

氧化低密度脂蛋白与内皮素在促进血管平滑肌细胞增生中的内在联系

宋良文 王雪清 张秉钧^① 何静文^① 王泰龄^① 汤健

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

Internal Relationship between Oxidized Low Density Lipoprotein and Endothelin on Promoting Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation

SONG Liang-Wen, WANG Xue-Qing, ZHANG Bing-Jun^①, HE Jing-Wen^①, WANG Tai-Ling^① and TANG Jian

(Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing 100083. ^①Department of Pathology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT Present experiment explored internal relationship between oxidized low density lipoprotein(OLDL) and endothelin(ET) on promoting cellular proliferation using cultured rabbit's vascular smooth muscle cells (VSMC). It was found that both could stimulate VSMC to proliferate; BQ123, antagonist of ET_A receptor, could significantly inhibit the role that OLDL promoted VSMC to proliferate; ³H-TdR incorporation decreased by 13.3% compared with only OLDL group. Radial immunologic measurement on medium of cultured cells indicated that BQ123 could descended release of ET by 28.9% compared with only OLDL group. The results of immunocytochemistry were all compatible with above. It was suggested that the role that OLDL promoted VSMC to proliferate may be realized by ET in part in atherosclerotic pathogenesis.

KEY WORDS Vascular smooth muscle cell; Oxidized low density lipoprotein; Endothelin; Receptor; Proliferation; Antagonist

摘要 本实验用培养的家兔血管平滑肌细胞探讨了在促进细胞增生过程中, 氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)和内皮素之间的联系, 发现二者都可刺激血管平滑肌细胞增生。内皮素A受体拮抗剂BQ123可显著抑制OLDL的促细胞增生作用,³H-TdR的掺入量较单纯OLDL组减少13.3%;细胞培养基内皮素放射免疫测定表明,应用BQ123能使内皮素释放量较单纯OLDL组降低28.9%。免疫细胞化学检测结果亦与上述完全符合,提示在动脉粥样硬化发生中,OLDL促血管平滑肌细胞增生的作用可能部分是通过内皮素来实现的。

关键词 血管平滑肌细胞; 增生; 氧化低密度脂蛋白; 内皮素; 受体; 拮抗剂

大量实验证明,内皮素能明显促进培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增生,并被认为与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块形成有关。由于As的始动因素是高脂血症或高胆固醇血症,而血脂尤其是氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)更易促进VSMC增生,因此OLDL和内皮素在As发生中很可能存在某种内在联系^[1],本实验拟对此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 VSMC培养及³H-TdR掺入

取体重小于1.5 kg的雄性家兔,在无菌状态下取出胸主动脉,按常规的贴块法培养,培养基为MEM加20%小牛血清,传代至第3~5代细胞时以10⁵/ml个细胞接种于24孔板中,继续培养48 h,更换不含小牛血清的MEM培养24 h,使细胞统一到G₀期,然后再更换含5%小牛血清和0.5 mci · L⁻¹的³H-TdR培养基,同时加入相应的处理因素,培养

①中日友好医院病理科,北京 100029

24 h 后抽滴。

实验分为正常对照 (9 孔)、内皮素 (12 孔)、
OLDL (8 孔)、OLDL+BQ123 (12 孔)、OLDL+BQ-
3020 (11 孔) 和胆固醇 (12 孔) 6 组, 各组所加试剂
的终浓度如下: 内皮素、 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, OLDL、 40 g
(蛋白) $\cdot \text{L}^{-1}$, BQ123、 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, BQ3020、
 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 胆固醇、 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 OLDL 的氧化修饰鉴定

将喂胆固醇 2 个月 (每只每日 1 g) 的高脂血症
家兔麻醉取血, 分离血清, 经一次性密度梯度超速离
心提取 LDL^{ox}, 按文献 [3] 方法氧化 LDL, 用琼脂
糖凝胶电泳, 油红染色, 观察电泳迁移率⁽⁴⁾。

1.3 内皮素放射免疫测定

将培养的 VSMC 分为正常对照、OLDL、OLDL
+BQ123 三组, 加入试剂 24 h 后吸取培养液每孔
0.5 ml, 用真空瓶将其抽干成粉末, 进行内皮素放射
免疫测定,¹²⁵I 标记的试剂盒购自解放军总医院。

1.4 VSMC 的内皮素免疫细胞化学反应

将上述 3 组 VSMC 洗去小牛血清, 悬液和离心
细胞, 涂到玻片上, 用 ABC 法进行内皮素免疫细胞
化学染色, I 抗稀释度为 1:500。

1.5 试剂来源

内皮素及其抗体、BQ123、BQ3020 均系 Penin-
sula Co 生产, 胆固醇系北京化学试剂一厂产品。

1.6 统计学分析

文中数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析用两样本均数
比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 LDL 的修饰及鉴定

经氧化后的 LDL, 其电泳迁移率明显大
于正常的 LDL (Figure 1)。

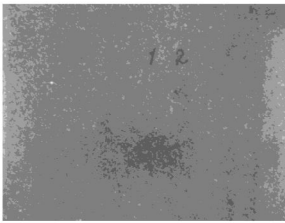


Figure 1. Electrophoretogram of LDL.
1. LDL, 2. LDL^{ox}.

2.2 ³H-TdR 掺入

内皮素和 OLDL 都具有刺激培养的
VSMC 增生的作用, 与正常对照组比较,³H-
TdR 的掺入量在内皮素刺激下增加了 22%,
在 OLDL 刺激下增加了 1.73 倍 (Figure 2)。

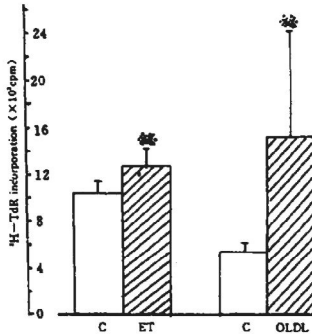


Figure 2. ³H-TdR incorporation in VSMC
stimulated with ET and OLDL.

C, control; ET, endothelin.
** compared with control, *P*<0.01.

2.3 内皮素受体拮抗剂的作用

与 OLDL 刺激 VSMC 增生的作用相
比, 同时加入内皮素 A 型受体拮抗剂 BQ123
可在一定程度上抑制 OLDL 促细胞增生的
作用,³H-TdR 掺入量较单纯 OLDL 组减少
13.3%; 相反, OLDL+BQ3020 (内皮素 B
型受体拮抗剂) 组的³H-TdR 掺入量却较
OLDL 组增加 12.1%, 但无统计学差异 (Fig-
ure 3)。

2.4 VSMC 培养液内皮素放射免疫测定

OLDL 能促进增生的 VSMC 合成并向
培养液中释放内皮素, 较正常对照组高
59.7%, 而应用了 BQ123 的组, 培养液中内
皮素含量较单纯 OLDL 组降低 28.9% (Fig-
ure 4)。

2.5 VSMC 的内皮素免疫细胞化学反应

在正常对照组, 内皮素免疫细胞化学反

应呈弱阳性, 在 OLDL 组, 免疫细胞化学反应呈强阳性, 免疫反应阳性物质呈棕黄色颗粒状, 分布于核周围, 在 OLDL+BQ123 组, 免疫反应呈弱阳性 (Figure 5)。

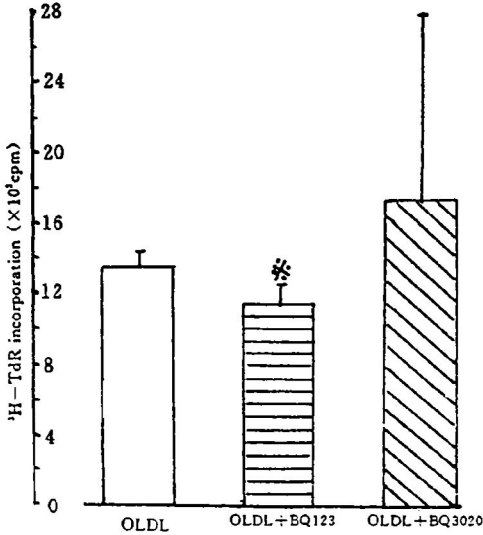


Figure 3. Effect of BQ123 and BQ3020 on VSMC proliferation stimulated with OLDL.

*: compared with OLDL group, P<0.05

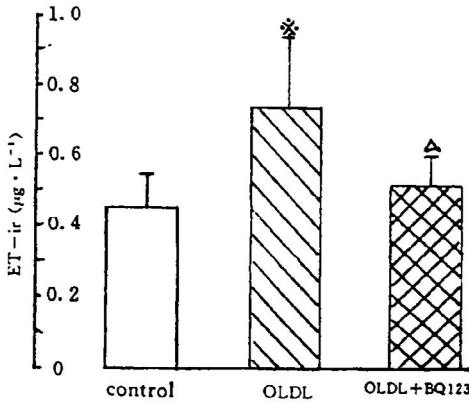


Figure 4. Release of endothelin after stimulated with OLDL and OLDL+BQ123.

*: compared with control, P<0.05

Δ: compared with OLDL, P<0.05

3 讨论

内皮素作为细胞生长因子能够促进 VSMC 增生并参与 As 斑块的形成^[5], 用人和动物的 As 斑块进行免疫组织化学和原位杂交以及反转录聚合酶链反应都已得到证

实^[6]。

内皮素通过作用于 VSMC 上的 A 型受体促进细胞内 DNA 复制和细胞分裂, 参与 As 斑块的形成。本实验证明, OLDL 能明显促进 VSMC 增生, 其程度远强于内皮素。在 OLDL 作用的同时, 加入内皮素 A 型受体拮抗剂 BQ123, 能显著降低³H-TdR 向 VSMC 中掺入; 相反, 加入内皮素 B 型受体拮抗剂 BQ3020, 能增加³H-TdR 的掺入, 但无统计学意义。上述结果提示, OLDL 的促 VSMC 增生作用至少部分是与内皮素有关或通过激活内皮素而起作用。已有实验报道^[1], OLDL 能促进内皮素基因的表达, OLDL (30~300 g · L⁻¹) 可刺激猪和人的培养的内皮细胞中前内皮素原 mRNA 的表达, 产生一个时间和浓度依赖性的内皮素释放。在完整的猪主动脉, OLDL 也能增加内皮素多肽的释放。用清道夫受体拮抗剂——硫酸葡聚糖孵育完整的猪主动脉, 能降低由 OLDL 刺激的内皮素生成。

为明确在 OLDL 作用下能否使增生的 VSMC 产生更多的内皮素, 本实验通过内皮素放射免疫测定发现, OLDL 确能促进 VSMC 产生和分泌大量的内皮素, 同时应用内皮素 A 型受体拮抗剂 BQ123 证明能够有效抑制内皮素的自分泌和旁分泌作用, 从而抑制或削弱 VSMC 增生和内皮素的产生及释放。

上述结果提示, OLDL 可能是高脂血症和 As 过程中扩大内皮素释放的内源性介质, 内皮素释放增加可促进 VSMC 增生和 As 病变的发展。

参考文献

- 1 Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, et al. Oxidized low density Lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*, 1992, 70 (6): 1191~7.
- 2 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. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21: 257~60.

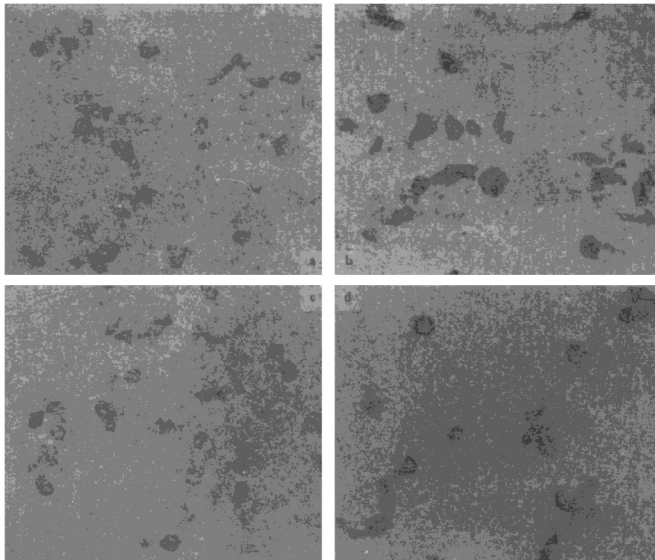


Figure 5. Endothelin (ET) immunocytochemistry on cultured vascular smooth muscle cells (VSMC).

- a: Normal control, ET immunoreaction shown weak positive in plasma of VSMC, $\times 400$.
- b: Negative control, no positive materials in plasma of VSMC, $\times 400$.
- c: LDL group, ET immunoreaction shown strong positive in plasma of VSMC, $\times 400$.
- d: LDL+BQ123 group, ET immunoreaction shown weak positive in plasma of VSMC, $\times 400$.

- 3 刘尚喜,周致,陈媛. 氧化修饰低密度脂蛋白对巨噬细胞的脂质过氧化损伤在泡沫细胞形成中的作用. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1 (1): 30~35.
- 4 Steinbrecher UP, Zhang H, Coughed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 1990, 9: 155~68.
- 5 Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*, 1991, 325: 987~1001.
- 6 宋良文,张黎钧,赵新荣, et al. 动脉粥样硬化斑块中几种基因的表达. 北京医科大学学报, 1991, 26 (增刊): 36~9.

(本文 1994-06-23 收到)