

氧化型低密度脂蛋白对培养的内皮细胞的致凋亡作用 及尼莫地平的保护作用

郭素箴, 刘克强, 齐 新, 黄繁嫄¹

(天津市第一中心医院心内科; 1. 检验科, 天津市 300192)

[关键词] 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 内皮, 血管; 尼莫地平; 凋亡

[摘 要] 通过研究氧化型低密度脂蛋白对培养的内皮细胞生长状态的影响及其致凋亡作用, 阐述其致动脉粥样硬化机理, 并研究尼莫地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡的作用。用 Cu^{2+} 引发脂质过氧化过程, 制备氧化型低密度脂蛋白, 用 MTT 检测法检测细胞活性, PI 染色法及 ELISA 法检测细胞凋亡。结果显示, 细胞生长对氧化型低密度脂蛋白呈浓度依赖性抑制作用。ELISA 法和 PI 染色法进一步证实氧化型低密度脂蛋白可诱导内皮细胞发生凋亡。而尼莫地平可以抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡。提示氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞的细胞毒作用与其作用剂量有关; 体内氧化型低密度脂蛋白通过致内皮细胞凋亡的途径, 损伤血管内皮, 引发动脉粥样硬化。尼莫地平可以对氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡起到保护作用。

[中图分类号] R363.1

[文献标识码] A

Proatherogenic Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Cultured Endothelium Cells and Protect Effect of Nimodipine

GUO Su- Zhen, LIU Ke- Qiang, QI Xin, and HUANG Fan- Qiang

(The Cardiodepartment of Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

MeSH Lipoprotein, LDL, Oxidized; Endotheliums, Vascular; Nimodipine; Apoptosis

ABSTRACT **Aim** To elucidate the proatherogenic effect of oxidized low density lipoprotein (ox- LDL) on the apoptosis of cultured endothelium cells and protect effect of nimodipine. **Methods** ox- LDL was obtained by incubated with Cu^{2+} , different concentrations of ox- LDL incubated with endothelium cells. MTT test was carried out to evaluate the cell growing state.

PI staining test and ELISA test were conducted to analyze apoptosis index. **Results** The inhibiting effect of ox- LDL on the endothelium growth by ox- LDL was in a dose- dependent manner. ELISA and PI staining showed that ox- LDL induced endothelium cell apoptosis at the same concentration ($P < 0.05$), Nimodipine could inhibited the ox- LDL induced endothelium cell apoptosis. **Conclusions** The cytotoxicity of ox- LDL to endothelium cell was related to the dosage concentration of ox- LDL: the ox- LDL could inhibit the cultured endothelial cells growth, and even resulted in apoptosis. ox- LDL could start the atherosclerosis in vivo due to the endothelium cells impairment and apoptosis. Nimodipine could protect endothelium from ox- LDL induced apoptosis.

研究发现氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox- LDL)表现出一系列的致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用^[1,2]。而近来研究发现,细胞凋亡也参与了动脉粥样硬化的进程,凋亡与氧自由基有关^[3], ox- LDL 作为氧自由基的携带者可以诱导细胞凋亡的发生。凋亡的发生涉及胞内钙离子依赖的核酸内切酶的参与,本文研究了 ox- LDL 的致内皮细胞凋亡作用及钙离子拮抗剂尼莫地平对 ox- LDL 诱导细胞凋亡的作用。

[作者简介] 郭素箴,女,1970 年出生,硕士学位,心血管内科专业。
刘克强,男,1951 年出生,硕士学位,心内科主任,硕士生导师。

1 材料与方法

1.1 材料

培养的人脐静脉内皮细胞系 CRL- 1998(ECV- 304) 由中国医学科学院血液病研究所提供。DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco 公司), MTT、PI (Sigma 公司), 丙二醛含量测定试剂盒(南京建成生物制品公司), ELISA 测定试剂盒(boehringer mannheim)。尼莫地平由天津市氨基酸公司提供。

1.2 低密度脂蛋白的分离与氧化

按解用虹等^[4]方法,采用不连续密度梯度超速离心法分离人血浆低密度脂蛋白。LDL 在含 200

4 mol/L EDTA 的 PBS 透析液中 4℃ 避光透析 48 h, 即为非氧化低密度脂蛋白 (native LDL, n-LDL)。于含 10 μmol/L EDTA 的 PBS 中透析 48 h, 10 μmol/L EDTA 既可抑制 LDL 的自发氧化, 又不抑制 Cu^{2+} 存在条件下 LDL 的氧化^[5], 0.22 μm 滤膜过滤除菌, BCA 法测定蛋白浓度。10 μmol/L Cu^{2+} 于 25℃ 避光与 LDL 孵育 24 h^[6] 即为 ox-LDL。ox-LDL 丙二醛值为 n-LDL 的 8 倍, 说明 LDL 已被氧化。

1.3 内皮细胞的培养和活性测定

冻存细胞复苏, 于 DMEM 培养基中孵育 (37℃, 5% CO_2), 0.25% 胰蛋白酶消化, 加样前 24 h 换为无血清培养基 (含胰岛素 10 mg/L、转铁蛋白 200 mg/L 和腐胺 200 μmol/L)。按照实验要求加入不同浓度的 n-LDL 和 ox-LDL。对照组为空白对照; ④损伤组加入 150 mg/L ox-LDL, 作用 24 h; ④尼莫地平组同时加入 ox-LDL 150 mg/L 及尼莫地平 10 μmol/L、20 μmol/L, 作用 24 h。相差显微镜下观察细胞形态, 台盼蓝排斥法计算细胞坏死率, 四唑盐比色试验 (MTT) 测定细胞活性。

1.4 PI 染色流式细胞仪测定细胞凋亡

10^6 细胞胰酶消化后, 培养基洗涤一次, -20℃ 75% 乙醇 4℃ 固定过夜。染色前 PBS 洗涤细胞两次, PI 100 μL、4℃ 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 ④软件分析测定细胞凋亡。

1.5 酶联免疫分析方法测定细胞凋亡

采用夹心酶标免疫法, 分别应用小鼠抗 DNA 抗体和抗组蛋白抗体, 检测细胞裂解物中的单聚/低聚核小体片段, 计算细胞凋亡指数。

1.6 统计学方法

结果计算均值和标准差, 多组间比较采用方差分析, LSD 法行两两比较 (Spss 软件包 V6.0)。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞生长的影响

台盼蓝排斥实验结果显示, 随着 ox-LDL 作用浓度增加及作用时间延长, 细胞坏死率增加, 当 150 mg/L ox-LDL 作用 24 h, 细胞着色率 (坏死率) 在 10% 左右, 因此, 本试验选取作用时间 24 h, 作用浓度在 150 mg/L 以下为研究致内皮细胞凋亡的试验浓度和时间强度。

氧化型低密度脂蛋白与培养的内皮细胞共同孵育 24 h 后, 表现出对细胞生长的抑制作用, 且其抑制作用呈现浓度依赖性 (图 1, Figure 1)。

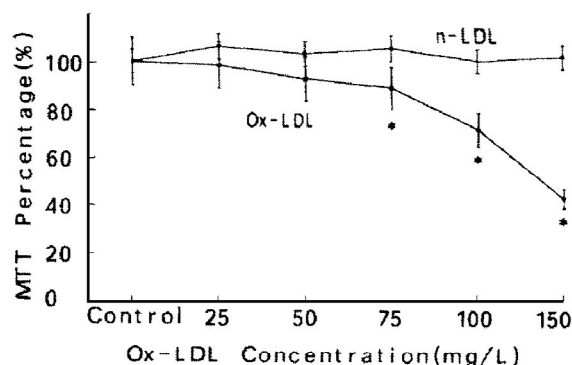


图 1 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞生长状态的影响

Figure 1 Effect of ox-LDL on the MTT test of endothelium culture ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞凋亡的影响

从图 2 (Figure 2) 可见, ox-LDL 可诱导内皮细胞发生凋亡, 当 ox-LDL 浓度大于 75 mg/L 时, 细胞凋亡的发生与对照组比较差异显著, 随作用浓度升高, 凋亡系数进一步升高。PI 染色法测定细胞凋亡得到同样结论, 在 ox-LDL 浓度为 100 和 150 mg/L 时, 作用 24 h 均可导致细胞凋亡 (图 3, Figure 3)。

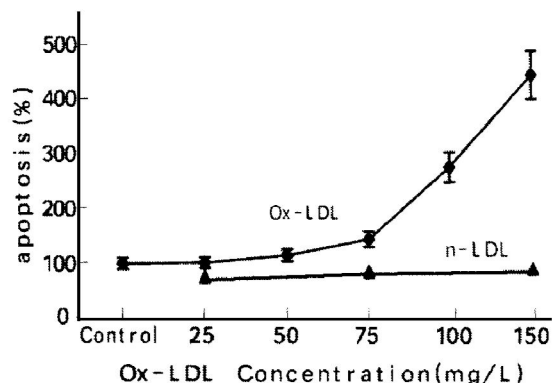


图 2 ELISA 法检测细胞凋亡

Figure 2 Number of apoptosis cells counted by ELISA test ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

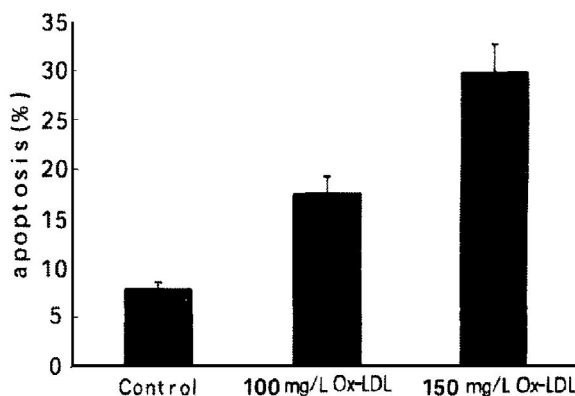


图 3 PI 染色法检测细胞凋亡

Figure 3 Number of apoptosis cells counted by PI stain test ($\bar{x} \pm s$, $n=4$). Confluent endothelium cells were treated for 24 h with 100 mg/L, 150 mg/L ox-LDL or n-LDL in serum free medium.

2.3 尼莫地平对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡的保护作用

表 1(Table 1) 显示, 与 ox- LDL 组比较, 尼莫地平组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$), 且尼莫地平浓度越高, 保护作用越强, 表明尼莫地平能够抑制 ox- LDL 诱导的内皮细胞凋亡。

表 1 尼莫地平对氧化型低密度脂蛋白(150 mg/L) 诱导内皮细胞凋亡的保护作用

Table 1 The protect effect of nimodipine to ox- LDL(150 mg/L) induced endothelium apoptosis($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Groups	Apoptosis rate(%)	Q
Control	12.30 \pm 2.25	
ox- LDL	54.62 \pm 5.58	11.72 ^a , 8.50, 5.70 ^c
Nimodipine(10 μ mol/L)	34.03 \pm 6.25	6.02 ^a , 2.79 ^b
Nimodipine(20 μ mol/L)	23.95 \pm 5.38	3.22 ^a

$P < 0.05$, a: compared with control group, b and c: compared with nimodipine group.

3 讨论

本实验结果显示 ox- LDL 可诱导细胞发生凋亡。文中所用 ox- LDL 浓度显著高于体内 ox- LDL 血浆浓度, 主要考虑到斑块局部 LDL 被内皮细胞和平滑肌细胞进一步氧化, 病变部位浓度较高的缘故。LDL 氧化修饰过程产生了某种新的物质, 具有诱导内皮细胞凋亡的能力, 究竟是哪一种因素诱导细胞凋亡, 目前还不太清楚。Lizard 等^[7]发现: 7 β - 羟基固醇和 7- 酮固醇可能是 ox- LDL 中致内皮细胞凋亡的重要因子, 单独于培养的内皮细胞中加入 7 β - 羟基固醇和 7- 酮固醇可一定程度诱导出现细胞凋亡。文献[8, 9] 阐述了氧自由基 O_2^- 在 ox- LDL 诱导细胞凋亡中的作用, 该研究显示培养的脐静脉内皮细胞与 ox- LDL 共同孵育中 O_2^- 明显增加, 并伴随细胞凋亡的出现。这种细胞凋亡作用可被 SOD 抑制剂(diethyl- dithio- carbamate) 增强, 被 SOD 和 catalase 阻断, 表明 O_2^- 的形成参与了 ox- LDL 的致 As 过程。促 As 因子如 A \textcircled{E} 、炎性细胞因子及 ox- LDL 都显示能诱导内皮细胞凋亡, 相反 As 保护因子如雌酮、NO 或抗氧化剂阻碍内皮细胞凋亡, 因此 As 启动与细胞凋亡有着密切联系。凋亡的发生涉及 RNA/ 蛋白质的合成(即基因的激活与表达), 涉及胞内 Ca^{2+} 浓度快速而持续增高, 涉及胞内多种酶的激活(包括胞内钙离子依赖性核酸内切酶激活)。

Escargueil 等^[10]测定 ox- LDL 作用于内皮细胞后, 胞浆内的钙离子浓度发生变化, 在细胞损伤之前出现了显著的钙离子浓度升高, 且其钙离子浓度升高可为钙离子螯合剂及钙离子拮抗剂所阻断。本研究选用尼莫地平是由于在二氢吡啶类钙离子拮抗剂当中, 尼莫地平的脂溶性是最强的, 所以与脂质的作用也是最强的。研究结果显示尼莫地平可抑制 ox- LDL 诱导的细胞凋亡, 表明在 ox- LDL 致内皮细胞凋亡过程中有钙离子依赖核酸内切酶的参与, 本研究也从保护内皮细胞免受 ox- LDL 损伤的角度显示了钙离子拮抗剂对动脉粥样硬化疾病的防治作用。

参考文献

- [1] Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis [J]. *J Nutr*, 1996, **126**: s1 053- 057
- [2] Harrison GJ, Jordan LR, Selley ML, et al. Low density lipoprotein inhibit histamine and $NaNO_2$ of the relaxations of the coronary vasculature and reduce contractile function in isolated rat hearts [J]. *Heart Vessels*, 1995, **10**: 249- 257
- [3] Abello PA, Fidler SA, Bulkley GB, et al. Antioxidants modulates induction of programmed endothelial cell death(apoptosis) by endotoxin [J]. *Arch Surg*, 1994, **129**: 134- 139
- [4] 郭刚, 解用虹, 田俊敏. 低密度脂蛋白的分离提纯和鉴定 [J]. *天津医学院学报*, 1991, **15**: 39
- [5] Yi HE, Peter K. Effects of oxidized low density lipoprotein on endothelin secretion by cultured endothelial cells and macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **119**: 107- 118
- [6] Galle JS, Schollmeyer P, Wanner C. Ox- LDL and lipoprotein(a) stimulate renin release of juxtaglomerular cells [J]. *Kidney Int*, 1995, **47**: 45- 52
- [7] Lizard G, Moniers, Cordelet C, et al. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 β - hydroxycholesterol 7- ketocholesterol in the cells of vascular wall [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**(5): 1 190- 200
- [8] Heermeier K, Schneider R, Heinloth A, et al. Oxidative stress mediates apoptosis induced by ox- LDL and oxidized lipoprotein(a) [J]. *Kidney Int*, 1999, **614**: 1 310- 2
- [9] Galle J, Schneider H, Heinloth A, et al. Lp(a) and LDL induced apoptosis in human endothelial cell and in rabbit aorta: role of oxidative stress [J]. *Kidney Int*, 1999, **55**(4): 1 450- 461
- [10] Escargueil BI, Salvayre R, Negre S. Necrosis and apoptosis induced by ox- LDL occur through two calcium dependent pathways in lymphoplastoid cells [J]. *Research Communication*, 1994, **8**: 1 075- 080

(此文 2000- 07- 06 收到, 2000- 12- 20 修回)

(此文编辑 朱雯霞)