

网络出版时间: 2020-2-19 12:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1528.020.html>

氧化低密度脂蛋白对大鼠血管内皮依赖的舒张功能的损伤及其机制

陈 硕 杜 鹃

摘要 目的 研究氧化低密度脂蛋白(OxLDL)对大鼠血管内皮依赖的舒张功能的损伤及其机制。方法 用血管张力法测定乙酰胆碱(ACh)诱导的大鼠冠状动脉(CA)和肠系膜动脉(MA)的内皮舒张反应;测定人冠状动脉内皮细胞上清液中(HCAECs)中一氧化氮(NO)和硫化氢(H₂S)浓度,利用钙成像法检测钙库操纵性钙内流(SOCE)。结果 100 mg/ml OxLDL 预处理可明显减弱 ACh 诱导的大鼠 CA 和 MA 内皮依赖性的血管舒张反应;100 mg/ml OxLDL 预处理 24 h 可显著地抑制 HCAECs 细胞中 H₂S 生成,但对 NO 生成没有明显的影响;OxLDL 对钙库释放 Ca²⁺ 及其诱导的 SOCE 有明显的抑制作用。结论 OxLDL 可损伤大鼠血管内皮依赖的血管舒张功能,其机制可能与抑制内皮细胞中 H₂S 生成和 SOCE 反应有关。

关键词 氧化低密度脂蛋白;血管内皮舒张功能;损伤;钙池操纵性钙内流;硫化氢

中图分类号 Q 463

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0259-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.020

动脉粥样硬化可诱发冠状动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死等心血管疾病^[1],其病理机制十分复杂,至今尚未完全明确。近年有研究表明氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OxLDL)在动脉粥样硬化的发生、发展中,尤其是其内皮损伤方面起着重要的作用^[2]。有研究^[2]报道 OxLDL 可引起多种血管内皮损伤,造成其功能破坏,甚至发生血管内皮细胞的凋亡。

血管内皮介导的舒张反应是血管的重要功能之一,参与器官血流供应的调节,对器官的功能,尤其在缺血性损伤时发挥重要的影响,直接关系到缺血性损伤疾病的发生、发展及其转归。但目前尚未见有文献报道 OxLDL 对血管内皮介导的舒张功能的影响。该研究拟观察 OxLDL 对大鼠冠状动脉和肠

系膜动脉的内皮依赖性舒张功能的影响,并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品与试剂 OxLDL 购自中国广州奕元生物技术有限公司;乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、U₄₆₆₁₉、Fura-2Am 及毒胡萝卜素(thapsigargin, TG) 购自美国 Sigma 公司;胰蛋白酶、胎牛血清及 1640 培养基购自中国台湾 BI 公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)和硫化氢(H₂S)检测试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.1.2 实验动物及细胞株 SD 大鼠,雄性,180 ~ 220 g;合格证号:SCXK(皖)2017-001,购自安徽医科大学实验动物中心,饲养温度在(22 ± 2) °C,通风良好,可自由摄水进食;人冠状动脉内皮细胞株(human coronary artery endothelial cells, HCAECs) 购自上海晶都有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 血管张力实验^[3] 采用 10% 水合氯醛 300 mg/kg 麻醉 SD 大鼠,迅速打开胸腔和腹腔,取出心脏和肠系膜动脉(mesenteric artery, MA),放入通入 95% O₂ + 5% CO₂ 的冰浴 PSS 液中。将心脏的尖端和右心房固定于平皿中,去除心外膜,从主动脉根部和动脉圆锥间浅表处的冠状动脉(coronary artery, CA)主干暴露并分离 CA。将分离的大鼠 CA 和 MA 制成约 2 ~ 3 mm 长的血管环。

将大鼠血管环置入盛有 5 ml 95% O₂ + 5% CO₂ 饱和的生理盐溶液[physiological salt solution, PSS; 成分(mmol/L): NaCl 119、KCl 4.7、NaHCO₃ 24、KH₂PO₄ 1.18、MgSO₄ 1.17、EDTA 0.026、CaCl₂ 1.6、glucose 5.5, pH 7.4]的 DMT 四通道血管张力测定仪的浴槽中。将一直径 20 μm 钢丝的头端顺时针固定于张力传感器上。调节显微镜放大倍数至能清晰看见钢丝尾端为宜,用显微镊夹住血管环一端缓慢通过钢丝正中并固定。再将另一根钢丝缓慢穿过血管环的管腔中,并固定于右侧传感器上。浴槽温

2019-11-27 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1708085MH187)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:陈 硕,男,硕士研究生;

杜 鹃,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: dujuan@ahmu.edu.cn

度维持在 37 ℃ ,并持续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体。血管张力采用 ML785 PowerLab/4sp 记录和分析系统测定。

血管在零张力状态下平衡 60 min 后 ,调整血管初始张力为 1 mN。再平衡 30 min ,用 30 mmol/L KCl 收缩血管后 ,用 PSS 洗脱 KCl ,连续两次。若前后两次收缩幅度差异小于 10% ,表示血管环收缩活性良好。加入 PSS 或 100 mg/L OxLDL 预处理 30 min 后 ,用 100 nmol/L U₄₆₆₁₉ 收缩血管 ,待收缩稳定后 ,加入累积浓度的 ACh ,观察血管的舒反应。

1.2.2 细胞培养^[4] 将 HCAEC 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中 ,并置于 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养。2 ~ 3 d 换液 1 次 4 d 左右传代。当细胞融合度达到 80% ~ 90% 时 ,用胰蛋白酶消化收集细胞开始实验。

1.2.3 NO^[5] 和 H₂S^[6] 将上述培养的 HCAEC 细胞移入 96 孔培养板中 (1 × 10⁶ /ml , 100 μl/孔) ,置 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中预培养稳定 12 h 后 ,在其中 5 个孔的细胞中加入终浓度为 100 μg/ml 的 Ox-LDL 为实验组 ,在另外 5 个孔的细胞中加入 PSS 为对照组。各组细胞继续在 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后 ,移入 EP 管中 3 000 r/min 离心 10 min。分别按照 NO 和 H₂S 检测试剂盒说明书提供的操作方法 ,在 550 nm 和 670 nm 处测定离心的上清液中 NO 和 H₂S 的吸光度 (OD)。

1.2.4 钙库操纵性钙内流 (store-operated calcium entry ,SOCE) 的测定^[7-8] 将上述离心沉淀的 HCAEC 细胞重新悬浮后 ,加入终浓度为 5 μmol/L 的 Fura-2Am 在 37 ℃ 培养箱中孵育 30 min 后接种于多聚赖氨酸包被的玻璃片上。玻片用无钙 PSS 溶液 (mM: NaCl 140、MgCl₂ 1.0、KCl 5.0、EGTA 0.2、glucose 10、HEPES 4.0 ,pH 7.4) 清洗 2 遍后 ,置含有

500 μl 无钙 PSS 的钙成像仪浴槽中 ,实时记录细胞内游离的 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 的荧光信号。实验中 ,首先记录静息 [Ca²⁺]_i 的荧光信号 ,然后加入终浓度为 2 μmol/L 的 TG 耗竭性促进钙池释放 Ca²⁺ ,最后加入终浓度为 1 mmol/L Ca²⁺ 引起钙池操纵性钙通道 (store-operated calcium channel ,SOCC) 介导的 Ca²⁺ 内流 (即 SOCE) ,连续记录 20 min。 [Ca²⁺]_i 由钙荧光信号强度来表示 ,钙池释放 Ca²⁺ 量和 SOCE 分别由加入 TG 时最高荧光信号强度与静息荧光信号强度之差和加入 1 mmol/L Ca²⁺ 时最高荧光信号强度与静息信号荧光强度之差来表示。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析 ,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用方差分析 (ANOVA) ,两组之间比较采用 *t* 检验 ,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OxLDL 对大鼠血管内皮舒张功能的影响 结果如图 1 所示 ,ACh 在 1 × 10⁻⁹ ~ 1 × 10⁻⁵ mol/L 范围内可显著地引起大鼠肠系膜动脉和冠状动脉的舒张 (*P* < 0.01)。与在大鼠肠系膜动脉上的作用一样 ,100 mg/L OxLDL 预处理可明显减弱 ACh 诱导的冠状动脉舒张作用 (*P* < 0.01)。鉴于 ACh 诱导的血管舒张作用为内皮依赖性的 ,该结果提示 OxLDL 预处理可减弱大鼠冠状动脉的内皮舒张依赖的舒张功能。

2.2 OxLDL 对 HCAEC 细胞中 NO 和 H₂S 含量的影响 结果如图 2A 所示 ,与对照组相比 ,当 HCAEC 细胞与 100 μg/mL OxLDL 孵育 24 h 时 ,培养上清液中 NO 含量没有明显的差异 ,提示 OxLDL 对 HCAEC 细胞中 NO 生成未见明显的影响;图 2B 表明 100 μg/ml OxLDL 可显著地降低 HCAEC 细胞

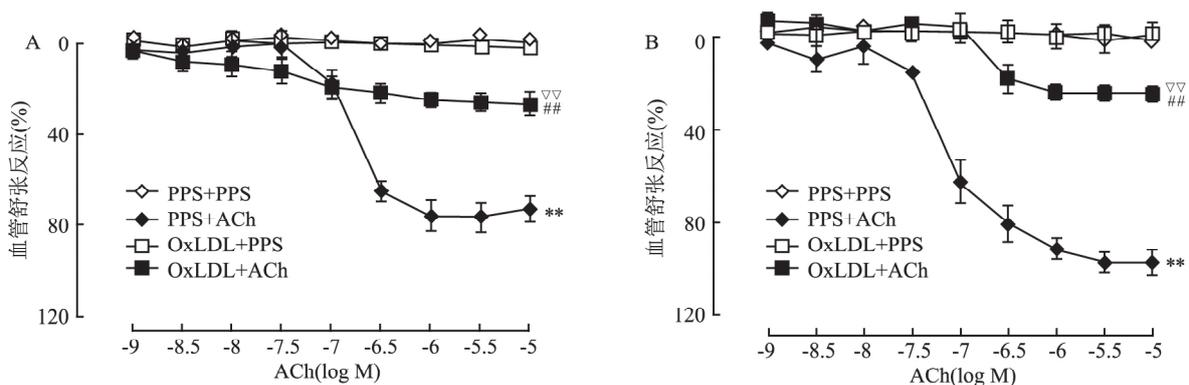


图 1 OxLDL 对 ACh 诱导的大鼠血管内皮依赖性舒张功能的影响

A: 肠系膜动脉; B: 冠状动脉; 与 PPS + PPS 组比较: ** *P* < 0.01; 与 OxLDL + PPS 组比较: ## *P* < 0.01; 与 PPS + ACh 组比较: ∇∇ *P* < 0.01

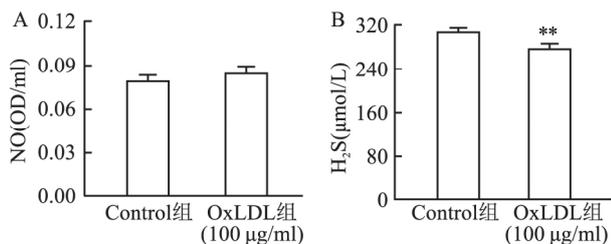


图2 OxLDL对HCAECs细胞培养上清液中NO和H₂S含量的影响

A: NO含量; B: H₂S含量; 与Control组比较: ** $P < 0.01$

培养上清液中H₂S浓度($P < 0.01$) ,提示OxLDL可抑制内皮细胞中H₂S的生成。

2.3 OxLDL对HCAEC细胞SOCE的影响 结果如图3A所示,100 µg/ml OxLDL孵育24 h虽可使HCAEC细胞中静息[Ca²⁺]_i有增加的趋势,但与对照组比较无明显的差异;OxLDL可明显地减少TG诱导的钙库释放Ca²⁺ ($P < 0.05$) ,并进而抑制其诱导的SOCE ($P < 0.05$) ,该结果表明OxLDL对TG诱导的钙库释放Ca²⁺和及其诱导的SOCE有明显的抑制作用。

3 讨论

众所周知ACh诱导的血管舒张反应为内皮依赖性。在去除内皮的血管上,ACh则丧失其血管舒张作用,甚至还会诱导轻微的血管收缩作用^[9-10]。本研究观察到在 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L范围内,ACh可显著地舒张U₄₆₆₁₉预收缩的大鼠CA和MA,而100 mg/L OxLDL预处理可明显减弱ACh对大鼠CA和MA的舒张作用,表明OxLDL预处理对大鼠血管内皮介导的血管舒张功能有一定的损伤作用。

ACh诱导的内皮依赖性舒张反应是通过促进血管内皮合成和释放内皮衍生舒张因子而产生的。H₂S作为一种新型的气体信号分子和内皮源性血管

舒张因子受到了越来越多的关注。内皮源性H₂S可由胱硫醚-γ-裂解酶催化半胱氨酸(L-cysteine)或3-巯基丙酮酸硫转移酶联合半胱氨酸氨基转移酶催化3-巯基丙酮酸生成的。血管内皮细胞通过这些酶促反应可产生足够量的H₂S来舒张平滑肌细胞,降低血管的张力^[11]。内皮源性H₂S诱导的舒张作用与激活平滑肌细胞上的钙激活钾(K_{Ca})通道有关^[6,12]。NO也是血管内皮生成的一种主要的舒张因子之一。为探讨OxLDL损伤血管内皮舒张功能的机制,本研究在体外培养了人冠状动脉内皮细胞(HCAECs细胞株),观察OxLDL对HCAEC细胞中NO和H₂S生成的影响。结果表明OxLDL对HCAEC细胞中NO生成无明显影响,但可显著地降低H₂S的生成,提示抑制H₂S的生成可能是OxLDL损伤血管内皮舒张功能的机制之一。

当细胞中内质网等钙池中Ca²⁺减少到一定的程度,为补充钙池中Ca²⁺,可诱导钙库操纵的钙离子通道(store-operated calcium channel, SOCC)的激活,导致细胞外的Ca²⁺内流,即SOCE的发生。SOCE广泛存在于兴奋细胞和非兴奋细胞中,尤其在血管内皮细胞、上皮细胞等非兴奋细胞中是Ca²⁺内流产生的主要方式,可参与调节细胞的多种生物学功能。血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)可通过增殖和迁移对受损血管进行修复。有研究表明上调SOCE可增加[Ca²⁺]_i,进而促进EPCs的增殖和迁移,对血管产生保护作用^[13]。因此,SOCE可能是血管损伤的一个新的治疗靶点。

TRP4通道是内皮细胞中SOCC中不可缺少的组成部分。在TRP4^{-/-}小鼠上,由于TRP4通道的敲除导致了SOCE的缺失,显著地减弱了ACh的血管内皮依赖性的舒张作用^[14]。在豚鼠主动脉上,Ca²⁺载体A23187可通过一种未知的机制耗尽储存

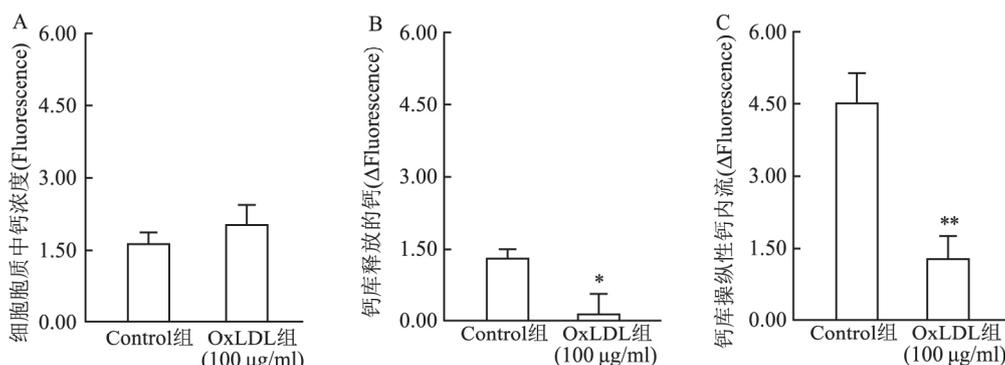


图3 OxLDL对HCAEC细胞的钙库操纵性钙内流(SOCE)的影响

A: 静息胞质钙浓度; B: 钙库释放的钙; C: SOCE; 与Control组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

的 Ca^{2+} 激活 SOCC, 导致 SOCE 的发生, 可产生内皮依赖性的血管舒张反应^[15]。这些研究资料表明内皮细胞 SOCE 与血管内皮舒张功能密切相关, SOCE 的缺失或减弱可损害血管内皮依赖性的舒张功能。本研究结果表明 OxLDL 可明显地减弱 TG 诱导 HCAEC 细胞钙库释放 Ca^{2+} , 并进而抑制 SOCE 的发生, 这与其减弱 ACh 诱导的大鼠血管内皮依赖性舒张反应是一致的, 提示减弱内皮细胞 SOCE 可能也是 OxLDL 损伤血管内皮依赖性舒张功能的机制之一, 至于详细机制有待于今后的进一步研究。

参考文献

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生. 中国心血管病报告 2017 [J]. 中国循环杂志 2018, 18(12): 1-23.
- [2] 张强, 徐立. Ox-LDL 在动脉粥样硬化中的致病机制及检测方法研究进展 [J]. 国际检验医学杂志 2018, 39(19): 2432-6.
- [3] Wen J Y, Gao S S, Chen F L, et al. Role of CSE-produced H_2S on cerebrovascular relaxation via RhoA-ROCK inhibition and cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(3): 1565-74.
- [4] Ren X, Ren L, Wei Q, et al. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells [J]. Cardiovasc Diabetol 2017, 16(1): 52.
- [5] Zhang J H, Chen Z W, Wu Z. Late protective effect of pharmacological preconditioning with total flavones of rhododendra against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Can J Physiol Pharmacol 2008, 86(3): 131-8.
- [6] Wang M, Hu Y, Fan Y, et al. Involvement of hydrogen sulfide in

- endothelium-derived relaxing factor-mediated responses in rat cerebral arteries [J]. J Vasc Res 2016, 53(3-4): 172-5.
- [7] 杜 鹃, 闫德俊, 杨云云, 等. 高糖对肾小球系膜细胞 BKCa-Orai1 信号复合物表达与功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(6): 846-50.
 - [8] 闫德俊, 尹 胜, 丁圣刚, 等. 钙库操纵钙内流和钠钙交换体在卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩中的作用 [J]. 安徽医科大学学报 2017, 52(8): 1137-41.
 - [9] 杨宝峰, 陈建国. 药理学 [M]. 9 版, 北京: 人民卫生出版社, 2018: 51-2.
 - [10] Han J, Chen Z W, He G W. Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat [J]. J Pharmacol Sci 2013, 121(4): 318-26.
 - [11] Leffler C W, Parfenova H, Basuroy S, et al. Hydrogen sulfide and cerebral microvascular tone in newborn pigs [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011, 300(2): H440-7.
 - [12] Cheng Y, Ndisang J F, Tang G, et al. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004, 287(5): H2316-23.
 - [13] Wang L Y, Zhang J H, Yu J, et al. Reduction of store-operated Ca^{2+} entry correlates with endothelial progenitor cell dysfunction in atherosclerotic mice [J]. Stem Cells Dev 2015, 24(13): 1582-90.
 - [14] Freichel M, Suh S H, Pfeifer A, et al. Lack of an endothelial store-operated Ca^{2+} current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice [J]. Nat Cell Biol 2001, 3(2): 121-7.
 - [15] Taniguchi H, Tanaka Y, Hirano H, et al. Evidence for a contribution of store-operated Ca^{2+} channels to NO-mediated endothelium-dependent relaxation of guinea-pig aorta in response to a Ca^{2+} ionophore, A23187 [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 1999, 360(1): 69-79.

Damage of oxidized low density lipoprotein on rat vascular endothelium-dependent relaxation function and its mechanism

Chen Shuo, Du Juan

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of human oxidized low density lipoprotein (OxLDL) on rat vascular endothelium-dependent relaxation and its mechanism. **Methods** Acetylcholine (ACh)-induced endothelium-dependent relaxations of rat coronary artery (CA) and mesenteric artery (MA) were examined by using examination of vascular tone; nitric oxide (NO) and H_2S concentrations in supernatant of cultured human coronary artery endothelial cells (HCAECs) were measured by commercial kit; store-operated calcium entry (SOCE) in HCAECs were measured by using fluorescent dye Fura-2Am. **Results** 100 mg/ml OxLDL pretreatment markedly decreased ACh-induced endothelium-dependent relaxation of rat CA and MA; pretreatment of OxLDL 100 mg/ml for 24 h significantly inhibited the production of H_2S rather than NO in the HCAECs; OxLDL significantly inhibited the release of Ca^{2+} from the store and subsequent SOCE in HCAECs. **Conclusion** OxLDL could damage rat vascular endothelium-mediated vasodilation, and its mechanism may be related to the inhibitions of H_2S production and SOCE in endothelial cells.

Key words oxidized low density lipoprotein; vascular endothelium-dependent relaxation; damage; store-operated calcium entry; H_2S