

低密度脂蛋白不同亚组分对血管内皮细胞粘附分子表达的不同影响

王绿娅¹, 秦彦文¹, 蔺洁¹, 潘晓冬¹, 杜兰平¹, 石凤茹¹, 郭恒仪²

(1. 北京市心肺血管疾病研究所 100029; 2. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

[主题词] 脂蛋白, 低密度; 内皮, 血管; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 通过观察低密度脂蛋白不同亚组分对细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 表达的影响, 来探讨低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的分子机制。采用两次超速离心法分离制备大颗粒疏松低密度脂蛋白和小颗粒致密低密度脂蛋白, 在内皮细胞培养基中分别加入不同剂量的天然或氧化型小颗粒致密或大颗粒疏松这 4 种脂蛋白, 37℃ 温育 12 h, 用细胞酶联免疫吸附法检测细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达。结果发现, 不同剂量的 4 种脂蛋白均可使细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 蛋白表达增高, 天然或氧化型小颗粒致密低密度脂蛋白增加内皮细胞表面细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 蛋白表达呈剂量依赖性。比较相同浓度的 4 种脂蛋白的作用时发现, 25 mg 和 50 mg 小颗粒致密低密度脂蛋白增加细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 表达的作用强于大颗粒疏松低密度脂蛋白, 但差异无统计学意义; 100 mg 天然小颗粒致密低密度脂蛋白增加细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 表达的作用强于其它三种脂蛋白(细胞间粘附分子 1 的表达分别为 0.83 ± 0.09 、 0.66 ± 0.15 、 0.80 ± 0.07 和 0.76 ± 0.08 ; 血管细胞粘附分子 1 的表达分别为 0.37 ± 0.04 、 0.28 ± 0.04 、 0.29 ± 0.02 和 0.27 ± 0.03), 与天然大颗粒疏松低密度脂蛋白比较, 差异有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。此结果提示, 在诱导血管内皮细胞表面的细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 表达过程中, 小颗粒致密低密度脂蛋白的作用比大颗粒疏松低密度脂蛋白强。

[中图分类号] Q513.5

[文献标识码] A

Effect of the Subfractions of Low Density Lipoproteins on the Expression of Intercellular and Vascular Cell Adhesion Molecules in Vascular Endothelial Cell

WANG Lu-Ya¹, QIN Yan-Wen¹, LIN Jie¹, PAN Xiao-Dong¹, DU Lan-Ping¹, SHI Feng-Ru¹, and GUO Heng-Yi²

(1. Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, 100029; 2. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005; China)

[MeSH] LDL, Small Dense; Endothelium, Vascular, Vein; Intercellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of low density lipoprotein (LDL) subfractions on the expression of cell adhesion molecules, such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods** LDL subfractions, small dense LDL (sLDL) and large buoyant LDL (bLDL), were obtained by two sequential ultracentrifugation. Native sLDL (n-sLDL), oxidized sLDL (ox-sLDL), native bLDL (n-bLDL) and oxidized bLDL (ox-bLDL) were incubated with hUVEC at 37℃ for 12 hours. Cell ELISA was used to detect the expression of ICAM-1 and VCAM-1 proteins. **Results** The expression of ICAM-1 and VCAM-1 proteins were enhanced in the four groups. N-sLDL and ox-sLDL enhanced the levels of ICAM-1 and VCAM-1 in a dose dependent manner. Compared with the same dosage, ox-sLDL was the most potent stimulus for ICAM-1 and VCAM-1 expression at 25 mg and 50 mg, while n-sLDL was the most potent stimulus at 100 mg (Expression of ICAM-1 is 0.830 ± 0.09 and of VCAM-1 is 0.37 ± 0.04).

Conclusion The sLDL can induce ICAM-1 and VCAM-1 expression in hUVEC, thus influencing the pathogenesis of atherosclerosis.

大量研究表明, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 能够引起血管内皮细

胞表达粘附分子, 促进泡沫细胞形成, 参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生^[1]。近年来发现, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 具有明显的异质性, 小颗粒致密 LDL (small dense LDL, sLDL) 比大颗粒疏松 LDL (large buoyant LDL, bLDL) 具有更强的致 As 作用, 是冠心病的重要危险因素^[2]。由于血管内皮细胞损伤是 As 发生的始动环节, 本研究试图

[收稿日期] 2002-07-31 [修回日期] 2002-11-26

[基金项目] 北京市科委重点实验室基金 (953850700) 资助。

[作者简介] 王绿娅, 女, 1953 年出生, 副研究员, 从事动脉硬化性疾病的病理生理学研究, 现任北京市心肺血管疾病研究所动脉硬化研究室主任。秦彦文, 女, 1972 年出生, 助理研究员, 从事动脉硬化性疾病的病理生理学研究。蔺洁, 女, 1969 年出生, 助理研究员, 从事动脉硬化性疾病的病理生理学研究。

通过比较不同 LDL 亚组分对培养的血管内皮细胞粘附分子表达的影响,来探讨 LDL 致 As 作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 血样采集

收集正常人空腹新鲜混合血清(由本院检验科和血库提供),于 10℃、3 000 r/min 离心 15 min,收集上清,EDTA- Na_2 抗凝(终浓度 1 g/L, pH 7.4)存放于 4℃冰箱中,一周内完成 LDL 分离。

1.2 仪器

Beckman L8-80M 超速离心机和 Ti50.2 转头(美国);Abbe 折光仪(德国);Cintra 20 型紫外分光光度计(澳大利亚)二氧化碳培养箱(日本)、超净工作台、倒置显微镜(日本)。

1.3 LDL 亚组分的制备及鉴定

按本室与中国医科院基础医学研究所生物化学室建立的方法二次超速离心制备血浆 LDL^[3];取 15 mL 加入琼脂糖凝胶在 Helena 电泳分析系统中分离,油红 O 染色,扫描鉴定凝胶中的 LDL 纯度,折光仪鉴定密度。分离出的 LDL 放入透析袋中透析 24 h 后进行浓缩,4℃保存(含 EDTA- Na_2 1 g/L)。按照密度分组,bLDL 密度为 1.019~1.034 kg/L, sLDL 密度为 1.043~1.063 kg/L。采用负染电镜法透射电镜 50 000 倍观察,分规测量脂蛋白直径并照相。

1.4 LDL 亚组分的氧化性测定

将 sLDL 和 bLDL 各分为 2 份,1 份加入 EDTA (终浓度为 200 mmol/L),为天然 LDL;另 1 份加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuSO_4 ,置 37℃保温 4 h,透析 24 h,为氧化型 LDL,超滤除菌后置 4℃冰箱保存待用。用改良 BCA 法测定不同 LDL 中的蛋白,丙二醛(malondialdehyde,MDA)按照试剂盒(南京建成生物公司)介绍的方法测定,计算硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值。

1.5 血管内皮细胞培养

人脐静脉内皮细胞系(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC;由武汉大学中国动植物细胞保藏中心提供)经 1 g/L 胰蛋白酶消化后,用含有体积分数为 0.15 的新生小牛血清的 DMEM(GIBCO)液制成细胞悬液,接种在培养瓶内用含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养。

1.6 内皮细胞表面粘附分子表达的酶联免疫吸附法测定^[4]

内皮细胞以每孔 1.5×10^4 密度接种于 96 孔板

中,培养 24 h 后,加入不同浓度(25 g/L、50 g/L 和 100 g/L)的天然和氧化型 LDL 亚组分,另设未加任何刺激物的对照组。继续孵育 12 h 后,加 1% 多聚甲醛固定,用 PBS 洗涤,各 LDL 组分别加入 1:1 000 鼠抗人细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 单克隆抗体;37℃孵育 30 min,用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗涤,加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的兔抗鼠单克隆抗体,37℃反应 30 min,加入 0.04% 邻苯二胺 37℃反应 20 min,终止反应后在 490 nm 测 A 值。

1.7 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和独立样本 t 检验,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 LDL 亚组分的纯度鉴定

第一次离心获得的 LDL,密度为 1.019~1.063 kg/L,肉眼所见为金黄色,琼脂糖凝胶电泳分离后油红 O 染色只显示出单一条带,凝胶扫描为单一峰,证实为低密度脂蛋白。第二次超速离心后,将 LDL 分离为上部的 LDL,其密度小于 1.035 kg/L (密度为 1.020~1.035 kg/L)即为 bLDL,底部的 LDL 即为 sLDL (密度为 1.046~1.058 kg/L)。然后分别负染,在透射电镜下测量 sLDL 颗粒小于 25.5 nm; bLDL 颗粒大于 25.5 nm;证实此分离方法可靠。

2.2 LDL 亚组分氧化性比较

各种 LDL 的氧化性有所不同, sLDL 与 bLDL 比较不论天然或氧化修饰后 TBARS 均增高, ox-sLDL 与 bLDL 比较显著增高 ($P < 0.05$),而 ox-sLDL 与 ox-bLDL 比较,有增高趋势(表 1, Table 1)。

表 1. LDL 各亚组分间氧化性比较。

Table 1. The oxidation between the subfraction of LDL.

Groups	Protein (g/L)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS (mmol/g)
nr-sLDL	0.945	13.013	13.771 ^a
nr-bLDL	1.015	8.219	8.097
ox-sLDL	0.945	34.008	35.987
ox-bLDL	1.015	30.822	30.366

a: compared with bLDL group, $P < 0.05$.

2.3 不同 LDL 亚组分对内皮细胞表面细胞间粘附

分子 1 表达的影响

不同 LDL 亚组分均可增加内皮细胞 ICAM-1 蛋白表达($P < 0.05$)。rr-sLDL、rr-bLDL 和 ox-sLDL 三组呈剂量依赖性; 各组均以 100 mg 剂量致 ICAM-1 表达最高; 在 100 mg 剂量中, rr-sLDL 组高于其它三组; 与 rr-bLDL 组比较, ICAM-1 表达差异有显著性意义($P < 0.05$, 表 2, Table 2)。

表 2. LDL 亚组分对内皮细胞表面细胞间粘附分子 1 表达的影响(490 nm 测得的 A 值, $\bar{x} \pm s$)。

Table 3. The effect of the subfraction of LDL on the expression of ICAM-1 in vascular endothelial cell.

Groups	25 mg	50 mg	100 mg
Control	0.39 \pm 0.04		
rr-sLDL	0.48 \pm 0.11 ^a	0.50 \pm 0.08 ^a	0.83 \pm 0.09 ^{ab}
rr-bLDL	0.57 \pm 0.13 ^a	0.60 \pm 0.12 ^a	0.66 \pm 0.15 ^a
ox-sLDL	0.67 \pm 0.15 ^a	0.76 \pm 0.19 ^a	0.80 \pm 0.07 ^a
ox-bLDL	0.67 \pm 0.11 ^a	0.58 \pm 0.08 ^a	0.77 \pm 0.08 ^a

a: compared with control group, $P < 0.05$. b: compared with rr-bLDL at the same dose, $P < 0.05$.

2.4 不同 LDL 亚组分对内皮细胞血管细胞粘附分子 1 表达的影响

不同 LDL 亚组分均可增加内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达($P < 0.05$)。rr-sLDL 和 ox-sLDL 两组呈剂量依赖性, 各组均以 100 mg 剂量致 ICAM-1 表达最高; 在 100 mg 剂量中, rr-sLDL 组高于其它三组, 与 rr-bLDL 组比较 ICAM-1 表达差异有显著性意义($P < 0.05$, 表 3, Table 3)。

表 3. LDL 亚组分对内皮细胞表面血管细胞粘附分子 1 表达的影响(490 nm 测得的 A 值, $\bar{x} \pm s$)。

Table 3. The effect of the subfraction of LDL on the expression of VCAM-1 in vascular endothelial cell.

Groups	25 mg	50 mg	100 mg
Control	0.21 \pm 0.01		
rr-sLDL	0.25 \pm 0.03 ^a	0.26 \pm 0.05 ^a	0.37 \pm 0.04 ^{ab}
rr-bLDL	0.27 \pm 0.05 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	0.28 \pm 0.04 ^a
ox-sLDL	0.28 \pm 0.06 ^a	0.29 \pm 0.03 ^a	0.30 \pm 0.02 ^a
ox-bLDL	0.26 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a	0.27 \pm 0.03 ^a

a: compared with control group, $P < 0.05$. b: compared with rr-bLDL at the same dose, $P < 0.05$.

3 讨论

Ross^[5] 认为, As 是发生在大、中血管的一种慢性

特异性炎症。血管内皮细胞在引发和扩大炎症反应中起了关键的作用。白细胞与血管内皮细胞的粘附及相互作用是早期 As 形成的关键过程。ICAM-1 和 VCAM-1 属免疫球蛋白超家族成员, 是促进内皮白细胞粘附的主要蛋白, 在血管内皮细胞受损后表达增加并具有延迟表达和持续长久的特点。血管内皮细胞受损后 ICAM-1 和 VCAM-1 表达增加, 粘附以单核细胞为主的白细胞的能力增强, 进而单核细胞迁移到内皮下, 摄取 ox-LDL 转化为激活的巨噬细胞, 最终成为充满脂质的泡沫细胞^[6]。ox-LDL 能诱导血管内皮细胞表达粘附分子, 介导白细胞和血管内皮细胞的粘附, 通过一系列机制致内皮损伤, 它们相互作用触发并加重炎症反应^[7]。然而, LDL 颗粒在密度、体积、理化性质方面具有高度的不均一性。sLDL 颗粒小而且数目多, 更易进入动脉壁, 更易被氧化, 而不易被 LDL 受体识别, 因此认为 sLDL 颗粒比 bLDL 更具有致 As 性^[8]。

本文观察到, 天然 sLDL 与 bLDL 相比 TBARS 值明显增高, 提示从血中新鲜制备的 sLDL 更易被氧化, 与其自身含抗氧化物质少有关^[3]。本文中 rr-sLDL、ox-sLDL、rr-bLDL 及 ox-bLDL 4 个亚组分都能使培养的内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达增强, 与对照组比较差异明显($P < 0.05$), 提示无论天然或氧化修饰的不同大小颗粒的 LDL 均可促进内皮细胞粘附分子蛋白表达。其中 rr-sLDL 及 ox-sLDL 亚组分增加内皮细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达呈明显的剂量依赖性; 比较相同剂量的脂蛋白亚组分作用时发现, 当剂量为 25 mg 和 50 mg 时 rr-sLDL 亚组分内皮细胞表达 ICAM-1 和 VCAM-1 的作用均显著强于 rr-bLDL 亚组分, 并与 ox-sLDL 亚组分相似。在 100 mg 同样浓度下, rr-sLDL 亚组分内皮细胞表达 ICAM-1 和 VCAM-1 的作用显著强于其他各组, 提示高浓度时 rr-sLDL 对内皮表达粘附分子的作用更强。因此, 在 LDL 中 sLDL 亚组分是增强血管内皮细胞 ICAM-1 及 VCAM-1 表达的重要因素之一。可能与天然 sLDL 与内皮细胞共同孵育时更易被细胞氧化修饰有关, 而与孵育之前的 LDL 颗粒自身的氧化程度关系不密切。

低密度脂蛋白(LDL) 在培养的细胞中不断地被氧化修饰, 其结构和生物活性发生了明显的改变, 大量高活性反应物质的生成, 造成内皮脂质过氧化损伤进而促进内皮粘附分子表达。张新超等^[9] 认为 ox-LDL 促进粘附分子表达可能代表了其在 As 形成与发展中的一个关键环节, 是致 As 的又一机制。大量体外研究均证实 ox-LDL 能促进内皮粘附分子表

达^[10,11],可能存在的机制是, LDL 激活血管内皮细胞核转录因子 κB (nuclear transcription factor- κB , NF- κB), 使 NF- κB 与其抑制因子 I κB 解离, NF- κB 游离活化进入核内, 结合靶基因特定序列。ICAM-1 和 VCAM-1 基因的启动子均存在 κB 序列, 从而激活基因的转录反应^[12], 上调 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达。我们认为 sLDL 在理化性状、化学组成、代谢及致 As 作用等方面与 bLDL 存在明显差异, 具有更强的体外诱导粘附分子表达的能力, 因此本实验的结果亦支持 sLDL 较 bLDL 具有更强的致 As 作用的观点, 但其机制应进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Smalley DM, Li JH, Italiano ML, et al. Native low density lipoprotein increases endothelial cell adhesiveness by inducing ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (4): 585-590
- [2] Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, et al. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 1998, **260** (13): 1 917-921
- [3] 王绿娅, 蔺洁, 潘晓冬, 等. 小而密低密度脂蛋白的分离及其成分初步分析. *中华实用医学杂志*, 2002, **4** (1): 17-21
- [4] Kacimi R, Karkiner JS, Koudssi F, et al. Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokines, response to acute hypoxia. *Circ Res*, 1998, **82** (5): 576-586
- [5] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [6] Takami S, Yamashita S, Kihara S, et al. Lipoprotein (a) enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Circulation*, 1998, **97** (8): 721-728
- [7] Lin JH, Zhu Y, Liao HL, et al. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 1996, **127** (2): 185-194
- [8] 王绿娅. 动脉粥样硬化的病理生理机制. 见: 吴兆苏(主编). *心血管流行病学与人群防治*. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 131-136
- [9] 张新超, 徐成斌, 张彤, 等. 氧化型低密度脂蛋白和普伐他汀对人脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子-1 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 229-232
- [10] 张宇辉, 刘国仗. 粘附分子和粘附蛋白在冠心病发生发展中的作用. *心血管病学进展*, 2000, **21** (2): 113-115
- [11] Nie Q, Fan JL, Haraoka S, et al. Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis. *Lab Invest*, 1997, **77** (5): 469-482
- [12] Sugiyama S, Kugiyama K, Ogata N, et al. Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-kappaB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (4): 568-76

(此文编辑 胡必利)

关于改[主题词]为[关键词]并规范关键词选择的告示

本刊编辑部

遵照中国科协学会学术部的指示, 自 2003 年第 11 卷第 1 期起, 本刊将学术论文中的中文[主题词]改为[关键词], 编排位置不变。现就有关事项告知于众。

1 关于关键词的个数

本刊认为, 文章类别不同, 关键词个数应有所差别。本刊对各类文章规定标引的关键词是: ①实验研究论文 7 个; 其它研究论文、研究简报和快报 6 个; ②临床诊治经验、文献综述、评论和其它文章 5 个。

2 关于关键词的选择

第一个关键词列出该文主要工作或内容所属二级学科名称。与本刊有关的二级学科是: 属于生物科学类的细胞生物学、生理学、分子生物学、神经生物学和生物工程; 属于医学科学类的有流行病学、营养学、毒理学、中医学、民族医学、中西医结合医学、中药学、医学生物化学、人体解剖学、医学细胞生物学、人体生理学、人体组织胚胎学、病理学、药理学、放射医学、医学实验动物学、生物医学工程学、临床诊断学、内科学、外科学、儿科学、妇产科学、眼科学、神经病学、药物化学、生物药物学、药效学、医药工程和特种医学。

二级学科的选择, 由作者根据自己所在科室和论文内容决定, 编辑部一般不作修改。

第二个关键词列出该文研究得到的成果名称或文内若干个成果的总类别名称。

文章的研究成果名称一般应由作者自己决定, 编辑部可作适当修改。

第三个关键词视文章种类有别: 对于实验研究、临床研究和流行病学研究等论文, 列出该文在得到上述成果或结论时采用的科学研究方法的具体名称。一篇论文往往采用多种方法, 此处只列最主要的一种。对于综述和评述性论文, 此处只写“综述”或“评论”。对于方法学论文, 此处只写应用方法名称, 不写被研究的方法名称。后者出现于第二个关键词的位置。

第四个至第七个关键词必须列出在前三个关键词中没有出现的, 但被该文作为主要研究对象的事或物质名称, 或者在题目和摘要中出现的、作者认为重要的词。

作者在选择时应注意: ①集合名词、动词、动名词、形容词和副词等单独存在时不能用作关键词; 中文关键词只能用汉字或数字, 不能用英文缩写词或全英文。

以上规定, 请广大作者遵照执行。