

氧化型低密度脂蛋白抑制人内皮细胞组织因子通路抑制子 mRNA 的表达

王国平 倪娟 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

主题词 组织因子通路抑制子; 信使核糖核酸; 脂蛋白, 低密度; 氧化剂; 内皮, 血管; 血栓形成; 动脉粥样硬化

摘要 为探讨氧化型低密度脂蛋白在血栓形成过程中的作用及机制, 用超速离心法从正常人血浆中分离出低密度脂蛋白后, 用 Cu^{2+} 使之氧化变成氧化型低密度脂蛋白。在人脐静脉内皮细胞的培养基中加入一定浓度的低密度脂蛋白或氧化型低密度脂蛋白, 培养一定时间后, 用异硫氰酸胍法抽提细胞总 RNA, 用反转录聚合酶链反应方法检测人脐静脉内皮细胞中组织因子通路抑制子 mRNA 的表达, 以观察氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 的影响。结果发现, 人脐静脉内皮细胞能持续性地表达组织因子通路抑制子 mRNA, 它的表达不受低密度脂蛋白的影响。但氧化型低密度脂蛋白能明显地以时间和浓度依赖性方式抑制人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA。实验结果提示氧化型低密度脂蛋白可能通过抑制血管内皮细胞表达组织因子通路抑制子, 从而在诱导动脉粥样硬化斑块内血栓形成过程中发挥极为重要的作用。

Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibited Tissue Factor Pathway Inhibitor mRNA Expression in Human Endothelial Cells

WANG Guo- Ping, NI Juan and DENG Zhong- Duan

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

MeSH Thromboplastin; Inhibitor; mRNA; Lipoproteins, LDL; Oxidants; Endothelium, Vascular; Thrombosis; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To well understand the role of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in the pathogenesis of thrombotic complications in atherogenesis. **Methods** LDL was isolated from normal heparinized blood by density gradient ultracentrifugation and oxidized by CuCl_2 . Total RNA was extracted from human umbilical vein endothelial cells (hUVECs) exposed to LDL or ox-LDL by guanidinium isothiocyanate method. The quantification of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) mRNA in hUVECs was carried out by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). **Results** hUVECs were able to express TFPI mRNA constitutively. The expression was not affected by LDL but effectively inhibited by ox-LDL in a time- and dose-dependent manner. **Conclusions** Oxidized LDL may play an important role in inducing coagulation in atherosclerotic lesion by inhibition of expression of TFPI in vascular endothelial cells.

在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病过程中, 血栓形成是并发症之一。文献[1]报道, 与血栓形成有关的组织因子通路抑制子(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)是一种脂蛋白相关的凝血抑制因子(lipoprotein associated coagulation inhibitor, LACI)。研究结果表明, 组织因子通路抑制子可能在调节 As 斑块内血液凝固方面起重要的作用^[2]。近年来认为, 组织因子通路抑制子与血管内皮细胞密切相关, 并持续地由血管内皮细胞分泌, 极有可能结合在内皮细胞表面^[3]。目前有关组织因子通路抑制子在 As 发病过程中作用的研究尚不多见, 组织因子通路

抑制子在内皮细胞中的表达及脂蛋白对表达的影响还未见文献报道。为探讨脂蛋白对人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 的影响, 我们首先观察了组织因子通路抑制子 mRNA 在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVECs)中的表达及其规律, 紧接着观察了天然的和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是否在人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 过程中发挥作用, 以期更好地明了低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和氧化型低密度脂蛋白在动脉粥样硬化并发症——血栓形成过程中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 低密度脂蛋白的分离与氧化

参照文献[4]介绍的方法,从正常人血浆中分离 LDL,在 4℃下,LDL 透析 24 h。然后用终浓度为 10 μmol/L 的 CuCl₂ 在 37℃下使之氧化,然后再透析,即得 ox-LDL。

1.2 人内皮细胞的收集和培养

用本室常规方法收集人脐静脉内皮细胞^[5]。用 M199 培养基培养,并加入 100 kIU/L 青霉素,100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清。实验选用第 2~3 代内皮细胞。

1.3 反转录聚合酶链反应分析

实验采用常规分子生物学技术^[6]。在人脐静脉内皮细胞的培养基中加入 ox-LDL 或 LDL,培养一定时间后,用异硫氰酸胍法抽提细胞总 RNA^[7]。RNA 的浓度在 260 nm 处用分光光度计进行检测。用反转录酶和 Oligo (dT) (Life Technique 公司) 进行反转录,使之合成第一股 cDNA。然后用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术扩增反转录产品,所用 组织因子通路抑制子的引物为:

5' - primer: TATGGGGGATGTGAAGGAAA;

3' - primer: GAGGGACCGTGAAATTCAAA;

产物长 395 bp。

为确保在每一样品中所加 RNA 的数量一致,用 β-actin 作为内对照进行实验。PCR 扩增条件为:变性:94℃ 30 s → 复性:58℃ 60 s → 延伸:72℃ 90 s,共计 35 个循环。最后一次延伸 72℃ 5 min。

扩增的产品用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳并用溴化乙锭染色观察,同时用标准品确定相对分子质量的大小。最后用 HPIAS-1000 型图像分析系统进行数字化处理分析。所有的扩增实验进行 2 次,并进行 2 次反转录。

2 结果

2.1 组织因子通路抑制子 mRNA 在人内皮细胞的表达及氧化型低密度脂蛋白对表达的影响

在新鲜分离的人脐静脉内皮细胞,我们用反转录聚合酶链反应方法检测到了组织因子通路抑制子 mRNA 的表达。在我们的实验条件下,人脐静脉内皮细胞能持续地表达组织因子通路抑制子 mRNA。然而,当人脐静脉内皮细胞与 ox-LDL 在 37℃下培养 24 h,该细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 逐渐地被 ox-LDL 所抑制(0~24 h),并表现出时间依赖性抑制。在随后的实验中,我们没有观察到 LDL 对人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA

的抑制作用。这表明 LDL 不影响人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA (图 1 和表 1, Figure 1 and Table 1)。

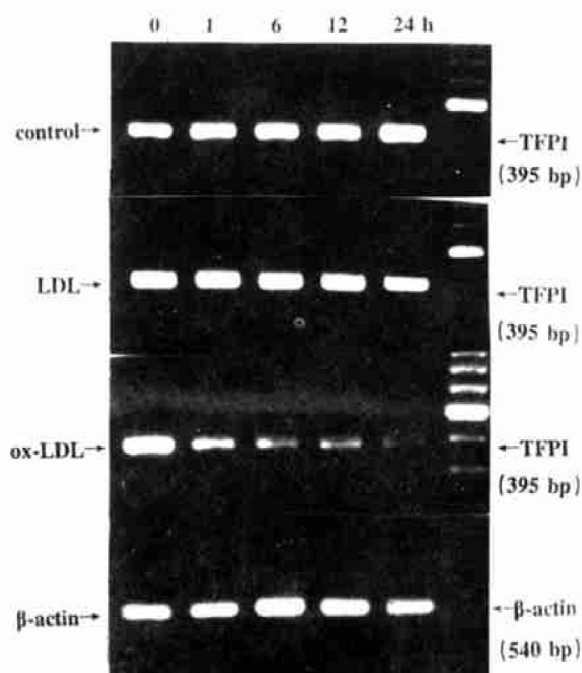


图 1. 组织因子通路抑制子 mRNA 在人内皮细胞中的表达及脂蛋白的影响

Figure 1. The expression of TFPI mRNA in hUVECs by RT-PCR. hUVECs were incubated with LDL, ox-LDL (20 mg/L) for 0, 1, 6, 12, and 24 h respectively. The total RNA of these cells was extracted. The expression of mRNA for TFPI or beta-actin was evaluated by RT-PCR as described under "Methods".

表 1. 图 1 的图象分析数据

Table 1. Measured data of Figure 1 used HPIAS (% of β-actin)

Groups	0	1 h	6 h	12 h	24 h
Control	30.29	31.24	32.45	31.50	33.85
LDL	35.72	34.98	33.65	32.85	31.88
ox-LDL	36.25	18.35	10.34	8.88	4.12

2.2 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 的浓度依赖性抑制

为了更好地探讨 ox-LDL 对组织因子通路抑制子 mRNA 表达的影响,我们观察了在人脐静脉内皮细胞培养基中加入不同浓度的 ox-LDL 时组织因子通路抑制子 mRNA 的表达情况。在人脐静脉内皮细胞的培养基中分别加入 0、5、10、20 和 40 mg/L 的 ox-LDL,37℃下培养 24 h。结果如图 2 (Figure 2) 所示,当低浓度的 ox-LDL 刺激人脐静脉内皮细胞时,ox-LDL 对组织因子通路抑制子 mRNA 的表达的

抑制作用比较弱;高浓度的 ox-LDL 对人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA 显示了明显的抑制作用,而且随着 ox-LDL 浓度的增高,抑制作用逐渐地增强。这一结果提示,ox-LDL 以浓度依赖性的方式抑制了人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA。

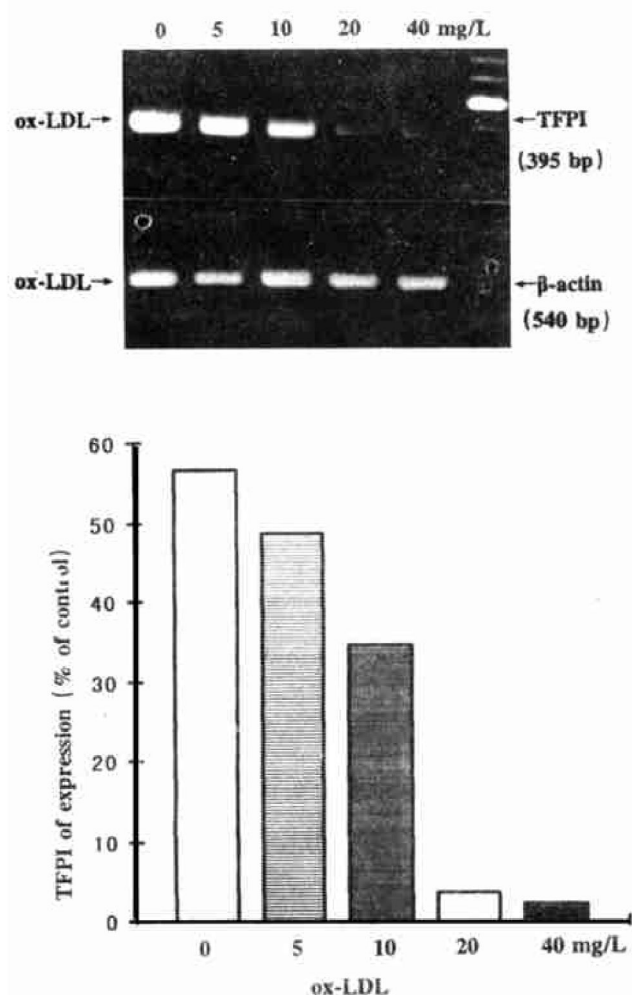


图2. 氧化型低密度脂蛋白抑制组织因子通路抑制子 mRNA 在人内皮细胞中的表达

Figure 2. The expression of TFPI mRNA in hUVECs. hUVECs were incubated with ox-LDL with different concentrations (from 0 to 40 mg/L) for 24 h. The total RNA of these cells was extracted. The expression of mRNA for TFPI or beta-actin was evaluated by RT-PCR as described under "methods".

3 讨论

血栓形成与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,是动脉粥样硬化的重要并发症之一。高脂血症是动脉粥样硬化的一个重要危险因素。高脂血症患者体内常伴有血清低密度脂蛋白胆固醇升高,并易发生氧化修饰变成 ox-LDL。文献[8]报道,在动脉粥样硬化斑块内能检测到 ox-LDL。这说明在动脉粥样硬化的发展过程中,ox-LDL 起着重要作用。我们

以往的研究发现,ox-LDL 能增强动脉壁细胞表达单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),而单核细胞趋化蛋白-1在动脉粥样硬化发病过程中起着十分重要的作用^[9]。但到目前为止,还未见有关 ox-LDL 对组织因子通路抑制子表达的影响的报道。

组织因子通路抑制子是一种 kunitz 型蛋白酶抑制因子,它直接地抑制 Xa 因子并对组织因子(tissue factor, TF)产生反馈性抑制作用^[10]。在体内,目前已知的组织因子依赖性凝血抑制因子中,组织因子通路抑制子被认为是最重要的生理性抑制因子之一。在动脉粥样硬化斑块内,组织因子通路抑制子局部的产生可能调节促凝血活性和血栓事件的发生^[11, 12]。

在本研究中,首先我们检测了组织因子通路抑制子 mRNA 在人脐静脉内皮细胞中的表达,然后观察了低密度脂蛋白和 ox-LDL 对其表达的影响。结果显示,人脐静脉内皮细胞能持续地表达组织因子通路抑制子 mRNA,其表达不受低密度脂蛋白的影响,但却明显地受 ox-LDL 的影响,即 ox-LDL 以时间和浓度依赖性方式抑制人脐静脉内皮细胞表达组织因子通路抑制子 mRNA。这些结果提示,ox-LDL 可能通过抑制血管内皮细胞表达组织因子通路抑制子,从而在动脉粥样硬化斑块内诱导血栓形成,进而发挥致动脉粥样硬化的作用。

参考文献

- Wun, TC, Kretzmer KK, Girard TJ, et al. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domain. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 6 001- 004
- Drew AF, Davenport P, Apostolopoulos J, et al. Tissue factor pathway inhibitor expression in atherosclerosis. *Lab Invest*, 1997, **77**: 291- 298
- Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-an update. *Haemostasis*, 1996, **26**: 154- 165
- Wang C, Fneg Y, Zong Y, et al. Rapid isolation of large amount of plasma VLDL and LDL by a two step ultracentrifugation. *J Tongji Med Univ*, 1995, **15**: 198- 200
- 王国平,倪娟,夏春枝,等. 内皮脂质过氧化损伤增强主动脉平滑肌细胞表达细胞周期素 D. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 208- 211
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156- 159
- Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the

- presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, 1989, **84**: 1 086- 095
- 9 Wang GP, Deng ZD, Ni J, et al. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance the expression of monocyte chemoattractant protein- 1 by rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis*. 1997, **133**: 31- 36
- 10 Broze CJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 1995, **74**: 90- 93
- 11 Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, et al. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*, 1998, **98**: 1 051- 057
- 12 Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of TFPI on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*, 1999, **99**: 1 780- 787
- (此文 1999- 05- 24 收到, 1999- 11- 12 修回)
- (此文编辑 胡必利)