

载脂蛋白 A II 保护内皮细胞的实验研究*

黎 健 蒋 雷 刘清华

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

摘要 以细胞形态观察、细胞存活率、乳酸脱氢酶释放和前列环素测定等方面研究载脂蛋白 A II 保护内皮细胞的作用。结果显示, 载脂蛋白 A II 可部分拮抗低密度脂蛋白对内皮细胞的损伤作用, 维持内皮细胞形态基本正常, 乳酸脱氢酶释放减少, 前列环素合成增加。

关键词 内皮细胞, 载脂蛋白 A II, 高密度脂蛋白, 动脉硬化

在正常生理情况下, 血管内皮结构完整, 功能正常, 一方面通过屏障作用阻止低密度脂蛋白 (LDL) 等大分子物质和单核细胞等血液成分进入动脉内膜, 另一方面又通过产生前列环素 (PGI₂) 等活性因子发挥抗凝, 抑制平滑肌细胞增殖等多种功能。当内皮细胞损伤后, 通透性增加, 脂蛋白及单核细胞浸润, PGI₂ 产生减少, 血小板粘附聚集, 刺激平滑肌细胞增殖, 逐渐发展成动脉粥样硬化 (AS)。因此血管内皮细胞损伤是 AS 病变发生的始动因素。保护内皮细胞免受损伤是防止 AS 发生发展的关键^[1]。体内外实验表明, 血液中过量的 LDL 是造成内皮细胞损伤的有害因子, 而高密度脂蛋白 (HDL) 则能够保护内皮细胞, 与 AS 的发病呈负相关^[2, 3]。HDL 的作用与其分子中的载脂蛋白有关^[4, 5]。载脂蛋白 A II (apoA II) 是 HDL 的主要组成蛋白, 它的功能至今还不十分清楚, 除了维持 HDL 结构外, 可能是肝甘油三酯脂肪酶的激活剂, 或有识别 HDL 受体的功能, 因此在脂代谢调控中起重要作用。但 apoA II 是否与 HDL 保护内皮细胞的作用有关, 有待进一步研究证实。本文以体外培养的人脐静脉内皮细胞为模型, 用已知保护因子 HDL 作对照, 观察 apoA II 在保护内皮细胞屏障功能、拮抗 LDL 对内皮细胞的损伤方面所起的作用, 进而探讨 apoA II 在 AS 发病中可能存在的影

1 材料与方法

1.1 LDL、HDL 和 apoA II 的制备

人混和血清经序列超速离心法得到 LDL 和 HDL, 经盐酸胍处理 HDL, 过 DEAE-Sephrose CL-6B 离子交换柱层析分离纯化 apoA II。经等电聚焦电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫电泳等鉴定, 其纯度达到电泳纯和免疫纯^[6]。

1.2 内皮细胞的分离、培养和鉴定

取人脐带静脉, 注入 0.25% 胰蛋白酶 10~20 ml, 37℃温育 15 min 后离心获得内皮细胞, 用含 20% 小牛血清的 M199 (美国, GIBCO 公司) 培养液培养, 经 6~9 d 生长汇合为单层, 经相差显微镜观察细胞的形状排列、透射电镜观察细胞浆的 Weibel-Palade 小体及免疫酶法测定 VIII 因子等方法鉴定, 证实培养的细胞确系人的内皮细胞。

1.3 实验分组

汇合内皮细胞分为 4 组, 每组设置 4~6 个样本。对照组: 正常生长的内皮细胞; HDL + LDL 组: 在内皮细胞培养液中加入 HDL (100 mg/L) 37℃孵育 19 h 后, 加入 LDL (1500 mg/L); apoA II + LDL 组: 先加入 apoA II (100 mg/L), 37℃孵育 19 h 后加入

* 国家自然科学基金资助课题 (39170789)。

收稿日期: 1996-06-24, 修回日期: 1996-10-21

LDL; LDL 组: 在内皮细胞培养液中加入 LDL (1 500 mg/L). 各组在 37℃ 继续培养 48 h, 观察内皮细胞形态及功能变化.

1.4 形态观察

倒置相差显微镜 (瑞士, Polyvar 公司) 下观察内皮细胞的形态, 透射电镜 (日本, Joel 公司) 下观察超微结构.

1.5 细胞计数

分别在加入 LDL 后 48、72、96 h 从各组取样, 制成细胞悬液, 用 1% 台盼蓝滴染, 计数死、活细胞数, 计算细胞存活率.

1.6 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定

分别收集培养液和细胞层, 细胞用 2% Triton X-100 破膜, 酶法测定 LDH 量, 根据下式计算 LDH 释放的百分比^[4].

LDH 释放 % = $U_s / (U_s + U_c) \times 100\%$
式中 U_s 代表培养液中 LDH 的活性单位; U_c 代表细胞层中 LDH 的活性单位.

1.7 6-酮-前列腺素 F1α 测定

参照文献 [4] 进行. 将 1 ml 培养液用 5 ml 乙酸乙酯提取两次, 放射免疫法测定 6-酮-前列腺素 F1α (6-keto-PGF1α) 含量.

2 结 果

2.1 形态观察

图 1 为相差显微镜观察结果. 图 1a 为原代汇合内皮细胞, 呈多角形、单层镶嵌排列. 加入 LDL 48 h 后, 大部分细胞自溶和脱落, 残余细胞胞体明显收缩呈分枝状 (图 1b). 预加入 HDL 或 apoA II 孵育 19 h, 再加入 LDL, 48 h 后内皮细胞形态虽然有所改变, 胞体呈长多角形或略显不规则, 但未出现分枝状、自溶和脱落 (图 1c, 1d). 这一结果从形态学角度表明, apoA II 与 HDL 一样具有拮抗 LDL 损伤内皮细胞的能力.

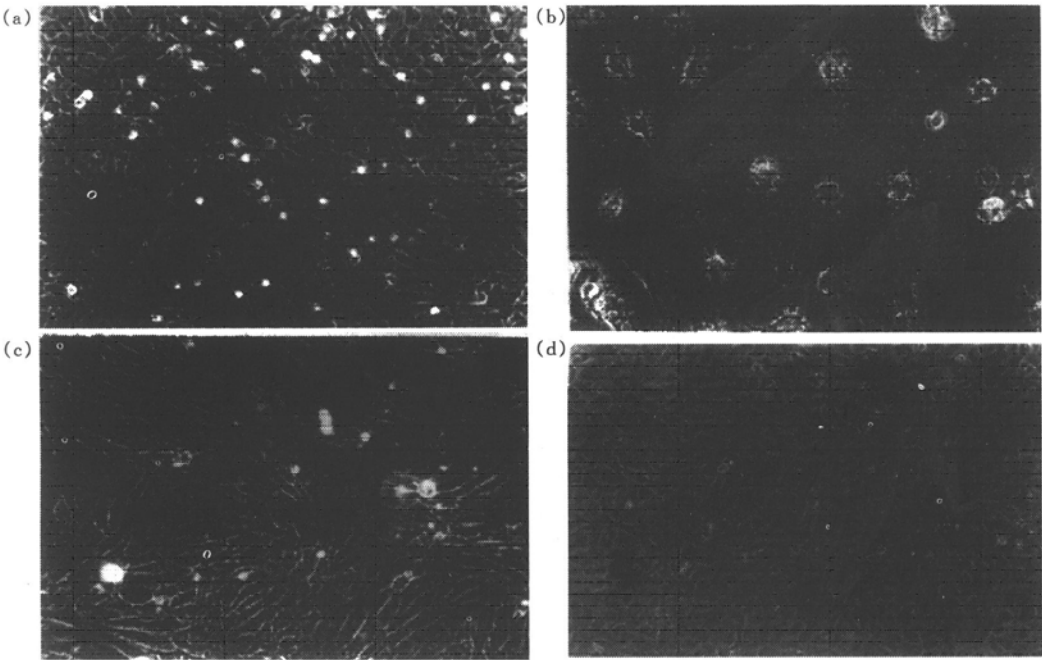
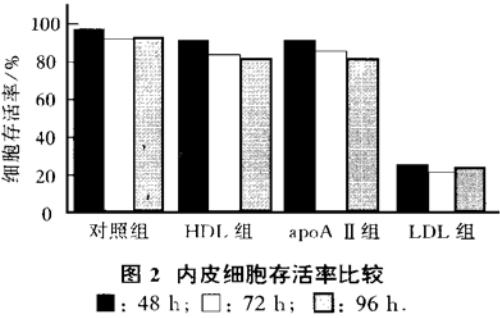


图 1 内皮细胞的形态观察

(a) 原代汇合内皮细胞, 单层镶嵌排列. $\times 180$; (b) LDL 组内皮细胞, 胞体明显收缩, 呈分枝状. $\times 750$; (c) HDL + LDL 组内皮细胞, 胞体呈长多角形. $\times 180$; (d) apoA II + LDL 组内皮细胞, 胞体略显不规则. $\times 180$.

2.2 细胞存活率

结果见图 2, LDL 组的内皮细胞大部分脱落死亡, HDL 和 apoA II 组活细胞数量无明显减少.



2.3 LDH 释放

结果见表 1. LDL 组 LDH 释放高于其他三组, 差异有非常显著性 ($P < 0.001$). LDH 为正常存在于细胞内的酶类, 当细胞膜受损时从细胞内透出, 细胞外液酶量的多少可间接反映细胞损伤的程度. 结果表明, 加入 LDL 后, LDH 释放大幅度增加, 而预加入 HDL 或 apoA II 后再施加 LDL 损伤, LDH 释放量有所增加, 与对照组相比, HDL 组没有显著差异, 但 apoA II 组的差异有显著性 ($P < 0.01$). 提示在保护内皮细胞膜完整性方面, HDL 的作用稍强于 apoA II.

2.4 6-keto-PGF1α 测定结果

由表 1 可见, LDL 组的 6-keto-PGF1α 含量显著低于对照组、HDL 组和 apoA II 组 ($P < 0.01, P < 0.001, P < 0.001$). 与对照组相比, HDL 组和 apoA II 组显著增高 ($P < 0.05$), apoA II 组虽低于 HDL 组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$). 一般而言, 测定 6-keto-PGF1α 可以反映 PGI₂ 的含量, 因为 PGI₂ 本身性质很不稳定, 迅速水解为比较稳定但无活性的 6-keto-PGF1α. HDL 组的 6-keto-PGF1α 测定值比对照组显著增高, 原因可能有二: a. HDL 可以刺激内皮细胞微粒体中的 PGI₂ 合成酶, 使 PGI₂ 合成增多; b. HDL 中的胆固醇酯所含花生四烯酸可以为内皮细胞提供合成 PGI₂ 的底物, 促进 PGI₂ 的合成. apoA II 组的

结果亦比对照组高, 推测 apoA II 通过内皮细胞的胞饮作用进入胞浆后, 刺激微粒体 PGI₂ 合成酶, 使 PGI₂ 合成量增加.

表 1 LDH 释放量和 6-keto-PGF1α 含量		
组别	LDH 释放量 / % ¹⁾	6-keto-PGF1α 含量 / mg · L ⁻¹ ²⁾
对照组	21.3 ± 3.1	11.28 ± 2.53
LDL 组	72.0 ± 5.5	7.77 ± 1.42
HDL + LDL 组	26.8 ± 3.4	16.54 ± 4.34
apoA II + LDL 组	31.9 ± 3.9	14.03 ± 1.15

注: $\bar{x} \pm s$. ¹⁾ $n = 4$; ²⁾ $n = 6$.

3 讨 论

apoA II 是 HDL 的第二种主要载脂蛋白, 占 HDL 蛋白总量的 15% ~ 25%, 它的生理功能除了维持 HDL 的结构外, 还激活肝脂酶, 参与脂类代谢的调控. 但 apoA II 在 AS 发生发展中的作用至今还不十分清楚. Miller^[7]指出, 血清 apoA II 浓度与发生冠心病的危险性呈负相关. Ferus 等^[8]报道, 人 apoA II 基因变异与 IV、V 型高甘油三酯血症密切相关. 本文的结果显示, apoA II 可以部分拮抗 LDL 对内皮细胞的损伤作用, 保护内皮细胞膜的完整性. apoA II 可能还有刺激内皮细胞合成 PGI₂ 的作用. PGI₂ 是目前发现最强的小血小板聚集抑制剂, 也是一种强的血管扩张剂, 其代谢产物可以通过增加胆固醇酯的分解代谢使细胞内胆固醇沉积减少, 因此, PGI₂ 与 AS 有着密切联系. apoA II 可能通过刺激微粒体 PGI₂ 合成酶, 使 PGI₂ 合成量增加. 国外的一些研究证实, apoA II 与 apoA I 都可以促进内皮细胞和平滑肌细胞内胆固醇的外流, 防止平滑肌细胞积累过多的胆固醇而变成泡沫细胞^[9, 10]. 这些体外实验结果表明, apoA II 与 HDL 一样, 也具有抗 AS 作用. 一些体内实验也证实了这一点, Schultz 等^[11]报道, 在转入人 apoA II 基因的鼠中, 人 apoA II 可以超高水平地表达, 但不改变 HDL 胆固醇的浓度, 也不降低鼠

apoA I 和 apoA II 的浓度, 且未发现 AS 的形成. 但 Warden^[12]的研究结果相反, 在转入鼠 apoA II 基因的鼠中, apoA II 含量增加两倍, 并且引起自发性 AS. 一些研究也表明, 含有 apoA I 和 A II 的脂蛋白 (LPA I : A II) 与只含 apoA I 不含 A II 的脂蛋白 (LPA I) 具有不同的功能和代谢特征, 在血管造影证实有冠状动脉疾病的正常血脂病人中, LPA I 比对照组明显降低, 而 LPA I : A II 没有变化^[13]. 一项对有早发心肌梗塞家族史的青少年的研究表明, 家族史与 LPA I 存在明显负相关, 而与 LPA I : A II 无关, LPA I 在防止 AS 形成方面比 LPA I : A II 有更显著的效应^[14]. 综上所述, apoA II 在 AS 发生发展中的作用还有待更深入的研究. 目前, 国外一些实验室正在用基因靶射的技术建立不表达 apoA II 的鼠家系. 相信随着分子生物学的发展, apoA II 的功能及在 AS 中的作用将日益清楚.

参 考 文 献

1 Steinberg D. Lipoprotein and atherosclerosis: a look back and a look ahead. *Arteriosclerosis*, 1983, **3** (2): 283~ 290

2 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update. *New Engl J Med*, 1986, **314** (8): 488~ 500

3 Olsson G, Wiklund O, Bondjers G. Effects of injury on apoB kinetics and concentration in rabbit aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15** (7): 930~ 936

4 刘清华, 黎 健, 蒋 雷等. 载脂蛋白 C II 对低密度脂蛋白引起的内皮细胞损伤的保护作用. *中华医学杂志*, 1991, **71** (10): 572~ 574

5 刘清华, 黎 健, 蒋 雷等. 载脂蛋白 C I 保护内皮细胞拮抗低密度脂蛋白损伤的实验观察. *中华病理学杂志*, 1992, **21** (1): 8~ 10

6 黎 健, 蒋 雷, 王 抒等. 人血清载脂蛋白 A II 的分离纯化及其抗血清的制备. *生物化学与生物物理进展*, 1989, **16** (5): 376~ 379

7 Miller N E. Associations of high density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Amer Heart J*, 1987, **113** (2): 589~ 597

8 Ferns G A A, Shelley C S, Stocks J *et al.* A DNA polymorphism of apolipoprotein A II gene in hypertriglyceridemia. *Hum Genet*, 1986, **74** (4): 302~ 306

9 Savion N, Kotev E S. Role of apolipoprotein AI, A II and C I in cholesterol efflux from endothelial and smooth muscle cells. *Eur Heart J*, 1993, **14** (7): 930~ 935

10 Komaba A, Li Q, Hara H *et al.* Resistance of smooth muscle cells to assembly of high density lipoproteins with extracellular free apolipoproteins and to reduction of intracellularly

accumulated cholesterol. *J Biol Chem*, 1992, **267** (25): 17560~ 17566

11 Schultz J R, Gong E L, Mccall M R *et al.* Expression of human apolipoprotein A II and its effect on high density lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1992, **267** (30): 21630~ 21636

12 Warden C H, Hedrick C C, Qiao J H *et al.* Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A II. *Science*, 1993, **261** (5119): 469~ 472

13 Puchois P, Kandoussi A, Fievet P *et al.* Apolipoprotein A I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 1987, **68** (1): 35~ 40

14 Amouyel P, Isorez D, Bard J M. Parental history of early myocardial infarction is associated with decreased levels of lipoparticle AI in adolescents. *Arterio Thromb*, 1993, **13** (11): 1640~ 1644

The Protective Effects of Apolipoprotein A II on Endothelial Cell Injured by Low Density Lipoprotein *in vitro*. LI Jian, JIANG Lei, LIU Qinghua (*Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China*).

Abstract To study the protective effects of apolipoprotein A II (apoA II) on endothelial cells injured by low density lipoprotein (LDL) *in vitro*, human umbilical vein endothelial cells were cultured and divided into four groups: control, HDL + LDL, apoA II + LDL and LDL group, which were observed the morphological changes with phase-contrast and transmission electron microscope and measured the release of lacate dehydrogenase (LDH) and level of 6-keto-prostaglandin F1 α (PGF1 α). The endothelial cells injured by LDL showed cell contraction, increased release of LDH and decreased level of 6-keto-PGF1 α . However, normal morphology and LDH release as well as PGI₂ synthesis in endothelial cells were found when HDL or apoA II was added to culture media before LDL injury. The results indicated that both HDL and apoA II could resist the injurious effect of LDL on cultured endothelial cells.

Key words endothelial cell, apolipoprotein A II, high density lipoprotein, arteriosclerosis