

• 研究简报 •

氧化修饰 HDL 对培养人主动脉平滑肌 细胞胆固醇流出的影响*

江 渝 刘秉文**

(华西医科大学基础医学院生化教研室, 成都 610041)

Effect on Cholesterol Effluxing Capacity from Cultured Human Arterial Smooth Muscle Cells by Oxidized High Density Lipoprotein

J IANG Yu, L U Bingwen

(Institute of Biochemistry and Molecular Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

Abstract Intracellular accumulation of cholesterol in vascular wall cells is critical in atherosclerosis. HDL causes cholesterol effluxing from endothelial cells, macrophages and fibroblasts. To study the effect on cholesterol effluxing from cultured human arterial smooth muscle cells (SMC) by oxidized HDL (OX-HDL), effect of native HDL (N-HDL) and OX-HDL on ³H-cholesterol effluxing from cultured SMC by loading cultured human arterial SMC with ³H-cholesterol was investigated. The results showed that ³H-cholesterol effluxing capacity from cultured SMC was 44.6% after incubating 24 hours with N-HDL and was not increased by further incubating 48 and 72 hours with N-HDL. ³H-cholesterol effluxing capacity from SMC decreased significantly after SMC incubating 24, 48 and 72 hours with OX-HDL compared with N-HDL (14.6% vs 44.6%, 23.3% vs 44.2%, 30.4% vs 43.2% respectively, all $P < 0.01$). The results suggest that OX-HDL decrease significantly ³H-cholesterol effluxing from cultured human SMC and may play an important role in atherosclerosis.

Key words High density lipoprotein, Oxidative modification, Cultured human smooth muscle cells, Cholesterol efflux

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。这是由于 HDL 能够促进外周组织如血管壁内皮细胞、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 及巨噬细胞储集的胆固醇流出, 并将其转移到肝脏通过胆汁分泌而排出体外^[1], 这一过程通常称为胆固醇的逆向转运。在此过程中, HDL 首先通过与相应细胞上的 HDL 受体结合, 介导胆固醇从细胞流出。这是 HDL 抗 AS 的重要原因。HDL 氧化修饰后, 这一作用是否有改变, 引起人们关注。研究发现氧化修饰 HDL (oxidized HDL, OX-HDL) 可使巨噬细胞胆固醇流出减少^[2]。OX-HDL 可显著减少培养的人成纤维细胞及泡沫细胞胆固醇的流出。血管壁细胞胆固醇堆积可能是 AS 发生的重要原因, 血管壁细胞 (内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞) 胆固醇的堆积, 促使这些细胞转

化为泡沫细胞, 导致 AS 脂纹及斑块的形成。然而, 国内外文献中尚未见有关 OX-HDL 对培养人主动脉 SMC 胆固醇流出影响的报道。为此, 本研究在建立人主动脉 SMC 体外培养方法的基础上, 观察了 OX-HDL 对培养人 SMC 胆固醇流出的影响。为阐明 OX-HDL 致 AS 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 人血浆 HDL 的制备、氧化修饰及鉴定

1.1.1 人血浆 HDL 的制备: 新鲜人血浆购自成都市中心血站, 人血浆 HDL 采用本室张林华等^[3]一次

* 国家教育部博士学科点专项科研基金及美国纽约中华医学基金会部分资助

** 联系人, Tel: (028) 5501289, Fax: (028) 5583252

江渝, 男, 1961年2月生, 博士, 副教授

收稿日期: 1998-10-29, 修回日期: 1999-03-02

性密度梯度超速离心法制备 按改良 Low ry 法测定纯化的 HDL 蛋白质含量 分离的 HDL 置含 0.2% EDTA 的 PBS 透析 48 h 超滤除菌后 4 保存

1.1.2 HDL 的氧化修饰: HDL 氧化修饰按 La 等^[4]的方法, 将 HDL (2 mg/ml) 置 10 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的 PBS 中, 37 温育 24 h

1.1.3 共轭二烯紫外吸收测定 (CD 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光吸收值

1.1.4 硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 测定: 在激发光为 515 nm, 发射光为 550 nm 条件下按荧光法^[5]置于日本岛津 RF-510 荧光分光光度仪测定荧光强度值

1.1.5 琼脂糖凝胶脂蛋白电泳: 先用苏丹黑 B 染色天然的和氧化的 HDL 组分, 然后用 0.5% 琼脂糖凝胶在 70~80V 下电泳 20~30 min

1.2 人主动脉 SMC 的培养

水囊引产胎儿, 男性, 胎龄 18 周, 引产后立即取材, 贴块法原代培养及传代培养 实验所用为培养人 SMC 为第 10~15 代细胞

1.3 天然 HDL (Native HDL, N-HDL) 和氧化修饰 HDL (Oxidized HDL, OX-HDL) 对培养人主动脉 SMC 中 ^3H -胆固醇流出的影响

1.3.1 细胞负荷 ^3H -胆固醇: 10 μCi ^3H -胆固醇加到已灭活的小牛血清 5 ml, 混匀 37 过夜后将此血清与 DMEM 配制成 25% 完全培养基 向 SMC 培养瓶内加 3 ml ^3H -胆固醇完全培养基/瓶, 继续在 (5% CO_2 , 95% 空气, 37) CO_2 培养箱内培养 72 h

1.3.2 细胞 ^3H -胆固醇的清除: 将上述标记细胞培养瓶的培养基弃去, 用 Hank 氏液洗细胞 3 次, 分别加含终浓度为 50 μg 脂蛋白/ml 的 N-HDL 及 OX-HDL 的 3% 人 LPDS 无血清培养基 3 ml 为 N-HDL 组和 OX-HDL 组; 另加 3% LPDS 的无血清培养基 3 ml 作为对照组, 37 , CO_2 培养箱分别培养 24, 48 和 72 h

1.3.3 细胞和培养液中放射活性检测: 收集以上各瓶培养液 贴壁细胞用 Hank 氏液洗两遍按常规消化吹打细胞, 吸出消化下的细胞悬液至离心管离心 (1500 r/min, 10 min) 弃上清, 加 1 ml 生理盐水, 将细胞混悬 然后以脂质抽提液分别抽提培养液和细胞悬液各 1 ml, 分相后静置 10 min 吸取上相液 0.5 ml 至闪烁杯中, 加闪烁液 (POPOP 100 mg, PPO 1 g, 二甲苯 1000 ml) 5 ml, 暗适应 30 min 在 FJ2107P 液体闪烁计数器测各组的每分钟计数 (CPM). 细胞胆固醇

清除率以培养液的 CPM 和总的 (培养液+ 细胞中) CPM 比值的百分数表示 取 3 瓶的均数计算 SMC 胆固醇清除率 重复实验 5~6 次

DMEM 培养基 (Gibco, BRL), CO_2 培养箱 (QUENE, USA), HEPES (Merck), [^3H]-胆固醇 (中国科学院上海原子能研究所), FJ2107P 液体闪烁计数器 (西安二六二厂), 其它化学试剂均为国产分析纯

2 结 果

2.1 OX-HDL 的鉴定

2.1.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定: 见 Fig 1.

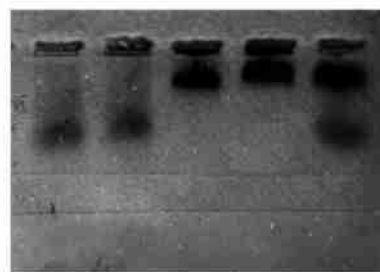


Fig 1 Agarose gel electrophoresis
1. OX-HDL; 2. N-HDL; 3. OX-LDL; 4. N-LDL; 5. Normal human serum

由 Fig 1 可见, N-HDL 与正常人血清 HDL 电泳迁移率一致, 而 OX-HDL 则明显增加

2.1.2 硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 及共轭二烯 (CD) 鉴定: 见 Table 1.

Table 1 Identification of oxidized HDL by TBARS and CD

No	n (TBARS per mg protein) / nmol		$A_{234\text{nm}}$ (CD per mg protein)	
	N-HDL	OX-HDL	N-HDL	OX-HDL
1	0.79	3.45	0.72	1.95
2	0.72	3.38	0.67	1.91
3	0.75	3.51	0.71	1.98
4	0.78	3.40	0.79	1.96
5	0.83	3.52	0.68	1.89
6	0.84	3.61	0.70	1.94
$\bar{x} \pm s$	0.785 \pm 0.046	3.478 \pm 0.086*	0.712 \pm 0.073	1.938 \pm 0.033*

* Compared with N-HDL, $P < 0.01$

由 Table 1 可见, OX-HDL 在 234 nm 光吸收 (CD) 及 TBARS 值均显著高于 N-HDL ($P < 0.01$).

HDL 发生了氧化修饰, 其 234 nm 光吸收值及 TBARS 值均增加, 由 Fig 1 可见, OX-HDL 电泳迁移率显著大于 N-HDL, 表明本实验所用 OX-HDL 符合要求

2.2 N-HDL 及 OX-HDL 对培养人 SMC 胆固醇流出的影响

N-HDL 及 OX-HDL 与人 SMC 保温 24、48 和 72 h 之后, 细胞胆固醇清除率见 Table 2

Table 2 ^3H -cholesterol effluxing capacity from cultured human arterial SMC stimulated by N-HDL and OX-HDL (%)

No	Control			N-HDL			OX-HDL		
	24 h, 48 h, 72 h(x)			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0.23	44.94	43.82	42.26	14.32	23.57	30.12		
2	0.24	45.32	43.98	15.21	24.15	29.38			
3	0.21	47.10	45.42	14.58	22.82	31.42			
4	0.25	43.26	41.34	16.03	23.43	31.10			
5	0.22	42.46	43.15	13.21	22.14	31.10			
$\bar{x} \pm s$	0.23 ± 0.02	$44.62 \pm 1.82^{1)}$	$44.23 \pm 1.27^{1)}$	$43.23 \pm 1.57^{1)}$	$14.67 \pm 1.05^{1), 2)}$	$23.22 \pm 0.82^{1), 2)}$	$30.45 \pm 0.82^{1), 2)}$		

1) Compared with control group; $P < 0.01$ 2) Compared with corresponding N-HDL group, $P < 0.01$

由 Table 2 可见, 对照组的 ^3H -胆固醇清除率几乎为 0 (0.23%)。N-HDL 与培养人动脉 SMC 保温 24 h, 即可使 SMC 的 ^3H -胆固醇流出 44.62%; 继续保温至 72 h, 流出未见增加 (43.23%)。而 OX-HDL 与 SMC 保温 24、48 及 72 h, 其细胞胆固醇清除率显著降低, 与 N-HDL 组比较, 其胆固醇清除率分别下降了 67.12%、47.50% 及 29.56%, ($P < 0.01$)。这表明 N-HDL 具有使 SMC 胆固醇流出的作用, 而 HDL 一旦氧化修饰后, 即显著降低 SMC 胆固醇的流出

3 讨 论

3.1 HDL 的重要生理功能是将外周组织细胞胆固醇转运到肝脏 胆固醇逆向转运的第一步是胆固醇自肝外细胞包括动脉壁细胞如 SMC 及巨噬细胞流出 HDL 分子中的 apoA I 是胆固醇从细胞流出不可缺少的接受体 (acceptor)。关于 HDL 促进血管 SMC 及巨噬细胞胆固醇流出的机理还不清楚 目前, 多数报道认为, HDL 与细胞膜受体结合后, 与细胞膜作用形成瞬时非极化通道, 胆固醇由该通道流出胞外^[6]。由于卵磷脂-胆固醇脂酰基转移酶在胆固醇逆向转运过程中起着重要作用, 使 HDL 能持续接收从外周组织细胞转移来的胆固醇 而 HDL 分子中的 apoA I 是该酶的激活剂, 另 apoA I 又是 HDL 受体的配体, 因此, 占 HDL 蛋白质 60%~70% 的 apoA I 在细胞胆固醇流出起着重要作用 国外研究表明, HDL 具有使胆固醇从内皮细胞, 巨噬细胞及成纤维细胞流出的作用, 并发现 HDL 经过氧化

修饰之后, 如体外 Cu^{2+} 、丙二醛及 γ 射线使 HDL 发生氧化, OX-HDL 可使培养巨噬细胞, 成纤维细胞及泡沫细胞胆固醇流出减少^[7]。

3.2 本研究显示, N-HDL 与人 SMC 保温 24 h, 可将 SMC 内近一半的胆固醇转移出细胞外 (胆固醇清除率为 44.6%), HDL 这种促使胆固醇从 SMC 流出的效率较高 而 HDL 经 Cu^{2+} 介导发生氧化修饰后, 其细胞胆固醇清除率显著降低, (44.6% vs 14.7% $P < 0.01$)。这可能由于 HDL 经过氧化修饰后, 其 apoA I 变性, 产生寡聚 apoA I, 丧失了接受从细胞流出胆固醇的能力^[6]。

3.3 本研究还表明, N-HDL 与 SMC 保温 24 h, 胆固醇清除率已达到最大 而 OX-HDL 与人 SMC 保温 24、48 及 72 h, 其细胞胆固醇流出随保温时间延长, 而逐渐增加, 分别为 14.32%、23.57% 及 30.12%。这可能是 OX-HDL 具有细胞毒所致 Hurtado 等^[8] 及 Alomar 等^[9] 分别报道, OX-HDL 对巨噬细胞和淋巴细胞有细胞毒性作用 我们发现 N-HDL 与人 SMC 培养时间长达 72 h, 光镜下观察亦未见细胞形态异常 而 OX-HDL 与人 SMC 保温 24 h 后, 镜下即可见细胞膜不平整, 有些细胞出现空泡 推测 OX-HDL 对人 SMC 有细胞毒作用 由于 OX-HDL 的细胞毒作用可引起细胞膜通透性增加, 因而细胞内胆固醇外流增加; 因此保温时间愈长, 细胞膜损伤愈大, 因而流出愈多。

References

- 1 Slotter J P, Oran J F, Bikeman E L. Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of chole-

- terol from intracellular membranes to cell surface *J Biol Chem*, 1987, **262**: 12904~ 12907
- 2 Rifici V A, Khachadurian A K. Oxidation of high density lipoproteins: Characterization and effects on cholesterol efflux from J774 macrophages *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1299** (1): 87~ 94
 - 3 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* (Zhang Linhua, Liu Bingwen. Separation of human serum lipoproteins by one-step ultracentrifugation *Acta Biochim Biophys Sin*), 1989, **21** (3): 257~ 260
 - 4 LaVille A E, Sola R, Balanya J, Turner P R, Masana L. *In vitro* oxidized HDL is recognized by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role *in vivo* *Atherosclerosis*, 1994, **105**: 179~ 189
 - 5 Liu R, Saku K, Zhang B, Hirata K, Shimomi M, Arakawa K. *In vivo* kinetics of oxidatively modified HDL. *Biochem Med Metab Biol*, 1993, **49**: 392~ 397
 - 6 Johnson W J, Mahlberg F H, Rothblat G H, Phillips M C. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1085**: 273~ 298
 - 7 Morel D W. Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein *Biochim Biophys Res Commun*, 1994, **200** (1): 408~ 416
 - 8 Hurtado I, Fiol C, Gracia V. *In vitro* oxidised HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages *Atherosclerosis*, 1996, **125**: 39~ 46
 - 9 Aomar Y, Negra-Salvayre A, Levade T. Oxidized HDL are much less cytotoxic to lymphoblastoid cell than oxidized LDL. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1128**: 163~ 166

本刊2000年起关于作者稿件编写格式的补充规定

1. 为了便利国际检索机构的收录和交流, 作者姓名的汉语拼音写法如下: 姓的字母全大写, 名首字母大写。如为双名, 名中间用短线连接, 短线后用小写, 如杨为民, 则写为 YANG W eim in。

2. 作者在投稿时, 应依据《中国图书馆分类法》(第4版) 对论文进行分类。中图分类号, 列在中文关键词下面(研究论文)或英文关键词下面(研究简报)。文章一般标识1个分类号, 多主题的文章可标识2个或3个分类号。主分类号排在第一位, 多个分类号之间应以分号隔开。

此外, 再重复强调一下, 参考文献中外国作者的姓名排列顺序: 姓全称在前, 名在后, 缩写, 但不需加缩写点, 多作者姓名之间用逗号分开。

《中国生物化学与分子生物学报》编辑部