

氧化修饰 HDL 刺激培养人主动脉平滑肌细胞增殖*

江 渝 刘秉文¹⁾

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 成都 610041)

摘要 平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 增殖在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 形成中起着重要作用. 氧化修饰 HDL (oxidized HDL, OX-HDL) 可刺激³H-TdR 掺入培养人动脉 SMC 的 DNA, 促进 SMC 增殖. 以四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法直接观察 OX-HDL 对培养人动脉 SMC 增殖细胞数的影响. 结果显示, 天然 HDL (native HDL N-HDL) 对 SMC 增殖没有影响, 而 OX-HDL 则显著刺激 SMC 增殖 ($P < 0.01$), N-HDL 显著抑制 OX-LDL 刺激 SMC 增殖作用 ($P < 0.01$), 而 OX-HDL 则显著增加 OX-LDL 刺激 SMC 增殖作用 ($P < 0.01$)

关键词 高密度脂蛋白, 氧化修饰, 平滑肌细胞, 增殖

学科分类号 Q51, Q28

动脉壁平滑肌细胞 (SMC) 是动脉粥样硬化斑块中的主要细胞成分, 它的增殖在动脉粥样硬化的形成过程中发挥着关键性的作用. Burden 等^[1]体外实验结果表明; 低浓度低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 可刺激培养平滑肌细胞 DNA 合成增加. 本室汪浩川等^[2]研究显示, 氧化修饰高密度脂蛋白 (oxidized high density lipoprotein, OX-HDL) 可刺激³H-TdR 掺入培养人动脉平滑肌细胞 DNA, 促进 SMC 的 DNA 合成, 表明 OX-HDL 可刺激动脉 SMC 增殖. 由于动脉 SMC, 尤其是人动脉 SMC 体外培养较难等原因, 使有关动脉 SMC 的研究工作受到限制. 我们在建立人主动脉 SMC 体外培养方法的基础上, 用 MTT 法测定 SMC 细胞数, 观察了 OX-HDL 对培养人 SMC 增殖的影响.

1 材料与方法

1.1 人血浆 HDL 的制备、氧化修饰及鉴定

用超速离心方法^[3]制备人血浆 HDL 透析除菌后, 将 HDL (2 g/L) 置 10 μ mol/L Cu^{2+} 的 PBS 中 37℃ 温育 24 h^[4]后, 测定其 A 值, 硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reaction substances, TBARS)^[5]及进行琼脂糖脂蛋白电泳.

1.2 人主动脉 SMC 的培养

人主动脉 SMC 第 17~22 代, 本室自行培养.

DMEM 培养基 (Gibco 公司, BRL), CO₂ 培养箱 (QUENE 公司, USA), 96 孔培养板 (Becton Dickinson Company, USA), MTT (Sigma 公司), DG-3022 酶联免疫测定仪 (华东电子管

厂), 其他化学试剂均为国产分析纯.

1.3 MTT 比色法测定 SMC 细胞数

细胞培养结束时, 96 孔培养板每孔加 5 g/L MTT 液 10 μ l 后, 置 37℃ 温育 6 h, 然后加 50% 二甲基甲酰胺-20% SDS 100 μ l, 37℃ 保温 3 h, 使所形成的蓝紫色甲腈 (formazan) 充分溶解, 在 DG-3022 酶联免疫检测仪上测定 570 nm 处的光吸收值. 用 570 nm 处的 A 值表示活细胞数^[6].

1.4 OX-HDL 对培养人动脉 SMC 增殖的影响

取 96 孔平板, 每孔加入 5×10^4 /ml SMC 200 μ l, 置 96 孔板于 CO₂ 孵箱 37℃ 培养 24 h, 弃培养基, 用 Hank 氏液洗涤三次, 每孔加 DMEM 培养基 200 μ l. 继续培养 24 h, 弃 DMEM 后每组分别加 N-HDL、OX-HDL、OX-LDL 终浓度为 50 mg/L 的 3% 人 LPDS 无血清培养基 100 μ l, 对照组仅加 3% 人 LPDS 无血清培养基 100 μ l, 再培养 24 h. 按 MTT 法在酶标仪上, 于 570 nm 下, 测定各孔的 A 值, 以观察细胞增殖情况^[7]重复实验 2~3 次.

2 结 果

2.1 OX-HDL 及 OX-LDL 的鉴定

2.1.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定见图 1.

*教育部高等学校博士学科点专项科研基金及美国纽约中华医学基金会部分资助.

¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1998-10-28, 修回日期: 1999-03-02

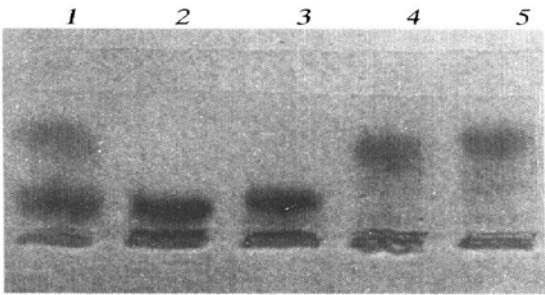


图1 琼脂糖凝胶电泳谱
1: 正常人血清; 2: N-LDL; 3: OX-LDL; 4: N-HDL;
5: OX-HDL.

由图1可见，N-HDL，N-LDL与正常人血清HDL及LDL电泳迁移率一致，而OX-LDL，OX-HDL则明显增加，说明OX-HDL、OX-LDL发生了氧化修饰。

2.1.2 TBARS及A值鉴定见表1.

由表1和图1可见，OX-HDL在234 nm处光吸收值(A)及TBARS值均显著增高($P < 0.01$)，HDL发生了氧化修饰，其 A_{234} 值及TBARS值均增高，且其电泳迁移均较相应天然脂蛋白大，表明本实验所用OX-HDL符合要求。

表1 OX-HDL的TBARS及A值鉴定

	TBARS/ nmol·mg ⁻¹		A ₂₃₄ (每毫克蛋白质)	
	N-HDL	OX-HDL	N-HDL	OX-HDL
1	0.79	3.45	0.72	1.95
2	0.72	3.38	0.67	1.91
3	0.75	3.51	0.71	1.98
4	0.78	3.40	0.79	1.96
5	0.83	3.52	0.68	1.89
6	0.84	3.61	0.70	1.94
$\bar{x} \pm s$	0.785 ± 0.046	3.478 ± 0.086 ¹⁾	0.712 ± 0.073	1.938 ± 0.033 ¹⁾

¹⁾与N-HDL比较， $P < 0.01$.

2.2 OX-HDL，OX-LDL及N-HDL对培养人动脉SMC增殖的影响.

按MTT法，在酶标仪上，测得各组的 A_{570} 值(表2)。

表2 OX-LDL，N-HDL及OX-HDL对培养人动脉SMC增殖的影响

	对照	OX-LDL	OX-HDL	OX-LDL+ N-HDL	OX-LDL+ OX-HDL
1	0.27	0.53	0.39	0.42	0.69
2	0.28	0.54	0.41	0.43	0.70
3	0.26	0.51	0.37	0.46	0.73
4	0.27	0.52	0.38	0.44	0.67
5	0.29	0.55	0.39	0.44	0.68
6	0.27	0.54	0.39	0.45	0.72
7	0.26	0.53	0.40	0.42	0.71
8	0.29	0.54	0.38	0.45	0.69
$\bar{x} \pm s$	0.27 ± 0.01	0.53 ± 0.01 ¹⁾	0.39 ± 0.01 ¹⁾	0.43 ± 0.01 ^{1), 2)}	0.69 ± 0.02 ^{1), 2)}

¹⁾与对照组比较， $P < 0.01$; ²⁾与OX-LDL组比较， $P < 0.01$.

从表2可见，OX-LDL及OX-HDL均可显著刺激SMC增殖($P < 0.01$)；N-HDL可显著降低OX-LDL刺激SMC增殖作用($P < 0.01$)，表明N-HDL有抑制OX-LDL对SMC的增殖作用；OX-

HDL可显著增加OX-LDL刺激SMC增殖作用($P < 0.01$)，表明OX-HDL与OX-LDL有叠加刺激SMC增殖效应。

3 讨 论

MTT 法检测培养人动脉 SMC 增殖具有准确可靠, 重现性好, 操作简便, 不需同位素及特殊设备仪器等优点. 本研究利用 MTT 法, 直接观察了 OX-HDL 对人 SMC 增殖细胞数的影响. 本室以往报道^[2], N-LDL, OX-LDL 及 OX-HDL 均显著刺激³H-TdR 掺入 SMC DNA, 即刺激 SMC 增殖. 本研究表明, OX-LDL+ N-HDL 组 SMC 细胞数低于 OX-LDL 组 ($P < 0.01$), 提示 N-HDL 对 OX-LDL 刺激 SMC 增殖有抑制作用. OX-LDL+ OX-HDL 组的 SMC 细胞数分别多于 OX-LDL 组和 OX-HDL 组的 SMC 细胞数 ($P < 0.01$), 提示 OX-HDL 与 OX-LDL 在促进 SMC 增殖上具有协同作用. 这可能是由于 N-HDL 与 OX-HDL, OX-LDL 通过细胞膜的不同受体而发挥不同的生物学效应. OX-LDL 及 OX-LDL 可被细胞膜上的清道夫受体识别, 通过胞内信号传递系统激活核内某些癌基因而刺激 DNA 合成增加^[4,8], 因此 OX-HDL 可增加 OX-LDL 刺激 SMC 增殖的作用. 而 N-HDL 则是通过细胞膜 HDL 受体识别, 可能是通过抑制核内 DNA 合成的信号传递系统对抗 OX-LDL 刺激 SMC 增殖的作用. 应特别指出的是, 天然 HDL 对 SMC 增殖本无影响, 然而经过氧化修饰后, 即具有较强的致 AS 作用^[2]. 最近本室江渝等^[9,10]已证明, 在高胆固醇血症家兔和内源性高甘油三酯血症患者体内, 不仅有 OX-LDL, OX-VLDL 的存在, 而且也有 OX-HDL 的存在. 本研究亦表明 OX-HDL 与 OX-LDL 一样具有刺激 SMC 增殖的作用. 因此, 我们认为在研究动脉粥样硬化发病机制时, 不仅应注意 OX-LDL、OX-VLDL 的作用, 而且也应注意 OX-HDL 的作用.

参 考 文 献

- 1 Burden T S, Resink T J, Han W A, *et al.* Induction of growth-related metabolism in human vascular smooth muscle cells by low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1989, **264** (21): 12582~12589
- 2 汪浩川, 刘秉文, 傅明德 (Wang H C, Liu B W, Fu M D). 氧化修饰脂蛋白刺激人动脉平滑肌细胞 DNA 合成. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1996, **23** (6): 544~548
- 3 张林华, 刘秉文 (Zhang L H, Liu B W). 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报* (Acta Biochim Biophys Sinica), 1989, **21** (3): 257~260
- 4 La Ville A E, Sola R, Balanya J, *et al.* *In vitro* oxidized HDL is recognized by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role *in vivo*. *Atherosclerosis*, 1994, **105** (2): 179~189
- 5 Liu R, Saku K, Zhang B, *et al.* *In vivo* kinetics of oxidatively modified HDL. *Biochem Med Metab Biol*, 1993, **49** (3): 392~397
- 6 张 平, 章崇杰, 刘 杰, 等 (Zhang P, Zhang C J, Liu J, *et al.*). 改良 MTT 法检测自然杀伤细胞的活性. *华西医科大学学报* (J West China Univ Med Sci), 1996, **27** (2): 213
- 7 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 1986, **65** (1): 55~63
- 8 汪浩川, 刘秉文, 傅明德 (Wang H C, Liu B W, Fu M D). 天然和氧化修饰脂蛋白对人动脉平滑肌细胞原癌基因表达的影响. *生物化学与生物物理学报* (Acta Biochim Biophys Sin), 1995, **27** (5): 507~513
- 9 江 渝, 刘秉文, 傅明德 (Jiang Y, Liu B W, Fu M D). 高脂膳食诱发家兔血清 LPO 升高及 LDL、VLDL 和 HDL 在活体内的氧化. *华西医科大学学报* (J West China Univ Med Sci), 1997, **28** (1): 1~5
- 10 江 渝, 刘秉文, 范 萍, 等 (Jiang Y, Liu B W, Fan P, *et al.*). 内源性高甘油三酯血症患者体内存在氧化型低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和高密度脂蛋白. *中国动脉硬化杂志* (Chin J Arterioscler), 1997, **5** (2): 99~102

Effect of Oxidized High Density Lipoproteins on Proliferation of Cultured Human Arterial Smooth Muscle Cells. JIANG Yu, LIU Bing-Wen (Apolipoprotein Research Unit, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China).

Abstract The proliferation of arterial SMC plays an important role in process of atherosclerosis. Oxidized HDL (OX-HDL) can increase ³H-TdR incorporation to DNA of cultured human arterial SMC, so promote proliferation of SMC. A study on effect of OX-HDL on proliferation of cultured human arterial SMC with MTT method was made. It was showed that native HDL (N-HDL) has no effect on proliferation of SMC but OX-HDL significantly stimulated the proliferation of SMC ($P < 0.01$); N-HDL significantly inhibited proliferation of human SMC induced by OX-LDL ($P < 0.01$) and OX-HDL significantly enhanced proliferation of human SMC induced by OX-LDL ($P < 0.01$).

Key words high density lipoprotein, oxidative modification, smooth muscle cell, proliferation