮细胞脂质过氧化时, 其碱性纤维母细胞生长因子和血小板源生长因子 B 链表达

免疫组织化学染色结果显示, 正常 EC 内有 bFGF 和 PDGF-BB 微弱表达, bFGF 着色在核内, PDGF-BB 着色在核周胞浆。加联胺后 EC 内 bFGF 除核内着色加深外, 核周胞浆亦有极微弱的着色 (Figure 1); EC 内 PDGF-BB 仍在核周胞浆着色, 但明显加深。图像分析结果, EC 暴露于联胺 1 h 后, 其 bFGF 以及

PDGF-BB 表达的平均光密度值(bFGF,  $0.134 \pm 0.022$ ; PDGF-BB,  $0.083 \pm 0.004$ )明显高于正常 EC (bFGF,  $0.088 \pm 0.007$ ; PDGF-BB,  $0.051 \pm 0.007$ ), 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

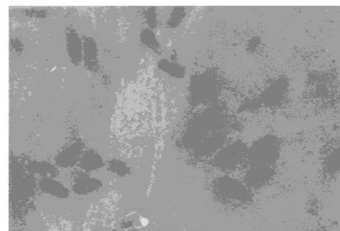


Figure 1. bFGF expression in EC exposed to diamide. The nuclei of EC revealed an intensively positive immunoreactive staining, whereas the cytoplasm of the cells was slightly stained ( $\times 200$ ).

### 2.3 联胺作用的内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞内碱性纤维母细胞生长因子表达的影响

免疫组织化学染色结果显示, 对照组及正常的 EC-CM 组 SMC 均着淡棕色, 且几乎仅局限于核内, 而联胺作用 1 h 的 EC-CM 组, SMC 核着色明显加深, 胞浆亦被淡染 (Figure 2)。图像分析结果, 正常的 EC-CM 组 SMC 内 bFGF 的平均光密度值为  $0.042 \pm 0.004$ , 与对照组 ( $0.048 \pm 0.004$ ) 相比, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 但联胺作用 1 h 的 EC-CM 组的 SMC 内 bFGF 的平均光密度值 ( $0.095 \pm 0.006$ ) 则明显高于对照组, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 不同内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞的致有丝分裂活性

结果表明, 正常 EC-CM 作用于 SMC 24 h 之后<sup>3</sup> H-TdR 掺入 SMC DNA 的量 ( $1038 \pm 110$ ) 与对照组 ( $1111 \pm 151$ ) 相比, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。然而, 联胺作用 1 h 的 EC-CM 作用于 SMC 24 h,<sup>3</sup> H-TdR 掺入 SMC DNA 的量 ( $1793 \pm 146$ ) 则明显大于对照组, 差

异有极显著性意义 ( $P < 0.01$ )。



Figure 2. bFGF expression in SMC induced by EC-CM. Both nuclei and cytoplasm of EC showed an intensively positive immunoreactive staining ( $\times 200$ ).

## 3 讨论

联胺是一种强氧化剂, 能特异地氧化还原型谷胱甘肽, 降低细胞内谷胱甘肽过氧化物酶活性, 促进细胞脂质过氧化发生。一定浓度的联胺可使 EC 脂质过氧化损伤, 表现为细胞收缩及生物膜系统的损伤, 并与 As 的发生有密切关系<sup>[4,5]</sup>。

众所周知, 动脉壁内细胞之间的相互调控在 As 斑块的发生和发展上有重要作用, 而动脉壁内细胞之间的相互调控是通过这些细胞分泌趋化因子、生长因子及其它细胞因子而实现的。本实验结果显示, 联胺可促进 EC bFGF 和 PDGF-BB 的表达, 说明联胺能刺激 EC 产生生长因子; 联胺引起 EC 的脂质过氧化损伤后其条件培养基可促进 SMC 内 bFGF 表达及促进 SMC 增殖, 也说明该条件培养基内含有这些生长因子。bFGF 和 PDGF-BB 对 SMC 均有很强的致有丝分裂活性, 它们在正常 EC 内均可少量表达。PDGF-BB 是分泌性多肽, EC 脂质过氧化损伤后, 胞浆中表达增多的 PDGF-BB 能分泌到胞外, 发挥其生物学作用。然而, bFGF 的分子中无信号肽, 为非分泌性多肽<sup>[6]</sup>, bFGF 为何能释放到胞外? Mignatti 等<sup>[7]</sup>认为 bFGF 可通过一种不依赖于内质网—高尔基器的外渗机制从转染了 bFGF cDNA 的 3T3 细胞中释

放出来。McNeil 等<sup>[8]</sup>认为细胞膜的瞬间非致死性损伤能导致 bFGF 释放<sup>[8]</sup>。另一方面, EC 脂质过氧化损伤后的条件培养液可促使 SMC 内 bFGF 表达, 说明上述生长因子可刺激 SMC 以自分泌方式促进自身增殖。

总之, EC 脂质过氧化损伤可能产生某些生长因子包括 bFGF 和 PDGF-BB, 刺激 SMC 增殖。可见 EC 与 SMC 的相互调控, 在动脉粥样硬化的发生中起重要作用。

### 参考文献

- 1 Xu C-B, Falke P, Stavenow L. Interactions between cultured bovine arterial smooth muscle cells and endothelial cells, Study on the release of growth inhibiting and growth stimulating factors. *Artery*, 1990, **17**(6): 297~310.
- 2 Hisayuki T, Yasuyuki S, Yoshio T. Micro-determination of lipoperoxide in the mouse myocardium by thiobarbituric acid fluorophotometry. *Chem Pharm Bull*, 1981, **29**(10): 2 910~914.
- 3 朱国宏, 邓仲端, 徐增媛, 等. 兔主动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子的观察. *中华医学杂志*, 1991, **71**(9): 506~508.
- 4 陈铁镇, 董玉兰. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *电子显微学报*, 1991, **4**: 394~394.
- 5 洪伟, 陈铁镇. 硒对培养人内皮细胞脂质过氧化的保护作用. *中国医科大学学报*, 1993, **22**(4): 241~247.
- 6 Klagsbrum M, Edelman ER. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**(3): 269~278.
- 7 Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB, et al. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum Golgi complex. *J Cell Physiol*, 1992, **151**: 81~93.
- 8 McNeil PL, Muthukrishnan L, Warder E, et al. Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*, 1989, **109**: 811~822.

(1996-07-17 收到)