DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.027
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0303-02

论著

培养人动脉平滑肌细胞诱发高密度脂蛋白的氧化修饰

江 渝[1],刘 红[2],彭家和[1],叶治家[1],何凤田[1],董燕麟[1],刘秉文[3] (第三军医大学:[1]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院血液内科,重庆 400037;[3]华西医科大学基础医学院生物化学教研室,成都 610041)

提 要:目的 观察高密度脂蛋白(High density lipoprotein, HDL)经与培养人动脉平滑肌细胞(Smooth muscle cell, SMC)保温后发生氧化修饰。方法 HDL组分琼脂糖凝胶脂蛋白电泳,及其共轭二烯(Conjugated diene CD)、硫代巴比妥酸反应物质(Thiobarbituric acid reaction substance TBARS)及脂氢过氧化物(Lipid hydroperoxide LOOH)的测定。结果 HDL经过与人动脉SMC共培养后,与天然HDL(Native HDL N-HDL)比较,其电泳迁移率明显增加,其CD、TBARS及LOOH的含量均显著增加($P<0.01$)。结论 HDL经过与培养人动脉SMC 37 ℃保温48 h后可发生氧化修饰。

关键词:高密度脂蛋白;人动脉平滑肌细胞;氧化修饰
中图法分类号:R322.12;R977.6 文献标识码:A

Oxidative modification of high density lipoprotein induced by cultured human arterial smooth muscle cell

JIANG Yu, LIU Hong, PENG Jia-he, YE Zhi-jia, HE Feng-tian, DONG Yan-lin LIU Bing-wen (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the oxidative modification of high density lipoprotein(HDL) induced by cultured human arterial smooth muscle cell(SMC). Methods The oxidative modification of HDL was identified by agarose gel electrophoresis, absorbance at 234 nm, level of lipid hydroperoxide (LOOH) and fluorescence of thiobarbuturic acid reaction substance (TBARS). Results The electrophoretic mobility of HDL was increased and absorbance at 234 nm, LOOH and TBARS of HDL incubated by cultured human arterial SMC were significantly higher than that of the native HDL. Conclusion Oxidative modification of HDL could be induced by cultured human arterial SMC.

Key words: high density lipoprotein; human arterial smooth muscle cell; oxidative modification

大量研究显示,高密度脂蛋白(High density lipoprotein, HDL)具有抗动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)作用,而一旦HDL发生氧化修饰(Oxidized HDL, OX-HDL)后即具有致AS作用[1,2]。本室以往研究发现在实验性高胆固醇血症家兔及内源性高甘油三酯血症患者体内不仅存在氧化修饰低密度脂蛋白(OX-LDL),氧化修饰极低密度脂蛋白(OX-VLDL),而且也存在也存在OX-HDL[3]。说明在某些特殊情况下体内HDL可发生氧化修饰。以前对LDL和VLDL的氧化修饰机制研究较多,巨噬细胞,平滑肌细胞(Smooth muscle cell, SMC)可使LDL, VLDL发生氧化修饰,但对HDL氧化修饰机制研究报道较少。由于SMC尤其是人动脉SMC体外培养较难等原因,使有关SMC在AS发生中作用的研究受到限制。在所查文献中,迄今尚未见有关培养人动脉SMC诱发HDL氧化修饰的报道。我们在建立人胎儿主动脉SMC体外培养方法的基础上,对HDL与培养人动脉SMC37 ℃共同保温48 h后的琼脂糖凝胶电泳,CD, TBARS及LOOH的含量进行了分析。为进一步探讨HDL在体内发生氧化修饰的分子机制及部位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 人血浆HDL的制备

人血浆HDL采用张林华等[4]一次性密度梯度超速离心法制备。按Lowry法测定纯化的HDL蛋白含量。分离的HDL置0.2% EDTA的PBS透析48 h。超滤除菌后4 ℃保存。

1.2 人主动脉SMC的培养

水囊引产胎儿,胎龄18周,引产后立即取材,贴块法原代培养及传代培养。实验所用为人SMC第10~15代细胞。DMEM培养基(GIBCO, BRL),新生小牛血清(本室制),HEPES(MERCK),胰蛋白酶(DIFCO,上海化学试剂站进口分装),配制消化液与Hank氏液所需其它试剂均为国产分析纯,L-谷氨酰胺,丙酮酸钠(SIGMA),青霉素,链霉素,庆大霉素(华北制药厂),二氧化碳温育箱(QUENE, USA)。

1.3 共轭二烯,脂氢过氧化物,硫代巴比妥酸反应物质(CD, LOOH, TBARS)测定

在234 nm波长下,用日本岛津UV-120-02型紫外分光光度仪测定共轭二烯光吸收值。在560 nm波长,用日本岛津UV-120-02型紫外分光光度仪测定脂氢过氧化物光吸收值[5]。在激发光为515 nm,发射光为550 nm条件下置于日本岛津RF-510荧光分光光度计测定硫代巴比妥酸反应物质荧光强度值[6]。

1.4 琼脂糖凝胶脂蛋白电泳

先用苏丹黑B预染HDL组分,然后用0.5%琼脂糖凝胶在70~80 V下电泳20~30 min。

作者简介:江 渝(1961—),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事动脉粥样硬化发生的分子机制研究,发表论文25篇。电话:(023)68752261
收稿日期:2001-08-07;修回日期:2001-11-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 人主动脉 SMC 对 HDL 氧化修饰的影响

按传代法制备 SMC 细胞悬液(第 10～15 代细胞),接种于大号培养瓶中,细胞密度(1×10^4～1×10^5/ml,48 h 后弃培养液,用 Hank 氏液洗涤 3 次,加入适量的无血清培养基(DMEM),继续培养 24 h,弃 DMEM,加 HDL 使其终浓度为 50 μg 脂蛋白/ml 的 3% LPDS 无血清培养基,对照瓶无 SMC,仅有 HDL 和 3% LPDS无血清培养基,分别继续培养 24、48 h,然后纯化 HDL 组分,分别测定实验组、对照组 HDL 的 CD、LOOH 及 TBARS。重复实验 5 次以上。

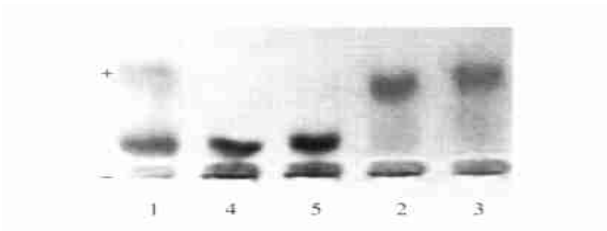
1.6 统计学方法

统计学处理采用 $\bar{x}\pm s$。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定,见图 1

由图 1 可见,HDL,LDL 与正常人血清 HDL,LDL 组分电泳迁移率一致,而经过与人动脉 SMC 保温后的 HDL 与 LDL 电泳迁移率则明显增加,表明培养人动脉 SMC 不仅能使 LDL,而且能使 HDL 发生氧化修饰。



1: Normal human serum; 2: HDL; 3: OX-HDL; 4: LDL; 5: OX-LDL

图 1 琼脂糖凝胶电泳谱

Fig 1 Agarose gel electrophoresis

2.2 共轭二烯(CD),脂氢过氧化物(LOOH),硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)鉴定,见表 1。

表 1 SMC 氧化修饰 HDL 组分的 CD,LOOH 及 TBARS 鉴定

Tab 1 Identification of smooth muscle cell oxidized HDL by CD, LOOH and BARS

No	CD(A234nm/per mg HDL)		LOOH (nmol/ per mg HDL)		TBARS (nmol/ per mg HDL)	
	N-HDL	OX-HDL	N-HDL	OX-HDL	N-HDL	OX-HDL
1	0.75	1.32	8.56	15.34	0.67	1.20
2	0.72	1.31	8.43	15.13	0.65	1.38
3	0.69	1.28	8.04	14.78	0.63	1.12
4	0.71	1.31	8.21	14.94	0.61	1.31
5	0.74	1.34	8.35	15.21	0.63	1.28
$\bar{x}\pm s$	0.722±0.024	1.312±0.022*	8.318±0.2	15.08±.222*	0.638±0.023	1.258±0.101*

*: $P<0.01$ *vs* N-HDL

由表 1 可见,经过与培养人动脉 SMC 保温后 HDL 的共轭二烯(CD)在 234 nm 光吸收,脂氢过氧化物(LOOH)含量及 TBARS 值均显著高于 N-HDL($P<0.01$)。HDL 发生氧化修饰,其 234 nm 光吸收值,脂氢过氧化物含量及 TBARS 值均增加。表明培养人动脉 SMC 与 HDL 保温 48 h 后,可使 HDL 发生氧化修饰。

3 讨论

大量流行病学,临床病理及动物实验研究均表明,HDL 有抗 AS 作用,当在特殊情况如高脂血症时,HDL 可发生氧化修饰,OX-HDL 具有致 AS 作用。

研究证明,在动脉壁内皮细胞,平滑肌细胞及巨噬细胞中的脂加氧酶作用下,LDL 可发生氧化修饰,其多不饱和脂肪酸双键重排,产生共轭二烯,在 234 nm 呈现特征性吸收峰。因此,LDL 发生氧化修饰后,234 nm 光吸收增加。此外,在 LDL 氧化修饰过程中,脂肪酸氧化断裂生成具有极高反应活性中间产物如醛类和酮类物质,这二类物质可与载脂蛋白发生结合反应,导致 LDL 的负电荷增加,因此电泳迁移率比天然 LDL 增加。当 LDL 发生氧化修饰后,氧化产物如丙二醛增加,TBARS 也随之增加,脂氢过氧化物(LOOH)含量增加[7]。因此,可用脂蛋白电泳迁移率、234 nm 光吸收,LOOH 及 TBARS 增加来鉴定 LDL 是否发生氧化修饰。和 LDL 一样,HDL 分子也含有多不饱和脂酸,推测 HDL 也可和 LDL 一样发生氧化而产生类似的变化。因此,也可用脂蛋白电泳、234 nm 光吸收、LOOH 及 TBARS 来鉴定 HDL 是否发生氧化修饰。

研究已证实,活体内 HDL 能发生氧化修饰[8]。本研究通过培养人动脉 SMC 与 HDL 保温 48 h 后,HDL 电泳迁移率,CD,LOOH 及 TBARS 均显著增加($P<0.01$),表明 SMC 能使 HDL 发生氧化修饰。推测在 SMC 与 HDL 保温过程中,激活了 SMC 内脂加氧酶,从而使 HDL 分子内的多不饱和脂酸发生氧化。本研究进一步阐明了 HDL 在体内发生氧化修饰的可能部位。我们以往研究证实,OX-HDL 可引起培养人动脉 SMC 胆固醇流出减少,SMC c-fos,PDGF 受体及 cyclinD1 等基因表达增加[9,10],而 SMC 在 AS 发生中发挥重要作用。因此,我们认为在对 AS 发病机制的研究中,不仅应注意 OX-LDL 和 OX-VLDL 的形成机制和作用,而且也应注意 OX-HDL 的形成机制和作用。

参考文献:

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. Nature, 1994, 362(4): 801－809.

[2] 汪浩川, 刘秉文, 傅明德. 天然和氧化修饰 LDL、VLDL 及 HDL 对培养人动脉平滑肌细胞原癌基因 fos 及 myc 表达的影响[J]. 生物化学杂志, 1995, 11(3): 304－310.

[3] Liu B W, Jiang Y, Fu M P, *et al*. Oxidative modification of lipoproteins in hypertriglyceridemic patients and hypercholesterolemic rabbits in vivo[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000, 207(1-2): 131－135.

[4] 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白[J]. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21(3): 257－260.

[5] Jiang Z Y, Hunt J V, Wolff S P. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein [J]. Anal Biochem, 1992, 202(2): 384－389.

[6] Liu R, Saku K, Zhang B, *et al*. *In vivo* kinetics of oxidatively modified HDL[J]. Biochem Med Metab Biol, 1993, 49(3): 392－397.

[7] Witztum J L, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis[J]. J Clin Invest, 1991, 88(6): 1 785－1 792.

[8] Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, *et al*. Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cell[J]. Ann Clin Biochem, 2000, 37(2): 179－186.

[9] 江 渝, 刘秉文, 覃 扬, 等. 氧化修饰高密度脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞原癌基因 c-fos 及 PDGF 受体基因表达的影响[J]. 华西医科大学学报, 2000, 31(1): 37－41.

[10] 江 渝, 刘秉文, 覃 扬, 等. 氧化修饰高密度脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞细胞周期蛋白 D_1 基因表达的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1999, 15(6): 978－982.

(编辑 谢义霞)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net