

脂质过氧化对血管内皮细胞源性生长因子合成和基因表达的影响

杨向红 陈铁镇 笹原正清^① 挟间章忠

(中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001)

Effect of Lipid Peroxidation of Endothelial Cells on Synthesis and Gene Expression of Endothelial Cell-Derived Growth Factors

YANG Xiang-Hong, CHEN Tie-Zheng, M Sasahara^① and F Hazama^①

(Department of Experimental Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, China. ^① Department of Pathology, Shiga Medical University, Japan)

Aim The purpose of this paper is to investigate whether the lipid peroxidation of endothelial cells had any effect on the production of growth factors by them.

Methods The bovine aortic endothelial cells were isolated and cultured using an enzyme-dispersal method, and the media conditioned by endothelial cells with lipid peroxidation induced by cumene hydroperoxide (LPECCM) were collected. The mitogenic activity of LPECCM for Swiss 3T3 cells was determined by incorporation of [³H]-thymidine into DNA of the cells. The effect of lipid peroxidation of endothelial cells on their synthesis and secretion of PDGF was performed with a neutralization assay using anti-PDGF antibodies and Northern blot analysis.

Results Cumene hydroperoxide induced storage of lipid peroxide in cultured endothelial cells, and there was an obvious increase in the incorporation of [³H]-thymidine into DNA in Swiss 3T3 cells treated with LPECCM compared with the control. However, the mitogenic activity of LPECCM for Swiss 3T3 cells

were not inhibited by anti-PDGF-AA and anti-PDGF-BB antibodies. Conversely, a weaker PDGF-B chain mRNA expression in endothelial cells was observed after exposure to cumene hydroperoxide.

Conclusions It seems reasonable to believe that lipid peroxidation of endothelial cells induced by cumene hydroperoxide leads to an increased synthesis and secretion of growth factors other than PDGF in cultured bovine aortic endothelial cells.

KEY WORDS Lipid peroxidation; Endothelial cell-derived growth factor; Atherosclerosis

摘要 本研究以氢过氧化枯烯作为脂质过氧化反应的引发剂,作用于培养的牛主动脉内皮细胞,制备内皮细胞条件培养液,测定其对 Swiss 3T3 细胞 DNA 合成的影响;并以抗血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)抗体中和实验和 Northern blot 分析测定了脂质过氧化作用对内皮细胞 PDGF 产生的影响。结果表明:氢过氧化枯烯使内皮细胞内脂过氧化物蓄积;氢过氧化枯烯组内皮细胞条件培养液作用的 Swiss 3T3 细胞 [³H]-TdR 的掺入量明显高于正常对照组;以抗 PDGF-AA、抗 PDGF-BB 中和抗体处理后,氢过氧化枯烯作用组的内皮细胞条件培养液对 Swiss 3T3 细胞的增殖促进活性未见减弱;并且以氢过氧化枯烯作用后内皮细胞 PDGF-B 链 mRNA 的水平比正常组有所减低。提示,由氢过氧化枯烯引发的脂质过氧化反应,使内皮细胞源性生长因子的分泌增加;并且可能为 PDGF 以外的分子物质。

关键词 脂质过氧化; 内皮细胞源性生长因子; 动脉粥样硬化

动脉中膜平滑肌细胞迁入内膜和增殖是动脉粥样硬化病变形成的重要病理过程,影响平滑肌细胞迁移和增殖的因素很多,已知血小板、

① 日本·滋贺医科大学第2病理学教室

单核/巨噬细胞、内皮细胞及平滑肌细胞本身均能产生和分泌一种或多种影响平滑肌细胞增殖的因子。体外细胞培养表明内皮细胞能产生和分泌如 PDGF、纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、HB-EGF 和小分子物质内皮素(endothelin)等^[1~3]。内皮细胞损伤是动脉粥样硬化病变发生的始动机制,损伤的内皮细胞不一定出现细胞的剥脱,多可表现为机能的失调等。我们以往的研究表明,脂质过氧化作用可引起体外培养和动物体内血管内皮细胞的形态结构损伤和前列环素减少等功能障碍。而且动物实验表明,在高血脂症状态下,脂质过氧化损伤的动脉可在短期内形成纤维斑块^[4,5]。而研究内皮细胞受脂质过氧化损伤后对平滑肌细胞增殖的影响,对进一步阐明脂质过氧化作用通过损伤内皮细胞促进和加重动脉粥样硬化病变形成的机制具有重要意义。我们最近研究发现,脂质过氧化作用能使血管内皮细胞对平滑肌细胞的致有丝分裂活性增强。所以本实验试图对脂质过氧化作用后内皮细胞条件培养液中生长因子的活性进行测定;并以 PDGF 为主进行蛋白质和基因水平的初步分析。

1 材料和方法

1.1 牛主动脉内皮细胞的培养

于无菌条件下取牛主动脉,用 PBS(-)液冲洗 3 次,向主动脉灌注 0.6% Dispase 消化液,于 37℃ 孵育 30 min。收集血管内液体,离心后,用含 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养液制成细胞悬液,分装于 100 mm 培养皿中,37℃、5%CO₂ 条件下培养。以 0.12% trypsin, 0.02% EDTA 消化传代,第 2~5 代细胞用于实验。

1.2 脂质过氧化作用实验

将培养达融合状态的内皮细胞分为 4 组,弃掉原有的培养液,3 个实验组分别加入含 0.5 mmol/L、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L 氢过氧化枯烯的 DMEM 液;对照组加入不含氢过氧化枯烯的 DMEM 液,37℃ 作用 3 h 后,分别进行光镜观察、细胞脂过氧化物含量的测定、内皮细胞条件培养液的制备及内皮细胞 DNA 的提纯等。细胞脂过氧化物含量的测定采用改进的八木法^[6],测定脂过氧化物的代谢终产物丙二醛的含量。

1.3 内皮细胞条件培养液的制备

使内皮细胞暴露于氢过氧化枯烯作用液 3 h,弃去作用液。用 PBS(-)液轻洗 2 次,加入含 0.2% 牛血清白蛋白的无血清 DMEM 培养液继续培养 24 h,收集细胞培养液上清,离心 8 000×g,10 min,取其上清液即内皮细胞条件培养液。

1.4 内皮细胞条件培养液中增殖活性的测定

测定内皮细胞条件培养液对 Swiss 3T3 细胞的 [³H]-胸腺嘧啶核苷(TdR)掺入率的影响。将生长状态良好的 Swiss 3T3 细胞以 0.25% trypsin, 0.02% EDTA 消化,离心后计数,制成 2.0×10^5 个/L 的细胞悬液,分装于 24 孔培养板中。以含 10% FBS 的培养液培养 3~4 日,弃去上述培养液,加入无血清 DMEM 液继续培养 48 h 左右,再弃去上述培养液,分别加入上述制备的 4 组内皮细胞条件培养液,以无血清 DMEM 培养液作阴性对照。作用 16~20 h 后,每孔换入含 74 MBq/L [³H]-TdR 的 DMEM 液,37℃ 孵育 2 h,以 PBS(-)冲洗 2 次,5% 三氯醋酸固定,再以 0.25 mol/L NaOH 液使细胞破裂,将细胞粉碎液加入闪烁液中,以液闪仪计数其放射比活度。

1.5 抗血小板源性生长因子抗体中和实验

以抗 PDGF-AA、抗 PDGF-BB 抗体中和 0.2 mmol/L 氢过氧化枯烯作用组内皮细胞的条件培养液,以免正常 IgG 作为对照组。各抗体的浓度分别为 0.625 mg/L、12.5 mg/L、25 mg/L 及 50 mg/L。中和条件为 37℃,2 h。将中和后的内皮细胞培养液按上述方法进行增殖活性的测定。

1.6 Northern blot 分析

内皮细胞以氢过氧化枯烯作用后,按异硫氰酸胍法^[7]提纯各组细胞的总 RNA,各取 15 μg 进行电泳分离,转移至尼龙膜上,与按随机引物法加入 [^α-³²P] dCTP 标记的 PDGF-BB cDNA 探针于 65℃ 进行杂交。洗膜后,于 -70℃ 放射自显影 1~2 天。

2 结果

2.1 细胞脂过氧化物的含量

实验组经氢过氧化枯烯作用后内皮细胞的丙二醛含量均高于正常对照组;而且随着氢过氧化枯烯作用浓度的升高,丙二醛的含量呈增加趋势(Figure 1)。此结果表明氢过氧化枯烯引发了内皮细胞的脂质过氧化反应。

2.2 内皮细胞条件培养液增殖活性的测定

将内皮细胞条件培养液加入 Swiss 3T3 细胞培养液中, 可使其 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 的掺入增加, 经氢过氧化枯烯作用后收集的內皮细胞条件培养液对 Swiss 3T3 细胞的 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 掺入率明显增高, 且其增殖促进活性与氢过氧化枯烯的作用浓度呈正相关关系 (Figure 2)。

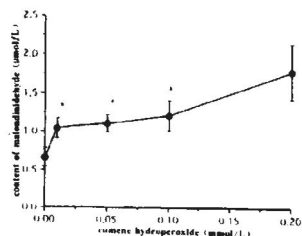


Figure 1. Concentration of lipid peroxide in cultured endothelial cells by cumene hydroperoxide stimulation.

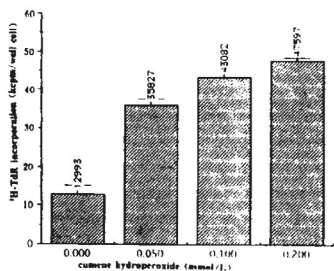


Figure 2. Effect of endothelial cell conditioned medium stimulated by cumene hydroperoxide on the incorporation of $^3\text{H-TdR}$ in Swiss 3T3 cells.

2.3 抗血小板源性生长因子中和抗体实验

以抗 PDGF-AA、抗 PDGF-BB 抗体中和 0.2 mol/L 氢过氧化枯烯作用组的內皮细胞条件培养液后, 测定其对 Swiss 3T3 细胞 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 掺入率的影响, 结果表明, 中和后与中和前比较, 其对 Swiss 3T3 细胞 $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ 掺入

率的影响无明显差异 (Figure 3)。

2.4 Northern blot 分析

可见牛主动脉內皮细胞有 PDGF-B 链的基因表达。以 0.2 mmol/L 氢过氧化枯烯作用后, 內皮细胞的 PDGF-B 链的 mRNA 水平比对照组有所减弱 (Figure 4)。

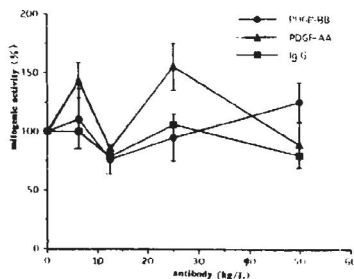


Figure 3. Mitogenic activity of endothelial cell conditioned medium neutralized by anti-PDGF AA, PDGF BB antibodies.

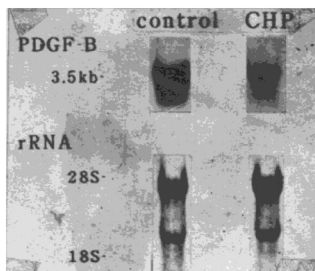


Figure 4. Analysis of PDGF-B gene expression in cultured endothelial cells from cumene hydroperoxide stimulation.

3 讨论

已知有多种分子物质均能促进血管平滑肌细胞增殖, 并且其含量在动脉粥样硬化病灶中呈增加趋势^[1]。这些分子物质可来自动脉粥样硬化病变成过程中的血小板、內皮细胞、单核

/巨噬细胞或平滑肌细胞本身。Ross^[8,9]的损伤应答学说认为,内皮细胞的机能失调是动脉粥样硬化病变发生的首发环节,从而引起的细胞间相互作用和影响可导致动脉粥样硬化病变的形成。早期病变处内皮细胞可保持其形态的完整性,但可出现正常生理机能的种种失调,包括产生和分泌生长调节因子的失调。体外培养发现,内皮细胞能分泌 PDGF、bFGF、HB-EGF 和内皮素等促有丝分裂原。并且一些刺激因素包括机械性损伤等可使其分泌增加^[10]。本研究室^[11]的实验亦表明,人脐静脉和牛主动脉内皮细胞条件培养液均能促进兔或牛主动脉中膜平滑肌细胞的 DNA 合成。

我们以往的研究表明,脂过氧化物作用于内皮细胞后,不仅可以引起体内内外皮细胞的形态损伤和功能障碍,而且可促进和加速高脂血症状态下动物动脉纤维斑块病变的形成。所以研究脂质过氧化作用后内皮细胞对周围细胞的影响,对阐明脂质过氧化作用促进和加重动脉粥样硬化病变的作用机制有重要意义。近来,我们的研究表明,内皮细胞脂质过氧化作用后对平滑肌细胞的 DNA 合成有明显的促进作用^[11]。同时,我们还以脂质过氧化物直接作用于平滑肌细胞发现其对平滑肌细胞的 DNA 合成无明显影响。

原位杂交显示,PDGF mRNA 在动脉粥样硬化斑块中有高表达^[12];而 PDGF 可出现于动脉粥样硬化病变形成的各个阶段^[13]。PDGF 可由内皮细胞和平滑肌细胞合成,但细胞培养结果显示:内皮细胞以 PDGF-B 链 mRNA 的表达为主,而平滑肌细胞以表达 PDGF-A 链占优势。本实验以抗 PDGF 抗体中和内皮细胞条件培养液,结果表明,由氢过氧化枯烯作用引发的内皮细胞条件培养液对 Swiss 3T3 细胞的增殖活性未被中和。并且 Northern blot 分析表明,氢过氧化枯烯作用后,内皮细胞的 PDGF B 链 mRNA 水平比正常组有所减弱。上述结果可推测,由脂质过氧化作用引起的内皮

细胞对平滑肌细胞等增殖活性的促进作用可能与 PDGF 以外的分子有关。此方面还有待今后进一步的研究和探讨。

参考文献

- 1 Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, et al. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (8): 2 292~296.
- 2 Casscells W. Smooth muscle cell growth factors. In *Progress in Growth Factor Research*, Vol, 3, New York, Pergamon, 1991; 177~206.
- 3 Bobik A, Grooms JA, Millar A, et al. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 1990, **258**(Cell Physiol, 27): C408~C415.
- 4 杨向红,陈铁镇. 脂质过氧化对内皮细胞的损伤及抗氧化剂的保护作用. *中华病理学杂志*, 1990, **19**(1): 8.
- 5 陈铁镇,董玉兰,杨向红,等. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *电子显微学报*, 1991, **10**(4): 393.
- 6 Ohkawa H, Ohiahi N, Yangi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, **95**(2): 351.
- 7 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid granidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156~159.
- 8 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for 1990s. *Nature*, 1993, **362**(29): 801~809.
- 9 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *New Engl J Med*, 1986, **314** (8): 488.
- 10 Michael K, Susan D. Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends Cardiovasc Med*, 1993, **3**: 213~217.
- 11 杨向红,陈铁镇. 血管内皮细胞脂质过氧化对中膜平滑肌细胞增殖的影响. *中华医学杂志*, 1996, **76**(1): 58~59.
- 12 Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, et al. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest*, 1988, **92**: 1 134~143.
- 13 Barrett TB, Benditt EP. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (8): 2 810~814.

(1995-12-25 收到, 1996-03-06 修回)