

载脂蛋白 CII 对低密度脂蛋白引起的内皮细胞损伤的保护作用*

黎 健 刘清华 蒋 雷 王惠君 李健斋 赵满仓 周景林

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

(石家庄空军医院)

关键词 载脂蛋白 CII, 内皮细胞, 低密度脂蛋白

血管内皮细胞 (EC) 位于血管内膜表面, 具有抗血栓形成及选择通透性等生理功能。动脉内皮长期反复受损是动脉粥样硬化 (AS) 病变形成的始动环节。保护 EC 免受损伤是防止 AS 发生发展的关键。国外的研究表明, 血液中过量的低密度脂蛋白 (LDL) 是引起内皮损伤的有害因子, 而高密度脂蛋白 (HDL) 对 EC 起保护作用。载脂蛋白 CII (apoCII) 是 HDL 的组成蛋白, 它是否与 HDL 一样具有保护 EC 的作用, 国内外至今未见报道。本实验从人脐静脉中分离 EC, 经培养后分为四组, 每组设置 4—6 个样本。组 1 为对照组: 即正常生长的 EC; 组 2 为 HDL + LDL 组: 在 EC 中先加入 HDL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 19h 后加入 LDL (1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 组 3 为 apoCII + LDL 组: 在 EC 中先加入 apoCII (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 19h 后再加入 LDL (1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 组 4 为 LDL 组: 在已孵育 19h 的 EC 中加入 LDL (1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。各组在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 48h, 倒置相差显微镜和透射电镜下观察 EC 的形态变化, 并分别测定了培养液和细胞层中乳酸脱氢酶 (LDH) 含量, 计算出 LDH 释放的百分比, 以反映细胞膜的完整性。同时还测定了各组的

6-酮-前列腺素 $\text{F}_{1\alpha}$ (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$) 含量, 以反映 EC 合成前列环素 (PGI $_2$) 的能力, 作为衡量 EC 损伤的功能指标。结果表明, 加入 LDL 48h 后, EC 大部分脱落, 残存细胞明显收缩致使胞体形状不规则, 多数呈分支状, 透射电镜见胞膜下含丰富的饮液泡, 线粒体肿胀, 内质网扩张, 脂滴和溶酶体数量显著增多。预加入 HDL 或 apoCII 孵育 19h 再加入 LDL, EC 数量未见明显减少, 形态仅有轻微改变, 未出现典型的分支状胞浆, 透射电镜见 EC 超微结构正常, 胞浆中可见粗面内质网, 核蛋白体, 线粒体和少量溶酶体, 偶见脂滴。结果从形态学表明, apoCII 与 HDL 一样具有拮抗 LDL 损伤 EC 的能力。从表 1 可见, LDL 组 LDH 释放百分比比其它三个组高近三倍, 有高度显著性差异 ($P < 0.001$), apoCII 及 HDL 组的值接近于对照组, 提示 LDL 使大部分 EC 的细胞膜损伤, 大量 LDH 从细胞内透出。如果预加入 HDL 或 apoCII 后再施加 LDL 损伤, LDH 释放量增加不明显, 提示 HDL 和 apoCII 可保护 EC 的完整性。表 1 还显示 LDL 组的 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量显著低于其它三组 ($P < 0.05$; $P < 0.001$), 表明 LDL 使 EC 合成 PGI $_2$ 的能

表 1 LDH 释放百分比 (%) 与 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

	对 照 组	HDL + LDL 组	apoCII + LDL 组	LDL 组
LDH ($n = 4$)	21.3 $\pm$ 3.1	26.8 $\pm$ 3.4	27.7 $\pm$ 1.4	72.0 $\pm$ 5.5
6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ ($n = 6$)	11.3 $\pm$ 2.5	16.5 $\pm$ 4.3	13.7 $\pm$ 2.5	7.8 $\pm$ 1.4

(下转第160页)

* 本课题得到国家自然科学基金资助。

盘操作系统 DOS 3.0 以上版支持。采用人机对话形式,操作简便。彩色显示清晰醒目。软件的部分程序来自 Newlin^[5] 1988 年的工作。

我们利用该软件进行了多种计算。如用于植物组织和细胞培养的 MS (Murarhige 和 Skoog^[6]) 液体培养基中各种金属离子实际自由离子浓度的计算。为了配制含有一定浓度的相对稳定的自由金属离子的培养基。可加入一定浓度的络合剂构成络合平衡缓冲系统。由表 2 可以看出由于原 MS 培养基中加有 1×10^{-4}

mol/L 的络合剂 EDTA 使溶液中铜、锌、钴、锰的实际自由离子浓度降低比较大,而对钙离子则影响较小。为了控制溶液中的自由钙离子浓度,可加入另一种对钙离子络合能力较强的络合剂 EGTA 1×10^{-3} mol/L。由于更高浓度的络合剂可能会对细胞活力产生影响,所以配制含较低自由钙离子浓度的培养基时,需改变加入的钙离子总浓度。用软件可以计算出这种含有五种金属离子及两种络合剂的络合平衡体系中,为获得含自由钙离子浓度从 1×10^{-2} 到 1×10^{-6} mol/L 的 MS

表 2 络合剂对 MS 液体培养基中自由金属离子浓度 (mol/L) 的影响*

金属离子及其总浓度 金属离子自由离子浓度 络合剂及其总浓度	[Cu ²⁺]	[Zn ²⁺]	[Co ²⁺]	[Mn ²⁺]	[Ca ²⁺]
	1.0×10^{-7}	3.0×10^{-5}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}
[EDTA] 1×10^{-4}	3.57×10^{-13}	2.36×10^{-8}	1.32×10^{-10}	2.23×10^{-5}	2.91×10^{-3}
[EDTA] 1×10^{-4} [EGTA] 1×10^{-3}	2.94×10^{-14}	6.13×10^{-9}	3.17×10^{-11}	4.50×10^{-6}	2.06×10^{-3}

* pH = 5.8 温度 27℃ 离子强度 I = 0.056mol/L.

表 3 用 EDTA, EGTA 配制含不同自由钙离子浓度 (mol/L) 的 MS 培养基*

所需自由钙离子浓度	1.00×10^{-2}	1.00×10^{-3}	1.00×10^{-4}	1.01×10^{-5}	1.01×10^{-6}
应加入的钙离子总浓度	1.10×10^{-2}	1.92×10^{-3}	6.86×10^{-4}	1.40×10^{-4}	1.58×10^{-5}

* pH = 5.8 温度 27℃ 离子强度 I = 0.056mol/L EDTA, EGTA 及 Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ 的总浓度同表 2.

培养基,应加入的钙离子总浓度。计算结果列于表 3。我们用此结果配制了培养基,用于研究钙离子对培养细胞生长的影响。

另外,我们还对 Wolf^[1] 的数据进行了重新计算,得到了非常相近的结果。

该软件用途广泛,适于所有与络合反应有关的体系。尤其是对于有多种络合剂及金属离子同时参加的复杂体系,使用该软件可以非常方便地进行计算。

我室在美国进修的郭艳林同志提供软件的最初版,谨此致谢。

参 考 文 献

1 Wolf H U. *Experientia*, 1973; 29: 241
2 谢宝田等,生物化学与生物物理进展,1989;16(6):476
3 Fabiato A *et al.*, *J Physiol Paris*, 1979;75 463
4 Herrison S M, Bers D M. *Am J Physiol*, 1989; 256: C 1250
5 Newlin J J. *Programmer's J*, 1988; 6 (4): 66
6 Murarhige T, Skoog F. *Physiologia PL*, 1962; 15: 473

[本文于1989年11月25日收到,1990年6月4日修回]

(上接第 131 页)

力下降,而 apoCII 和 HDL 能拮抗 LDL 这一作用,并能通过刺激 EC 微粒体的 PGI₂ 合成酶使 PGI₂ 合成量增加。apoCII 的作用比 HDL 稍弱。

综上所述,apoCII 可以拮抗 LDL 对 EC 的损伤作用,提示 apoCII 与 HDL 一样,也具有抗 AS 作用。本实验为 AS 的防治研究提供了新的线索。

[本文于 1990 年 11 月 27 日收到,12 月 8 日修回]