文章编号:1000-5404(2006)16-1679-03

论著

胆固醇对血管内皮细胞的损伤

卢志顺,余 晓,唐俊利,钱民章 (遵义医学院基础医学部生物化学教研室,遵义 563003)

提 要:目的 研究胆固醇对人血管内皮细胞的损伤作用。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞株ECV304,分别以浓度为6.25、12.50、25.00、50.00 mg/L的胆固醇作用于ECV304细胞48 h,检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性,一氧化氮(nitric oxide, NO)浓度,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)浓度。**结果** 与无胆固醇组比较,胆固醇浓度为50.00 mg/L时培养液中LDH活性显著增加;25.0 mg/L,50.0 mg/L浓度组培养液中NO浓度显著降低;胆固醇浓度为6.25、12.5、25.0、50.0 mg/L组与无胆固醇组比较,随着胆固醇浓度提高,培养液中NOS活性逐渐降低,MCP-1浓度逐渐增高,有显著性差异。**结论** 一定浓度的胆固醇能直接损伤人血管内皮细胞结构,影响内皮细胞的部分分泌功能。

关键词: 胆固醇;人血管内皮细胞;一氧化氮合酶;一氧化氮;单核细胞趋化蛋白-1
中图法分类号: R322.12;R329.26;R344.81 **文献标识码:** A

Study on injury of human vascular endothelial cells by cholesterol

LU Zhi-shun, YU Xiao, TANG Jun-li, QIAN Min-zhang (Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To investigate the injuries caused by cholesterol to the vascular endothelial cells (VECs). **Methods** Different dosage of cholesterol (6.25, 12.5, 25.0, 50.0 mg/L) was used on human umbilical endothelial cell line, ECV304, respectively. LDH activity, nitric oxide and the nitric oxide synthetase activity in the supernatant of cell culture were detected. The concentration of MCP-1 protein in cell culture was detected by ELISA. **Results** As compared with the normal control cells, a significant increase of LDH activity was found in the cells treated with 50.0 mg/L cholesterol. The NO level decreased in the cells treated by 25.0 or 50.0 mg/L cholesterol. When treated by cholesterol at dose of 6.25, 12.5, 25.0 or 50.0 mg/L respectively, the NOS activity was greatly decreased and MCP-1 protein was significantly increased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Cholesterol of high concentration could directly injure the structure and partial function of VECs.

Key words: cholesterol; human vascular endothelial cell; NOS; NO; monocyte chemotactic protein-1

动脉粥样硬化(atherosclersis,As)病变发生在动脉血管壁上,始于血管内皮细胞(vascular endothelial cell,VEC)损伤。血管内皮不仅是血管内膜的一道重要屏障,还能分泌多种活性因子,参与As的发生与发展[1,2]。"胆固醇学说"认为:血清胆固醇水平增高是不需要他它因素协同就足以诱发和推进As发生发展的因素[3]。研究表明,无论是人类自然发生的,还是实验动物用高饱和脂肪,高胆固醇诱导产生的As,在动脉粥样硬化的动脉壁细胞内和细胞之间都有胆固醇及其酯的大量沉积,这些胆固醇对内皮细胞(endothelial cell, EC)生理功能影响尚不清楚,值得研究[4]。本实验在体外培养人脐静脉内皮细胞株ECV304,观察不同浓度的胆固醇作用ECV304 48 h后,细胞膜损伤情况及内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial cell nitric oxide synthase, ecNOS)活性,一氧化氮(NO)生成及单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)释放量的变化,研究游离胆固醇(cholesterol, ch)对EC的损伤作用,进一步探讨ch致As的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

ECV304细胞株由武汉大学细胞馆藏中心提供;DMEM购自Gibco公司;胎牛血清购自华美公司;胆固醇购自Sigma公司;LDH、NO、NOS活性检测试剂盒购自南京建成生物工程公司;MCP-1蛋白ELISA试剂盒购自美国Cytimmune公司。

基金项目: 贵州省科技厅基金资助项目(2003-3015)
Supported by the Research Funds by the Department of Sci & Tech of Guizhou Province (2003-3015)
作者简介: 卢志顺(1978-),女,江西省南昌市人,硕士,主要从事心血管疾病分子生物学方面的研究。E-mail: luzhishun@hotmail.com
通讯作者: 钱民章,电话:(0852)8609792, E-mail:qian_mzh@hotmail.com
收稿日期: 2005-09-13;**修回日期:** 2006-03-14

1.2 实验方法

1.2.1 ECV304 细胞的培养 ECV304 细胞按内皮细胞常规方法培养。将消化计数细胞以 5×10^4 个/ml 的密度种于 24 孔板，每孔用 1 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后，换 1 ml 无血清 DMEM 培养 24 h，用 1 ml 含胆固醇的 DMEM（含 0.5% FBS，0.2% 乙醇）作用，胆固醇浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 mg/L，无胆固醇组加 1 ml DMEM（含 0.5% FBS，0.2% 乙醇）。胆固醇作用 48 h 后，分别收集细胞及细胞培养液。细胞培养液 5 000 r/min 离心 10 min，除去悬浮的细胞和颗粒，收集上清进行检测。

1.2.2 细胞培养液中 LDH 活性检测 以常规比色法测定细胞培养液中 LDH 活性。

1.2.3 细胞培养液中 NO 浓度，NOS 活性检测 采用硝酸还原酶法和比色法，按照试剂盒说明书检测细胞培养液中 NO 含量及 NOS 活性。

1.2.4 细胞培养液中 MCP-1 蛋白量的检测 用双抗体夹心 ELISA 方法检测细胞培养液中 MCP-1 蛋白浓度，按照试剂盒说明书完成。取标有 MCP-1 抗体的酶标板，每孔加细胞培养液 100 μl 和 MCP-1 抗体 25 μl，室温孵育 3 h。用清洗液反复洗板 5 次，将酶标板倒扣在干净滤纸上，去尽残液，每孔再加入 50 μl 耦联剂，室温孵育 45 min，再清洗 5 次，每孔加入显色剂 200 μl 避光孵育 8 至 10 min。每孔加入 50 μl 终止液，混匀，30 min 内，读取 490 nm 处光密度值。根据标准浓度，制作标准曲线，并求得各样品中 MCP-1 含量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养液中 LDH 活性、NO 浓度、NOS 活性的变化

低浓度的胆固醇作用下，培养液中 LDH 活性没有显著性变化。当胆固醇浓度达到 50.00 mg/L 时，培养液中 LDH 活性与无胆固醇组相比，有显著性提高（$P<0.01$）。随着胆固醇浓度的提高，细胞培养液中 NO 浓度逐渐下降，胆固醇浓度为 25.00、50.00 mg/L 两组的培液中 NO 浓度与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）。细胞培养液中 NOS 活性随胆固醇浓度的增高逐步下降，每一浓度组与无胆固醇组比较均有显著性差异（$P<0.01$）（表 1）。

表 1 不同浓度的胆固醇作用下培养液中 LDH 活性，NO 浓度和 NOS 活性（$n=6$）

胆固醇浓度（mg/L）	LDH 活性（U/L）	NO 浓度（μmol/L）	NOS 活性（U/L）
0.00（对照组）	216.43 ± 26.76	20.86 ± 1.37	667.16 ± 18.40
6.25	204.69 ± 20.97	20.32 ± 1.55	575.49 ± 28.20[b]
12.50	202.35 ± 37.09	18.19 ± 0.33	500.96 ± 12.58[b]
25.00	231.92 ± 61.35	15.65 ± 1.05[a]	387.27 ± 15.30[b]
50.00	341.31 ± 54.93[b]	14.50 ± 2.91[b]	352.05 ± 29.46[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.2 细胞培养液中 MCP-1 浓度

与对照组比较，培养液中 MCP-1 表达号随胆固醇浓度的增高逐渐升高，差异显著（$P<0.05$）（表 2）。

表 2 不同浓度胆固醇作用下细胞培养液中 MCP-1 的表达量（$n=6$）

胆固醇浓度（mg/L）	MCP-1 表达量（μg/L）
0.00（对照组）	88.17 ± 28.02
6.25	126.89 ± 10.21[a]
12.50	144.66 ± 27.40[a]
25.00	156.99 ± 29.26[a]
50.00	174.09 ± 21.83[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

3 讨论

血管内皮损伤被认为是 As 发生发展的关键。针对血管内皮细胞的研究是 As 研究的一个热点。ECV304 细胞是来自脐静脉的内皮样细胞株，被用作研究人血管内皮细胞损伤及功能改变的模型[2,5-7]。

在血管内皮细胞损伤的定量分析法中，常用的有测定细胞内酶的释放量和核素的释放量等多种。LDH 是糖酵解途径中的酶，广泛存在于人体组织细胞内。当细胞受损时，细胞膜通透性会增加乃至穿孔，胞内的 LDH 也因此释放出来，致使培液中 LDH 活性升高，损伤越重，胞外的 LDH 量就越多。为了研究胆固醇对血管内皮细胞是否具有损伤作用，实验采用不同浓度胆固醇作用于 ECV304 细胞，用 LDH 检测法观察细胞膜通透性损伤程度。结果表明，浓度为 50.00 mg/L 的胆固醇明显增高培养液中 LDH 活性，说明高浓度胆固醇可以增加内皮细胞膜的通透性，对细胞造成了损伤。而低浓度的胆固醇这一现象不明显，也即只有当胆固醇达到一定浓度时，才表现出细胞膜的通透性增加这一损伤效应。

内皮源性 NO 由内皮细胞一氧化氮合酶（ecNOS）催化 L-精氨酸胍基氧化生成，起着内皮依赖性血管舒张因子作用，NO 可通过抑制血小板黏附，聚集及其所含生长因子释放，抑制单核细胞趋化与活化，抑制活化内皮表达白细胞黏附分子。抑制平滑肌细胞（SMC）迁移与增生等保护血管及抗 As，研究证实血管内皮细胞 NO 合成减少，是 As 时内皮依赖性血管舒张异常，SMC 反应异常的重要原因[8]。本实验结果显示，低浓度胆固醇即可引起 ecNOS 活性的降低，作为 NOS 催化生成的产物，当 NOS 活性有较大变化时，NO 的生成量也会变化。本实验显示当胆固醇浓度达 25.0 mg/L 后，NO 生成量与无胆固醇组比较有显著下降。NOS 活性及 NO 生成量的降低进一步证明了胆固醇对

ECV304 的损伤作用，表明胆固醇可能通过对 EC 中 NOS 活性及 NO 生成量的调节影响血管的功能，这可能是它致 As 的机制之一。

MCP-1 在 As 的发生发展中具有重要的作用。MCP-1 是 CC 亚家族趋化因子，为一种分泌型蛋白，合成后运输到胞外发挥作用，其基本功能是趋化单核细胞。体外实验证明，As 灶的三要素：内皮细胞，平滑肌细胞及迁移入内膜的单核/巨噬细胞均可表达 MCP-1[9]。As 斑块中 MCP-1 的高表达是内膜单核/巨噬细胞募集的主要因素。本实验用不同浓度的胆固醇作用于 ECV304，发现细胞释放的 MCP-1 蛋白量随着胆固醇浓度的增加而增加。培液中 MCP-1 蛋白量的增加与胆固醇对细胞膜的损伤，通透性改变有关，也提示胆固醇可能是诱导 MCP-1 表达的因素。本课题组正在进一步观察胆固醇对内皮细胞中 MCP-1 mRNA 转录的影响，以了解胆固醇与 MCP-1 表达的关系。胆固醇通过损伤内皮细胞增加了血管壁中 MCP-1 的蛋白量，是其致动脉粥样硬化的机制之一。

本研究表明，一定浓度的游离胆固醇会引起内皮细胞膜结构的改变，影响内皮细胞活性物质的产生与分泌，从而加重动脉粥样硬化的病变过程。为胆固醇致动脉粥样硬化的机制提供了新的资料。

参考文献：

[1] CHIEN K R, GRACE A A. Principles of cardiovascular molecular and cellular biology [M]// BRAUNWALD E. Heart disease. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996: 1626 - 1649.

[2] 肖彧君，李春霖，刘冰容，等. 重组腺病毒 IκBαM 抑制高糖诱导的血管内皮细胞炎症因子的异常分泌[J]. 中国动脉硬化杂志，2004，12(3)：259 - 262.

[3] GLASS C K, WITZTUM J L. Atherosclerosis. The road ahead[J]. Cell, 2001, 104(4): 503 - 516.

[4] 唐蔚青，王　抒，杨向东，等. 胆固醇诱导血管内皮细胞基因的差异表达[J]. 中国动脉硬化杂志，2003，11(1)：1 - 4.

[5] 陈　玮，王嘉丽，彭　涛，等. 微管骨架在登革病毒感染的 ECV304 细胞中作用的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：628 - 631.

[6] 王　晓，李　果，李纪平，等. 泛素在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的表达[J]. 上海第二医科大学学报，2005，25(1)：36 - 38.

[7] 余小平，糜漫天，朱俊东. 三羟异黄酮对脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖影响与 VEGFR 的关系[J]. 第三军医大学学报，2004，26(8)：663 - 666.

[8] CHIEN K R. 分子心脏病学[M]. 刘中民，张代富，胡大一，等译. 北京：人民卫生出版社，2002：303 - 304.

[9] ICHIKI T, FUNAKOSHI Y, ITO K, *et al*. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) in vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 269(3): 666 - 670.

（编辑　王　红）

（上接 1678 页）

表 1　不同粘接剂粘固的烤瓷冠边缘微渗漏的比较（$n=8$）

组别	界面	间隙
无酸 9 水门汀	烤瓷冠与粘结剂	11.61 ± 9.929
	牙与粘结剂	14.51 ± 10.144
双重固化树脂水门汀	烤瓷冠与粘结剂	13.11 ± 9.418
	牙与粘结剂	14.94 ± 9.084

$F=1.710$，$P=0.165$

无酸水门汀与双重固化树脂水门汀粘固的烤瓷冠边缘微渗漏差异无统计学意义（$P>0.05$），二者粘固的烤瓷冠边缘微渗漏均较小，说明二者均具有良好的抗微渗漏性能。

3　讨论

金属烤瓷冠修复体因其美观和强度要求，常采用牙本质粘结技术。发生在牙体-修复体界面的微渗漏与粘结剂的封闭性能参密切相关。Rosenstiel 等[1] 认为不同粘结剂防止微渗漏能力有很大差异，White 等[5] 在体外比较了不同类型粘结剂发生微渗漏的程度，发现联用牙本质、釉质表面处理剂能增强粘结剂封闭作用。粘结剂封闭能力的大小决定于其理化性质。松风无酸水门汀是在原有聚羧酸水门汀加入了 Hy-agent 活性成分，主要用于永久性修复体，特别是在活髓牙的粘结。该产品中加入的 Hy-agent 活性成分可有效封闭牙本质小管，具有很强的杀菌能力，防止继发龋的产生。双重固化树脂水门汀是一种新研制的粘结剂，主要成份为复合树脂，树脂能在牙本质小管口形成树脂突，因而封闭能力较好。具有牙本质粘结性能和金属粘结性能，双重固化作用在临床操作方便，减少了固化前唾液的溶解作用。目前，对于这两种粘结剂的研究报道较少。本研究结果初步证实无酸水门汀及双重固化树脂水门汀具有较强的抗微渗漏性能。

关键词：温度循环试验；边缘微渗漏；金属烤瓷冠；粘结剂
中图法分类号：R783.1　　文献标识码：B

参考文献：

[1] ROSENSTIEL S F, LAND M F, CRISPIN B J. Dental luting agents: a review of the current literature [J]. J Prosthet Dent, 1998, 80(3): 280 - 301.

[2] BERGENHOLTZ G, COX C F, LOESCHE W J, *et al*. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp [J]. J Oral pathol, 1982, 11(6): 439 - 450.

[3] RETIEF D H. Do adhesives prevent microleakage? [J]. Int Dent J, 1994, 44(1): 19 - 26.

[4] JOKSTAD A, MJOR I A. Ten years' clinical evaluation of three luting cements[J]. J Dent, 1996, 24(5): 309 - 315.

[5] WHITE S N, YU Z, TOM J F, *et al*. *In vivo* microleakage of luting cements for cast crowns[J]. J Prosthet Dent, 1994, 71(4): 333 - 338.

（编辑　陈聪连）