

高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白对 ECV-304 分泌一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 的影响

刘录山^{1,2}, 危当恒², 杨永宗²

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 脂蛋白, 高密度; 脂蛋白, 高密度, 氧化型; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 内皮素

[摘要] 为研究高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白对 ECV-304 分泌一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 的影响, 探讨高密度脂蛋白对内皮细胞保护作用的可能机理, 分别用不同浓度的高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白处理培养的人脐静脉内皮细胞系 ECV-304, 用比色法和放射免疫法测定一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1。结果发现随着高密度脂蛋白浓度的升高, 上清液中一氧化氮、一氧化氮合酶含量上升, 内皮素 1 含量下降。随着培养液中氧化型高密度脂蛋白浓度的升高, 上清液中一氧化氮、一氧化氮合酶含量下降, 内皮素 1 含量上升。结果提示高密度脂蛋白促使一氧化氮、一氧化氮合酶合成和分泌增加及内皮素 1 生成减少, 可能是其细胞保护作用和抗动脉粥样硬化作用的重要机制之一; 而氧化型高密度脂蛋白促使一氧化氮、一氧化氮合酶合成和分泌减少及内皮素 1 生成增加, 可能是其细胞损伤作用和促动脉粥样硬化作用的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Influence of High Density Lipoprotein and Oxidized High Density Lipoprotein on Secretion of Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase and Endothelin-1 by ECV-304

LIU Lu-Shan^{1,2}, WEI Dang-Heng², and YANG Yong-Zong²

(1. Xiangya Medical School of Central Southern University, Changsha, Hunan 410078; 2. Institute of Cardiovascular Diseases, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[MeSH] Lipoproteins, HDL; Lipoproteins, HDL, Oxidized; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Endothelins

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of high density lipoprotein(HDL) and oxidized high density lipoprotein(ox-HDL) on secretion of nitric oxide(NO), nitric oxide synthase(NOS), and endothelin 1(ET-1) by ECV-304; To provide evidence for protection effect of HDL on endothelial cells. **Methods** Different concentrations of HDL and ox-HDL were used to treat human umbilical endothelial cell line ECV-304. NO, NOS and ET-1 secreted by ECV-304 were detected with corresponding kits respectively. **Results** The results indicated that HDL increased NO and NOS secreting, and decreased ET-1 secreting. On the contrary, ox-HDL decreased NO and NOS level, and increased ET-1 level in ECV-304. **Conclusions** HDL might protect endothelial cells and antiatherosclerosis by increasing NO and NOS secreting and decreasing endothelin 1 secreting, but after oxidized such effects were lost.

大量研究表明, 血脂特别是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 呈正相关, 而高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) 与 As 呈负相关。HDL 抗 As 的机制被认为主要与其将胆固醇及胆固醇酯从血管壁转运到肝脏的功能和抑制 LDL 氧化的功能有关^[1,2]。HDL 也容易被氧化修饰形成氧化型高密度脂蛋白(oxidized high density lipoprotein, ox-HDL), ox-HDL 不仅转运胆固醇的能力下降, 而且具有细胞毒性作用, 从而促进 As 的发生。研究 HDL 对内皮细胞的保护作用及 HDL 发生氧化修饰后, 其是否与 ox-LDL 一

样具有较强的内皮损伤作用, 对认识 HDL 在 As 发病机制中的保护作用具有重要意义。本文分别用不同浓度的 HDL 和 ox-HDL 处理人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 检测它们对一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS) 和内皮素 1(endothelin-1, ET-1) 分泌的影响, 以进一步探讨 HDL、ox-HDL 对内皮细胞的作用和在 As 发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白的提取与制备

高密度脂蛋白用超速离心法提取。ox-HDL 的制备参照文献[3], 将 HDL 与 25 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 孵育

[收稿日期] 2002-05-23 [修回日期] 2002-09-15

[作者简介] 刘录山, 男, 1973 年出生, 湖南省祁东县人, 中南大学博士研究生, 主要从事动脉粥样硬化发病机制及防治研究。杨永宗, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为心血管疾病防治。

24 h, 琼脂糖凝胶电泳检测 HDL 的修饰情况, 修饰程度用硫代巴比妥法鉴定。

1.2 细胞处理和样本收集

将 ECV-304 转入 24 孔培养板, 每孔加入 1 mL 含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液培养, 待细胞生长到 80% 融合时, 分别加入 HDL 和 ox-HDL 处理 24 h, 取细胞培养上清液测 NO、NOS 和 ET-1。

1.3 一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 的测定

采用试剂盒测定, NO、NOS 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, ET-1 测定试剂盒购自解放军总医院放射免疫研究所。

1.4 实验分组

正常对照组, 未加处理因素; ④50 mg/L HDL + ECV-304; ④75 mg/L HDL + ECV-304; 100 mg/L HDL + ECV-304; 50 mg/L ox-HDL + ECV-304; 75 mg/L ox-HDL + ECV-304; ⑧100 mg/L ox-HDL + ECV-304。

1.5 统计学处理

采用组间 *t* 检验

2 结果

2.1 高密度脂蛋白的氧化修饰

HDL 与 25 μmol/L CuSO₄ 孵育 24 h 后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 HDL 的修饰情况, 经 Cu²⁺ 孵育的 HDL 电泳速度比 HDL 快, 说明 HDL 发生了氧化修饰。

2.2 高密度脂蛋白处理后一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 水平

由表 1 (Table 1) 可见, 不同浓度的 HDL 处理 ECV-304 后, NO、NOS 较正常培养组显著增高 ($P < 0.05$); ET-1 较正常培养组显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明 HDL 除可引起 NO、NOS 显著升高外, 还可使 ET-1 降低。

表 1. 高密度脂蛋白对 ECV-304 分泌一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 的影响。

Table 1. NO, NOS and ET-1 level in ECV-304 supernatant with HDL treatment ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	NO (μmol/L)	NOS (μmol/L)	ET-1 (ng/L)
Control	6	119.5 ± 8.3	7.2 ± 1.3	43.24 ± 1.80
HDL (50 μg/mL)	6	142.4 ± 11.5 ^a	12.1 ± 0.5 ^a	18.83 ± 1.75 ^a
HDL (75 μg/mL)	6	188.2 ± 9.4 ^a	15.6 ± 1.1 ^a	13.98 ± 1.75 ^a
HDL (100 μg/mL)	6	252.9 ± 14.1 ^a	21.0 ± 2.1 ^a	6.14 ± 1.40 ^a

a: $P < 0.05$, compared with control.

2.3 氧化型高密度脂蛋白处理后一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 水平

由表 2 (Table 2) 可见, HDL 被氧化修饰后作用于 ECV-304, NO、NOS 较正常培养组明显降低 ($P < 0.05$); ET-1 水平升高 ($P < 0.05$)。

表 2. 氧化型高密度脂蛋白对 ECV-304 分泌一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素 1 的影响。

Table 2. NO, NOS and ET-1 level in ECV-304 supernatant with ox-HDL treatment ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	NO (μmol/L)	NOS (μmol/L)	ET-1 (ng/L)
Control	6	119.5 ± 8.3	7.2 ± 1.3	43.24 ± 1.80
ox-HDL (50 mg/L)	6	94.4 ± 5.4 ^a	5.3 ± 0.6	78.38 ± 1.85 ^a
ox-HDL (75 mg/L)	6	87.2 ± 6.1 ^a	4.9 ± 0.4 ^a	91.02 ± 1.35 ^a
ox-HDL (100 mg/L)	6	64.6 ± 7.2 ^a	3.4 ± 0.5 ^a	107.56 ± 1.50 ^a

a: $P < 0.05$, compared with control.

3 讨论

流行病学调查及动物实验表明, 血浆 HDL 水平与 As 的发病率呈负相关^[4]。HDL 可以促使血管壁的脂质转运到肝脏代谢分解, 从而抑制 As 斑块的形成及促使其消退。HDL 通过防止 LDL 中脂质过氧化而保护内皮细胞。王瑾雯等发现 NO 有抗 LDL 氧化作用^[5]。本实验结果发现 HDL 能促进内皮细胞中 NO、NOS 的合成, 可能是其抗 LDL 氧化并具有细胞保护和抗 As 的机制之一。HDL 促进内皮细胞中 NO 的合成是通过与清道夫受体 B_{iv} 结合后激活 NOS 而实现的^[6,7]。此外 NO 在维持血管正常的舒缩功能、抑制血液中单核细胞和血小板在内皮细胞上的粘附与聚集以及抑制平滑肌细胞增殖中起着重要作用^[8-10]。因而 HDL 增加内皮源性 NO 合成是其抗 As 发生发展最重要的机制之一。本实验结果发现 HDL 抑制 ET-1 的表达。ET 作为一种强烈而持久的缩血管肽及平滑肌细胞有丝分裂原参与了一系列疾病尤其是心血管疾病的发病过程, 如高血压、As 等。因此本结果表明 HDL 抑制 ET 的合成亦是其抗 As 发生发展最重要的机制之一。近来研究结果表明, HDL 可被内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞修饰^[11], HDL 被氧化修饰后, 其性质也发生变化, 可能由抗 As 因素转变为致 As 因素。本实验发现 ox-HDL 抑制内皮细胞中 NO、NOS 的合成, 促进 ET-1 的表达, 表明其内皮细胞保护作用丧失和促进 As 发生的作用增强。本实验结果提示, HDL 促进内皮细胞中 NO 的合成和抑制 ET-1 合成, 从而起内皮细胞保护和抗动脉粥样硬化作用; 而 HDL 发生氧化修

饰后,对 NO 和 NOS 表达的调节由增强变为抑制,对 ET-1 表达的调节则由抑制变为增强,提示 HDL 发生氧化修饰后,保护内皮的作用减弱或消失。此为认识 HDL 抗 As 作用和 ox-HDL 促 As 作用提供了又一机制。

[参考文献]

- [1] Assmann G, Von Eckardstein A, Roch Nofer J, et al. Role of HDL in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 1999, Suppl iv: s1
- [2] Durrington PN, Machness B, Mackness MI. Role of HDL in preventing atherogenic modification of LDL. *Atherosclerosis*, 1999, Suppl iv: s13
- [3] 胡厚源, 陈运贞. 氧化型高密度脂蛋白对人单核细胞株 THP-1 细胞迁移及单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 132
- [4] 刘秉文, 曾成林. 高密度脂蛋白抗动脉粥样硬化作用. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2** (1): 44
- [5] 王瑾雯, 陈 璠, 周 玫. 一氧化氮在低密度脂蛋白氧化中的作用及调控研究. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (3): 222-224
- [6] Li XA, Titlow WB, Jackson BA, et al. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem*, 2002, **277** (13): 11 058-063
- [7] Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, et al. High density lipoprotein binding to scavenger receptor-B iv activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*, 2001, **7** (7): 853-857
- [8] Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 1995, **15**: 1 652-659
- [9] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, **327**: 524-526
- [10] Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin I^{I} induced migration of rat aortic smooth muscle cell: Role of cyclic nucleotides and angiotensin I^{I} receptor. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 141-149
- [11] Ghiselli G, Giorgini L, Gelati M, et al. Oxidatively modified HDLs are potent inhibitors of cholesterol biosynthesis in human skin fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 1992, **12**: 929-935

(此文编辑 曾学清)