

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0134-03

低密度脂蛋白和高密度脂蛋白对动脉 内皮细胞一氧化氮生成的影响

任敏, 曾智, 梁玉佳, 强鸥

(华西医科大学附属第一医院内科实验室, 四川省成都市 610041)

[关键词] 脂蛋白, 低密度; 脂蛋白, 高密度; 豚鼠; 内皮细胞; 一氧化氮

[摘要] 为研究高密度脂蛋白和低密度脂蛋白对动脉内皮细胞一氧化氮合成的影响, 以豚鼠动脉内皮细胞为实验对象, 用低密度脂蛋白、高密度脂蛋白及两者以不同剂量混合加入培养基中, 每组设置三种剂量, 分别于 2 h、6 h、12 h 和 24 h 测定一氧化氮含量。结果发现, 高密度脂蛋白促进内皮细胞一氧化氮的合成 ($P > 0.05$), 与剂量大小无关; 低密度脂蛋白显著抑制一氧化氮的合成 ($P < 0.001$), 与剂量相关; 混合组同样明显抑制其合成, 与低密度脂蛋白组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 各时间段一氧化氮含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 低密度脂蛋白明显抑制血管内皮细胞一氧化氮合成, 且与剂量相关, 高密度脂蛋白促进一氧化氮合成, 但不能拮抗低密度脂蛋白的作用。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

Effects of Low Density Lipoprotein and High Density Lipoprotein on Nitric Oxide Synthesized by Vascular Endothelial Cell

REN Min, ZENG Zhi, LIANG Yu-Jia, and QIANG Ou

(The Laboratory of Internal Medicine of the First Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Lipoprotein, HDL; Guinea Pig; Endothelial Cell; Nitric Oxide

ABSTRACT **Aim** To study nitric oxide (NO) variances after vascular endothelial cell were impacted by low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL). **Methods** Concentrations of NO in the cultured medium were detected in 2 h, 6 h, 12 h and 24 h after the addition of LDL, HDL and both of them respectively in the guinea pig vascular endothelial cell.

Results LDL could obviously decrease the NO synthesized by vascular endothelial cell with dose dependent ($P < 0.01$) and HDL could arise it ($P < 0.01$), LDL mixed with three levels of HDL expressed the same effect as LDL alone ($P > 0.05$). There was no difference in four time's group ($P > 0.05$).

Conclusions NO synthesized by vascular endothelial cell will be restrained by LDL and arisen by HDL but couldn't antagonist the former's.

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)增高是导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的独立危险因素。天然低密度脂蛋白对动脉内皮细胞没有作用, 但它在体内或培养过程中经细胞氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对动脉内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化的始动环节^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种作用广泛的信息分子, 与低密度脂蛋白相互影响, 作用于动脉粥样硬化形成的各个环节。文献[2, 3]报道, 动脉粥样硬化患者及实验性动物均有合成释放一氧化氮功能障碍, 但血管内皮细胞经脂蛋白作用

后一氧化氮的具体合成变化尚不明了。本文采用豚鼠动脉内皮细胞为实验对象, 分别用低密度脂蛋白和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)作用于该细胞, 观察 24 h 内一氧化氮的生成变化。

1 材料和方法

1.1 动脉内皮细胞培养

无菌条件下取 8 周龄豚鼠的胸主动脉, 将管腔外翻, 置于尖底离心管中, 用 0.1% 胶原酶 (Sigma 公司) 1 mL, 37℃ 消化 20 min, 用含 20% FCS(国产)的 M199 培养基(Gibco. BRL) 适量终止消化, 1 500 r/min × 3 离心去上清, 加 2 mL 无血清 M199, 轻轻吹打后用同样方法离心, 去上清, 最后用 20% FCS M199 3 mL 将细胞轻轻打成悬液后加入培养瓶内, 将培养瓶

[作者简介] 任敏, 女, 1963 年 6 月出生, 副研究员。曾智, 男, 45 岁, 心血管内科教授, 硕士研究生导师。

置于 5% CO₂ 孵箱, 48 h 后换液, 约 8~ 10 天后可见原代细胞生长, 待铺满瓶底后, 用 0. 25% 胰酶消化传代培养, 5 天后将所有细胞消化并收集作试验用, 并用免疫细胞化学法作第 ① 相关因子鉴定。

1. 2 细胞处理

将上述细胞加入 24 孔板内, 使每孔细胞数约为 10×10^4 , 加入 20% FCS M199, 细胞贴壁后换液, 并将 LDL (200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L)、HDL (200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L) 及 LDL (200 mg/L) 与 HDL (200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L) 分别混匀加入各孔内, 培养基作空白对照, 每组设 12 孔, 于加药后 2 h、6 h、12 h、24 h 分别取培养上清 200 μ L, - 20 $^{\circ}$ C 保存。HDL、LDL 由本校载脂蛋白研究室提供, 系采用一次性密度梯度超速离心法分离人新鲜全血获得, 其中 LDL 蛋白质定量为 2294. 5 mg/L, HDL 蛋白质定量为 6430. 3 mg/L。

1. 3 一氧化氮测定

利用硝酸还原酶特异性将培养上清中的 NO 稳定代谢产物 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻, 通过显色反应比色测

定 NO 浓度, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1. 4 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间两两比较采用方差分析, 用 SAS 软件处理。

2 结果

2. 1 细胞鉴定

经第 ① 相关因子鉴定, 95% 的细胞为血管内皮细胞。

2. 2 不同时间细胞上清一氧化氮值

各组内不同时间一氧化氮值无显著性差异 ($P > 0. 05$)。LDL 组一氧化氮值与混合组无显著性差异 ($P > 0. 05$), 但它们分别与 HDL 组有显著性差异 ($P < 0. 01$)。HDL 组组内和混合组组内同一时间一氧化氮值无显著性差异 ($P > 0. 05$), 但 LDL 50 mg/L 组与 200 mg/L 和 100 mg/L 组有显著性差异 ($P < 0. 01$)。各组与对照组均有显著性差异 ($P < 0. 01$)。

表 1. 各实验组与对照组不同时间点细胞的一氧化氮含量。

Table 1. The nitric oxide values in cultured medium in different times of experiment and control groups ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L).

Groups	2 h	6 h	12 h	24 h
Control	36. 9 \pm 6. 05	34. 39 \pm 3. 73	37. 51 \pm 5. 11	38. 78 \pm 5. 68
LDL				
200 mg/L	3. 01 \pm 0. 76 ^{abc}	6. 12 \pm 1. 51 ^{abc}	6. 30 \pm 0. 87 ^{abc}	7. 51 \pm 1. 02 ^{abc}
100 mg/L	5. 01 \pm 1. 28 ^{abc}	7. 1 \pm 2. 03 ^{abc}	6. 0 \pm 1. 10 ^{abc}	8. 1 \pm 1. 26 ^{abc}
50 mg/L	10. 89 \pm 1. 01 ^{ac}	10. 68 \pm 0. 95 ^{ac}	8. 61 \pm 1. 23 ^{ac}	11. 08 \pm 1. 47 ^{ac}
HDL				
200 mg/L	60. 63 \pm 8. 91	43. 81 \pm 7. 45 ^a	55. 57 \pm 6. 81 ^a	48. 55 \pm 7. 56 ^a
100 mg/L	46. 92 \pm 7. 56 ^a	45. 02 \pm 8. 33 ^a	41. 23 \pm 5. 01 ^a	47. 54 \pm 8. 73 ^a
50 mg/L	47. 39 \pm 7. 21 ^a	42. 11 \pm 8. 26 ^a	38. 03 \pm 7. 38 ^a	40. 22 \pm 1. 87 ^a
LDL+ HDL				
(200+ 200) mg/L	6. 31 \pm 1. 65 ^{ac}	7. 55 \pm 1. 31 ^{ac}	6. 18 \pm 2. 08 ^{ac}	11. 21 \pm 3. 27 ^{ac}
(200+ 100) mg/L	6. 25 \pm 2. 55 ^{ac}	6. 83 \pm 2. 70 ^{ac}	9. 30 \pm 1. 78 ^{ac}	10. 66 \pm 2. 34 ^{ac}
(200+ 50) mg/L	5. 10 \pm 1. 13 ^{ac}	6. 33 \pm 1. 45 ^{ac}	4. 78 \pm 1. 00 ^{ac}	11. 90 \pm 3. 10 ^{ac}

a: $P < 0. 01$, compared with control group; b: $P < 0. 01$, compared with LDL (50 mg/L) group; c: $P < 0. 01$, compared with HDL group.

3 讨论

一氧化氮作为一种传递介质和调节介质, 在心血管系统中除起到松弛血管平滑肌、控制血压外^[4], 并有抗氧化, 抑制血小板聚集, 抗粘附等生理功能^[5]。因此, 它与低密度脂蛋白互为因果, 相互作用, 在动脉粥样硬化的病理发展过程中起着重要作

用。一氧化氮由细胞中的一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, 一氧化氮 S) 合成, 血管壁三种主要细胞即血管内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞中都存在一氧化氮 S, 均能合成一氧化氮。在高脂血症患者血流中, 血浆脂蛋白作为第一信号作用于血管内皮细胞, 引起一氧化氮 S 活性的改变。本实验表明, 低密度脂蛋白能显著抑制血管内皮细胞一氧化氮的生

成,一氧化氮的减少程度与低密度脂蛋白剂量呈一定程度依赖性,即随着低密度脂蛋白剂量的增加,一氧化氮的生成随之减少,与作用时间无关。这与动脉粥样硬化患者和实验动物血浆一氧化氮减少相吻合^[2,3],说明血管内皮细胞一氧化氮的生成在调节心血管系统功能中起到主导作用。本文同时发现,高密度脂蛋白能明显增加血管内皮细胞一氧化氮的生成,虽与剂量大小无统计学意义,但有随剂量增加一氧化氮合成增加的趋势。据文献报道,高密度脂蛋白有抗低密度脂蛋白氧化修饰作用。本文高密度脂蛋白按不同剂量与低密度脂蛋白混合,共同作用于血管内皮细胞,结果并未像所推测的随着高密度脂蛋白剂量增加一氧化氮合成增加,在此,高密度脂蛋白不能影响低密度脂蛋白对血管内皮细胞一氧化氮生成的抑制作用。高密度脂蛋白的作用机制可能是将低密度脂蛋白的主要成份胆固醇运送至肝脏分解,而对血管内皮细胞的直接保护作用不明显。至于引起血管内皮细胞一氧化氮生成增加的原因尚不明了,还需进一步实验证实。低密度脂蛋白引起血管内皮细胞一氧化氮减少的具体途径也不很清楚,Minor 等报道,高脂血症患者血管内皮细胞一氧化氮

合酶的表达及一氧化氮的合成正常或是增加,但一氧化氮的活性降低可能是一氧化氮在与靶分子结合前被清除;或是作用于膜受体,通过相应的信号传导途径抑制一氧化氮合酶的活性,从而减少一氧化氮的生成,其确切机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Russell Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362**: 10
- [2] XingY, Li YJ. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis and lipid peroxidation in hypercholesterolemic rabbit [J]. *Acta Pharmac Sinica*, 1996, **12** (2): 149
- [3] 陈雪云, 马兴义, 刘传民, 等. 冠心病患者血浆氧化修饰低密度脂蛋白与血清 NO 的变化及相关性研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 1999, **15** (2): 72-73
- [4] Faraci FM. Role of NO in regulation of basilar artery tone in vivo [J]. *Am J Physiol*, 1990, **259**: 1216-1219
- [5] Raffaele de Caterina, Peter Libby, Peng HB, et al. Nitric oxide decrease cytokine-induced endothelial activation [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 60

(此文 1999-12-09 收到, 2000-05-20 修回)

(此文编辑 文玉珊)