论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1362-04

胆固醇致内皮细胞损伤对平滑肌细胞增殖和迁移的促进作用

杨一峻,罗 洁,钱民章 (563003 贵州 遵义,贵州省遵义医学院生物化学教研室)

[摘要] **目的** 观察胆固醇损伤人血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell ,HUVEC)后能否影响血管平滑肌(vascular smooth muscle,VSMC)的增殖与迁移。**方法** 用12.5、25.0、50.0 mg/L 3个浓度的胆固醇作用体外培养的HUVEC 24 h后,再用培养内皮细胞的培养基继续培养VSMC 24 h,CCK-8、划痕实验检测VSMC增殖与迁移;用12.5、25.0、50.0 mg/L的胆固醇作用共培养的HUVEC、VSMC 24 h,用Transwell检测VSMC迁移。**结果** 25.0、50.0 mg/L胆固醇作用HUVEC后的培养基与对照组相比(1.37±0.01),明显促进VSMC增殖(1.53±0.06)、(1.54±0.10)($P<0.05$);12.5、25.0、50.0 mg/L胆固醇作用HUVEC后的培养基与对照组相比(33.24±0.43)均能促进VSMC细胞迁移[(269.10±3.78)、(272.79±4.69)、(458.69±4.78),$P<0.01$]。胆固醇作用共培养的HUVEC、VSMC 24 h后,促进VSMC迁移[(175.00±4.63)、(182.00±4.13)、(207.00±5.59)],与对照组相比(101.00±2.33)差异明显($P<0.01$)。**结论** 胆固醇诱导HUVEC损伤后能够促进VSMC增殖与迁移。

[关键词] 动脉粥样硬化;血管内皮细胞;血管平滑肌细胞;胆固醇
[中图法分类号] R322.12; R329.28; R344.85 [文献标志码] A

Effect of HUVEC injury induced by cholesterol on VSMC proliferation and migration

Yang Yijun, Luo Jie, Qian Minzhang (Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury induced by cholesterol on human aortic vascular endothelial cell (HA-VSMC) proliferation and migration. **Methods** HUVEC were treated with cholesterol at 12.5, 25.0 and 50.0 mg/L for 24 h, and then the VSMCs were incubated with the medium of cultured HUVEC for 24 h. CCK-8 and scratch assay was applied to analyze VSMC viability and migration. HUVEC and VSMC was co-cultured and treated with cholesterol at 12.5, 25.0 and 50.0mg/L for 24 h. VSMC migration was detected by Transwell assay. **Results** Compared with the control group (1.37±0.01), the proliferation of VSMCs incubated with the culture medium of HUVEC treated with cholesterol at 25.0 mg/L and 50.0 mg/L increased significantly (1.53±0.06 and 1.54±0.10, $P<0.05$). The culture medium of HUVEC subjected to cholesterol at 12.5, 25.0 and 50.0 mg/L could induce VSMC migration (269.10±3.78, 272.79±4.69 and 458.69±4.78), which were significantly different from that of the control group (33.24±0.43, $P<0.01$). The co-culture of HUVEC and VSMC treated by cholesterol induced VSMC migration (175.00±4.63, 182.00±4.13 and 207.00±5.59), which were significantly different from that of the control group (101.00±2.33, $P<0.01$). **Conclusion** HUVEC, which is injured by cholesterol, can induce VSMC proliferation and migration.

[**Key words**] atherosclerosis; human umbilical vein endothelial cell; human aortic vascular endothelial cells; cholesterol

Supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Provincial Department of Science and Technology [(2009)2-178]. Corresponding author: Qian Minzhang, Tel: 86-852-8609792, E-mail: qian_mzh@hotmail.com

脂蛋白代谢异常是致动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的重要原因[1],且慢性应激可促进AS发展[2]。当血清中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein C,LDL-C)升高或高密度脂蛋白(high density

[基金项目] 贵州省科技厅自然科学基金[黔科合J字(2009)2-178]
[通信作者] 钱民章,电话:(0852)8609792,E-mail: qian_mzh@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1424.033.html(2013-03-21)

lipoprotein,HDL)逆向转运胆固醇障碍时,动脉壁细胞内和细胞之间会有游离胆固醇及其酯的大量沉积。这一现象无论是在人类自然发生的,还是实验动物用高饱和脂肪和高胆固醇膳食诱导产生的 AS 病变中均得到证实[3]。血管组织细胞暴露于高胆固醇环境中时,会造成哪些损害,以导致 AS 形成和发展,尚有许多问题并不清楚。血管平滑肌细胞增殖和迁移是 AS 形成和发展的关键病理环节[4-5]。本室前期研究发现,当胆固醇刺激因素存在时,会造成血管内皮细胞损伤[6-8]。胆固醇是否在损伤内皮细胞后进而影响血管平滑肌细胞的增殖和迁移,成为我们感兴趣的研究问题,对此问题的探讨有助于认识胆固醇致 AS 的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC, ATCC),人升主动脉平滑肌细胞(human aortic vascular endothelial cells, HA-VSMC,中南大学湘雅中心实验室细胞库),RPMI1640 培养基、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)购于 HyClone 公司,胆固醇购于 Sigma 公司,CCK-8 测定细胞增殖的试剂盒(碧云天公司),Transwell 小室(8 μm)购于 Millipore 公司,鼠抗人的 α-actin 单克隆抗体购于武汉博士德公司,S-P 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购于北京中山生物技术公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 HUVEC 的培养与条件培养基的制备

HUVEC 用含 10 % 胎牛血清,青霉素、链霉素各 100 U 的 RPMI1640 培养基,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养,1 ~ 2 d 传代。取对数生长期细胞用于实验。将胆固醇溶于乙醇溶液,待细胞生长至汇合状态时加入胆固醇溶液。胆固醇终浓度为 12.5、25.0、50.0 mg/L,乙醇浓度为 0.25%;溶媒组乙醇终浓度为 0.25%;对照组只含有 10 % FBS 的 RPMI1640 培养基,处理 24 h 后,收集上清培养基即为所需条件培养基。

1.3 VSMC 的培养与鉴定

VSMC 用含 10% 胎牛血清,青霉素、链霉素各 10 万 U 的 DMEM 高糖培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,2 ~ 3 d 传代,取对数生长期细胞用于实验。生长在培养瓶壁的活细胞,直接在倒置显微镜下进行连续观察,并拍照作记录。用平滑肌细胞特异性 α-actin 单克隆抗体进行免疫组织化学法的鉴定。

1.4 CCK-8 检测条件培养基对 VSMC 活力的影响

2×10^3 个/孔 VSMC 种入 96 孔板中,培养 24 h 后,换用条件培养基分别培养 VSMC 8、16、24 h。检测前,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,以加相应量细胞培养液和 CCK-8 溶液但未加入细胞的孔作为空白对照,放入培养箱继续培养 1 h 后,用酶标仪在 450 nm 下测定各孔的光密度值[$D(450)$]。

1.5 对 VSMC 迁移的影响

1.5.1 划痕实验 在培养板的外面绘出细胞划痕标记线,以 2×10^6 个/孔 VSMC 种入 6 孔板中,培养 24 h,细胞同步化后,用 100 μL 的无菌枪头在培养板内沿标记线对细胞进行划痕,划痕 1 次,要求划痕直,洗净刮掉的细胞,用无血清培养液轻轻吹打划痕附近,倒掉培养液,反复 3 次,尽量将刮掉的细胞冲洗干净,拍照,记录划痕宽度。之后加入条件培养基继续培养细胞 24 h 后拍照,再次测量划痕宽度,比较条件培养基作用前后的划痕宽度值差异。

1.5.2 Transwell 实验 以 2×10^4 个/孔的 HUVEC 种入 24 孔板中,培养 24 h,细胞同步化后,分别加入 3 个不同浓度胆固醇的含血清培养基,以不含血清和胆固醇的培养基作阴性对照,Transwell 迁移小室中种入 1×10^5 个/孔的 VSMC,共培养 24 h。取出小室,用 PBS 清洗,95% 的乙醇固定,苏木精-伊红染色后在普通光学显微镜下观察,随机选取不同视野拍照,计算穿膜细胞数。

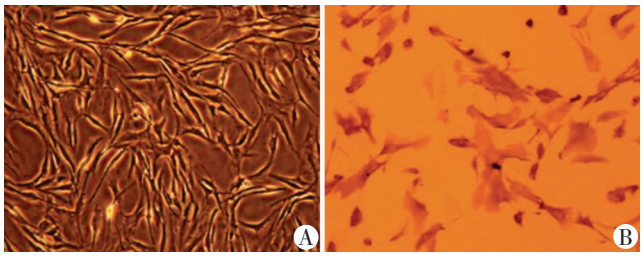
1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 VSMC 的鉴定

在倒置显微镜下连续观察,培养的 VSMC 在接种 5 ~ 6 h 后贴壁生长,细胞呈长梭型,细胞核居中,胞质均质透明,细胞平行排成“峰、谷”样结构特征(图 1A)。α-actin 单克隆抗体细胞免疫组织化学结果显示 98% 为阳性血管平滑肌细胞(图 1B)。



A:光镜(×100);B:免疫组化(S-P ×200)

图 1 光镜和免疫组化鉴定 HA-VSMC

2.2 CCK-8 检测 VSMC 活力

分别用 12.5、25.0、50.0 mg/L 的胆固醇作用 HUVEC 24 h 后,所得到的条件培养基分别作用 VSMC 8、16、24 h 后,用 CCK-8 检测实验组与对照组有活力的细胞数,比较不同时间点的细胞活力。结果显示,50.0 mg/L 胆固醇作用内皮细胞的条件培养基增强了 VSMC 的活力且作用明显($P < 0.05$),见表 1。提示高胆固醇浓度造成的内皮细胞损伤后,能促进平滑肌细胞增殖。

表 1 不同浓度胆固醇作用 HUVEC 后的培养基对 VSMC 活力的影响($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	8 h	16 h	24 h
对照组	1.005 ±0.069	1.279 ±0.081	1.270 ±0.181	1.372 ±0.014
溶媒组	0.922 ±0.043	1.335 ±0.037	1.254 ±0.080	1.286 ±0.121
胆固醇 1(12.5 mg/L)	0.998 ±0.071	1.205 ±0.052	1.285 ±0.026	1.442 ±0.075
胆固醇 2(25.0 mg/L)	0.093 ±0.039	1.198 ±0.057	1.329 ±0.161	1.528 ±0.055[a]
胆固醇 3(50.0 mg/L)	1.009 ±0.012	1.451 ±0.042[a]	1.521 ±0.141[a]	1.538 ±0.096[a]

a :$P < 0.05$,与对照组比较

2.3 划痕实验检测条件培养基对 VSMC 迁移的影响

划痕实验结果表明:不同浓度的胆固醇作用 HUVEC 24 h 的条件培养基培养 VSMC,随着胆固醇浓度增加,VSMC 迁移距离与对照组相比差异明显($P < 0.01$)。见图 2、3。

2.4 Transwell 检测共培养对 VSMC 迁移的影响

HUVEC 与 VSMC 共培养 24 h 后,显微镜下观察 VSMC 的迁移细胞数(图 4)。用胆固醇作用于 HUVEC 的实验组,VSMC 迁移数量与对照组比较差异明显($P < 0.01$)。提示胆固醇诱导内皮细胞损伤后,能够促进平滑肌细胞的迁移(图 5)。

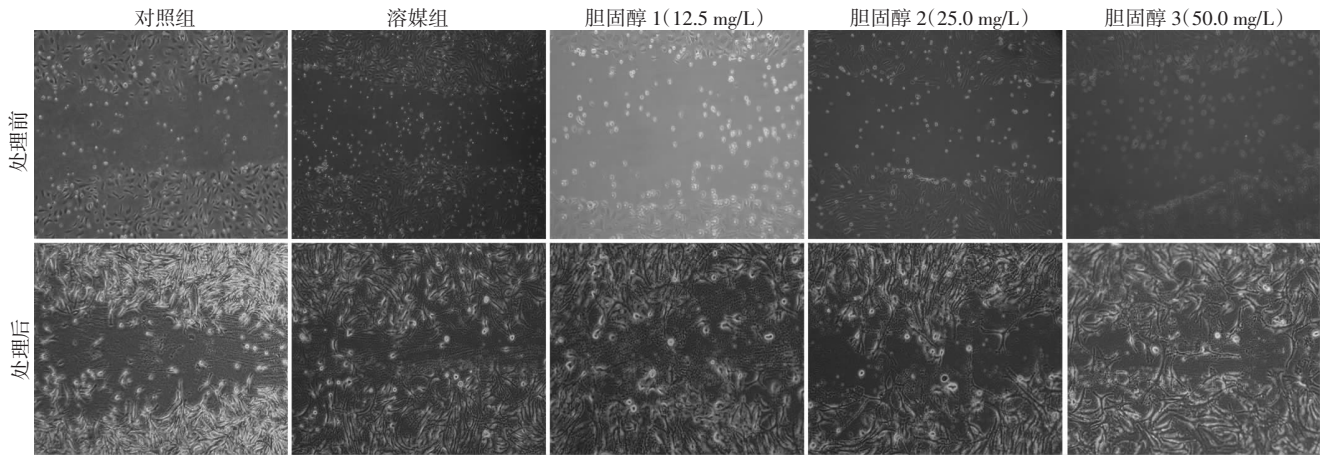
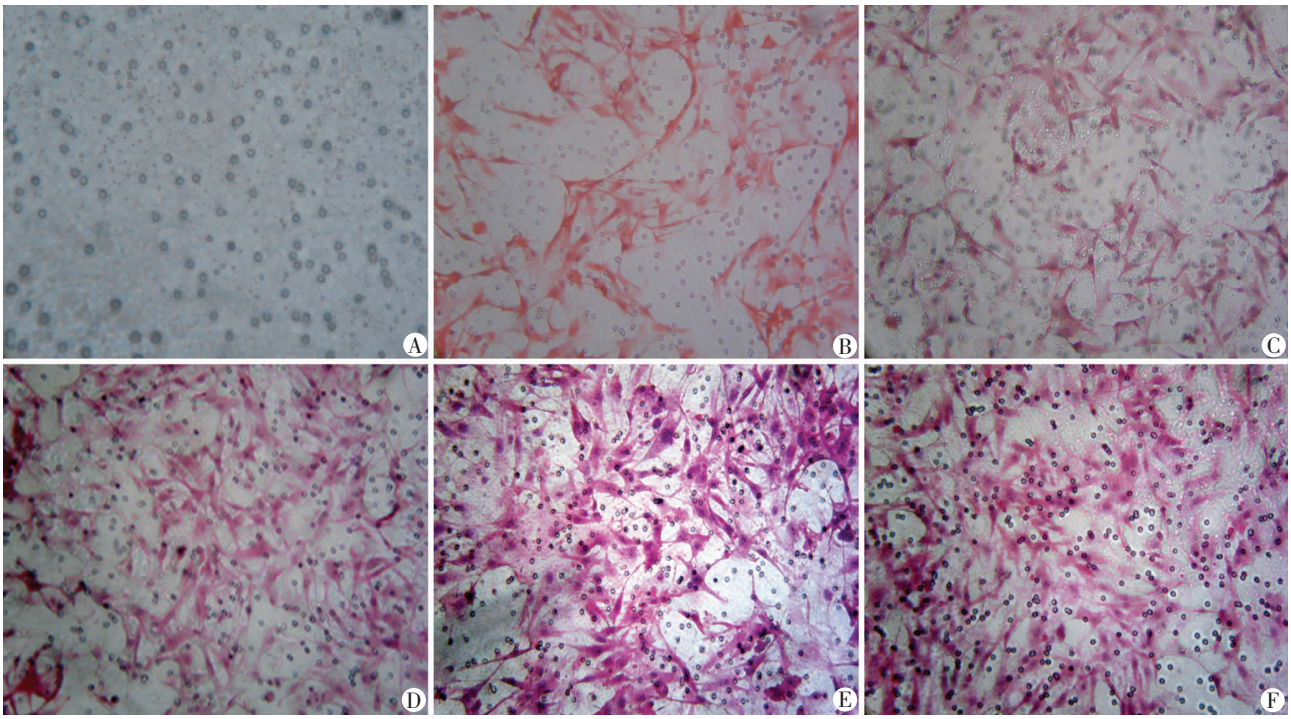
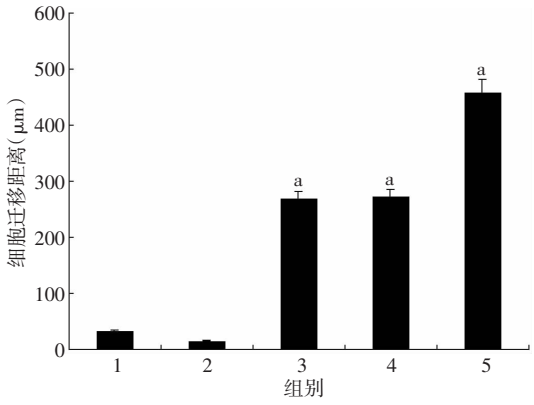


图2 划痕实验观察不同浓度组胆固醇作用HUVEC 24 h VSMC迁移的变化 (×200)



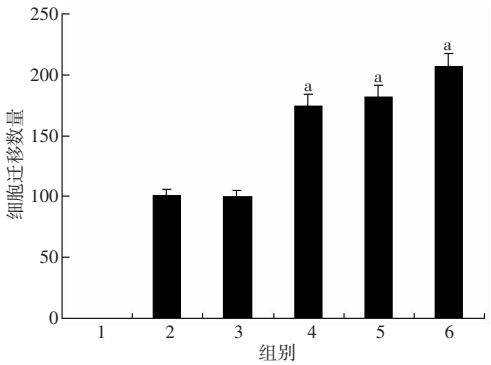
A:阴性对照组;B:对照组;C:溶媒组;D:胆固醇1(12.5 mg/L);E:胆固醇2(25.0 mg/L);F:胆固醇3(50.0 mg/L)

图4 显微镜观察不同浓度胆固醇作用HUVEC 24 h后Transwell检测VSMC迁移数目变化 (HE×200)



1:对照组;2:溶媒组;3:胆固醇1(12.5 mg/L);4:胆固醇2(25.0 mg/L);5:胆固醇3(50.0 mg/L) a:$P<0.01$,与对照组比较

图3 不同浓度胆固醇作用HUVEC 24 h VSMC迁移距离比较



1:阴性对照组;2:对照组;3:胆固醇1(12.5 mg/L);4:胆固醇2(25.0 mg/L);5:胆固醇3(50.0 mg/L) a:$P<0.01$,与对照组比较

图5 不同浓度胆固醇作用HUVEC 24 h后Transwell检测VSMC迁移数目比较

3 讨论

体内胆固醇来源为外源性、内源性两个方面:外源性胆固醇被肠道吸收后参与合成乳糜微粒(chylomicron,CM),进入血液循环,CM在血液中代谢,将其中的胆固醇转交给HDL,形成新生HDL,参与胆固醇逆向转运。肝脏合成的内源性胆固醇参与组成VLDL,进入血液循环后转化为主要携带胆固醇的LDL。LDL通过组织细胞膜上的LDL受体被细胞摄取,内吞入细胞与溶酶体结合,将胆固醇运入细胞内。在细胞内溶酶体酶的作用下,LDL中的载脂蛋白被水解为氨基酸,其中的胆固醇酯被胆固醇酯酶水解为游离胆固醇及脂酸。游离胆固醇是细胞内胆固醇的活性形式。细胞内游离胆固醇有3条去路:①酯化,构成细胞膜;②在肾上腺、卵巢等组织转化为其他类固醇;③经质膜外流到接受体HDL,通过胆固醇逆向分解代谢或转化。

LDL和HDL是体内胆固醇的运输形式,前者将胆固醇运到组织细胞,后者将其运出到肝脏代谢。正常情况下,细胞内胆固醇的摄取与排出处于一个动态平衡,细胞内不会有过多的胆固醇蓄积,但当胆固醇的摄取与排出平衡被打破时,细胞内或细胞间就可能有过多游离胆固醇的蓄积。已发现高胆固醇血症时,血管壁有胆固醇沉积[9]。这是AS形成的关键步骤之一。LDL、HDL与AS发生的关系已有很多报道,但这些沉积在细胞内和细胞间的游离胆固醇通过哪些方式、对细胞组织会造成怎样的伤害,对AS的形成有什么影响,了解认识还很不够,值得研究。这对于认识高胆固醇血症致病机理很有意义。

本实验观察了3个不同浓度胆固醇作用HUVEC后的培养基对VSMC增殖的影响。CCK-8检测的结果表明条件培养基能够促进VSMC增殖。划痕实验检测结果表明随着胆固醇浓度升高,条件培养基能够促进VSMC迁移,并存在剂量依赖关系。这表明条件培养基中存在促VSMC增殖和迁移的细胞因子。国内外研究表明:在血管壁受损时,巨噬细胞、中性粒细胞和血小板能被招募到受损部位,这些细胞可能分泌一些重要的细胞因子如VEGF、FGF和TGF-β1[10-12],这些细胞因子能调节内皮细胞的分泌,受损的内皮细胞所产生的细胞因子能够影响VSMC的增殖与迁移[13]。这些都说明胆固醇作用内皮细胞后导致了通透性和分泌功能的损伤,促细胞因子的释放,影响了VSMC的正常功能[14]。另外,在体外模拟血管结构,用胆固醇作用HUVEC并与VSMC共培养,Transwell检测到能促进VSMC迁移,随着胆固醇浓度升高,VSMC迁移明显。提示体内胆固醇在血管内沉积时,可能通过损伤内皮细胞进而促进VSMC的增殖,导致AS病变的发生、发展。这可能是胆固醇所致AS形成的机制之一。

参考文献:

[1] Moghadasian M H. Experimental atherosclerosis: a historical overview [J]. Life Sci, 2002, 70(8): 855-865.
[2] 丁绍祥. 脂质代谢失调作为慢性应激原致动脉粥样硬化的发病机制[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(11): 2154-3157.
[3] 王克勤. 脂蛋白与动脉粥样硬化[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 417-419.
[4] Lusis A J. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-241.
[5] Rivard A, Andres V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. Histol Histopathol, 2000, 15(2): 557-571.
[6] 卢志顺, 余晓, 唐俊利, 等. 胆固醇对血管内皮细胞的损伤[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1679-1681.
[7] 权媛, 钱民章. 胆固醇通过NADPH氧化酶诱导ROS升高, NF-κB活化进而导致内皮细胞损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1521-1526.
[8] 汪慧星, 杨一峻, 钱民章. 胆固醇致人血管内皮细胞DNA损伤[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(5): 442-448.
[9] Mahley R W. The role of dietary fat and cholesterol in atherosclerosis and lipoprotein metabolism [J]. West J Med, 1981, 134(1): 34-42.
[10] Wang K, Zhou X, Zhou Z, *et al*. Platelet, not endothelial, P-selectin is required for neointimal formation after vascular injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8): 1584-1589.
[11] Campbell B, Chuhran C, Lefer A M. Vascular endothelial growth factor attenuates trauma-induced injury in rats[J]. Br J Pharmacol, 2000, 129(1): 71-76.
[12] Davis R, Pillai S, Lawrence N, *et al*. TNF-α-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells involves Raf-1-mediated inactivation of Rb and transcription of E2F1-regulated genes[J]. Cell Cycle, 2012, 11(1): 109-118.
[13] Li D, Zhang C, Song F, *et al*. VEGF regulates FGF-2 and TGF-beta1 expression in injury endothelial cells and mediates smooth muscle cells proliferation and migration[J]. Microvasc Res, 2009, 77(2): 134-142.
[14] 李利华. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化[J]. 医学综述, 2010, 16(18): 2724-2726.

(**收稿**:2013-01-18;**修回**:2013-02-23)
(编辑 汪勤俭)