

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000378

三油酸甘油酯对大鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖的影响

王雅琴, 秧茂盛

(重庆医科大学药学院生化与分子药理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究三油酸甘油酯对大鼠主动脉血管平滑肌细胞(rat aortic smooth muscle cells, RASMC)增殖的影响。**方法:**采用体外细胞培养、油红染色观察细胞形态的变化;MTT法、流式细胞术检测三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响。**结果:**油红染色结果显示三油酸甘油酯使 RASMC 失去原来长梭形外观,胞体变大;三油酸甘油酯浓度越高变化越明显,2 000 mg/dl 已无正常细胞存在。三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响与作用时间及三油酸甘油酯的浓度密切相关。在 24 h $\leq$ 125 mg/dl, 表现为抑制增殖作用;24 h $\geq$ 250 mg/dl 及 48~72 h $\leq$ 500 mg/dl, 表现为促进增殖作用,其中 24 h, 1 000 mg/dl 时增殖率最大约为 115.9%, 与对照组相比差异有统计学意义($t=-3.74, P=0.002$);48~72 h $>$ 500 mg/dl 及 96~144 h, 62.5~2 000 mg/dl 表现为抑制增殖作用,其中, 48、72 h 这 2 个时间点 2 000 mg/dl 的增殖率分别较对照组下降 42.7%($t=13.08, P=0.000$)和 65%($t=129.53, P=0.000$), 与对照组相比差异有统计学意义。流式周期结果表明,三油酸甘油酯组 G0/G1 期的百分比对照组降低,而 S 期百分比增高。流式凋亡结果为,除了 24 h 和 144 h 外,其余各时间点的凋亡率较对照组降低,其中 72 h 及 120 h 的凋亡率分别为 1.1%($F=14.39, P=0.019$), 0.7%($F=9.96, P=0.034$), 与对照组相比差异有统计学意义。另外,细胞增殖与凋亡的变化方向一致。**结论:**三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响是双向的,即在低浓度短时间及高浓度长时间的抑制增殖作用,在中间合适的浓度及时间表现为促进增殖作用;细胞增殖周期试验结果也支持三油酸甘油酯具有一定的促进或抑制大鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖作用;高浓度脂质对细胞的直接毒性作用、诱导细胞的增殖或凋亡作用,可能共同参与调控血管平滑肌细胞的数目及功能。

【关键词】三油酸甘油酯;大鼠主动脉血管平滑肌细胞;增殖**【中图分类号】**R543.1; R364.2; R965.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-05-04

Effects of glyceryl trioleate on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells

Wang Yaqin, Yang Maosheng

(Teaching and Research Section of Biochemical and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of glyceryl trioleate on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells(RASMC). **Methods:** Cell culture was used in this experiment. Oil red staining was used to observe changes in cell morphology. The proliferation effect of glyceryl trioleate on RASMC was tested by MTT and flow cytometry. **Results:** Oil red staining results showed that RASMC lost its long fusiform appearance and somata got bigger. The higher the concentration of glyceryl trioleate, the more obvious the changes; no normal cell was existed in glyceryl trioleate with concentration of 2 000 mg/dl. Effects of glyceryl trioleate on the proliferation of RASMC were in time and dose relationship. Glyceryl trioleate inhibited the proliferation of RASMC under the condition of 24 h and $\leq$ 125 mg/dl while glyceryl trioleate promoted the proliferation of RASMC under the conditions of 24 h and $\geq$ 250 mg/dl as well as 48~72 h and $\leq$ 500 mg/dl. Glyceryl trioleate reached the highest proliferation rate of 115.9% under the condition of 24 h and 1 000 mg/dl, significantly different from that in control group($t=-3.74, P=0.002$). Glyceryl trioleate inhibited the proliferation of RASMC under the condition of 48~72 h and $>$ 500 mg/dl as well as 96~144 h and 62.5~2 000 mg/dl. The proliferation rate decreased by 42.7% and 65% compared with those in control group($t=13.08, P=0.000$)($t=129.53, P=0.000$) under the condition of 24 h, 72 h and 2 000 mg/dl. Flow cycle results revealed that G0/G1-phase percentage reduced in glyceryl trioleate group than in control group while percentage of S-phase increased in glyceryl trioleate group than in control group. Apoptosis percentage decreased in glyceryl trioleate group than in control group in every time point except 24 h and 144 h. The apoptosis rate was 1.1%($F=14.39, P=0.019$) and 0.7%($F=9.96, P=0.034$) in glyceryl trioleate group, statistically different from those in control group. In addition,

作者介绍:王雅琴, Email: 598117113@qq.com,

研究方向:心血管药理。

通信作者:秧茂盛, Email: msyang88@gmail.com。

基金项目:重庆市高等学校优秀人才支持计划资助项目(编号:渝教人[2009]2号文)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000378.html>

tion, the changes of cell proliferation and apoptosis were in the same direction. **Conclusion:** The effect of glyceryl trioleate on the proliferation of RASMC is bidirectional; low concentration and short time as well as high concentration and long time exhibit inhibiting effect while moderate time and concentration exhibit promoting effect. The results of cell proliferation cycle also support the promoting or inhibiting effect of glyceryl trioleate on the proliferation of RASMC. The direct cytotoxic effect, induced cell proliferation or apoptosis of high concentration lipids may involved in the regulation of vascular smooth muscle cells number and function.

【Key words】glycerol trioleate; rat aortic smooth muscle cells; proliferation

研究表明血浆甘油三酯是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的风险因子^[1-3]。AS 是一个多因素参与的复杂病理过程, AS 的一个重要临床病理学特征是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖^[4]。周晓霞等^[5]发现高甘油三酯 (triglyceride, TG) 血清可明显刺激人胎儿 VSMC 的增殖并引起细胞超微结构的改变, 殷忠等^[6]的后续研究结果却提示: 与正常血清相比, 高 TG 血清未能明显促进 VSMC 增殖。极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 为富含甘油三酯脂蛋白^[7], Lu 等^[7]发现 VLDL 对猪冠状动脉平滑肌细胞增殖没有影响^[8]。最近的研究表明, 油酸在血浆中的浓度较高, 并与血管紧张素-Ⅱ^[9]及内皮素-1^[10]之间存在一定的相关性。Yun 等^[11]的研究表明油酸通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, PI-3/Akt) 信号通路促进 VSMC 的增殖。三油酸甘油酯是由一分子的甘油及三分子的油酸酯化而成, 是血浆 TG 的主要成分之一。但是, 三油酸甘油酯对 VSMC 增殖的影响却未见报道。因此, 本课题拟以大鼠主动脉平滑肌细胞 (rat aortic smooth muscle cells, RASMC) 为研究对象, 观察三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响, 可为临床有效防治 TG 异常及其相关疾病提供新证据和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 三油酸甘油酯 (CAS:122-32-7, 99%) 购自北京百灵威科技有限公司。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司。胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。荧光 (FITC) 标记羊抗小鼠 IgG 抗体 (BA1101, 99%) 购自武汉博士德生物工程有限公司。小鼠抗大鼠 α -actin 单克隆抗体 (A5228, >90%), 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT] 均购自美国 Sigma 公司。二脒基苯基吡啶 (DAPI), 细胞周期检测试剂盒 (C1052), 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062) 均购自上海碧云天生物科技有限公司。三油酸甘油酯溶解于完全培养基

中, 储备浓度 2 000 mg/dl, 4 ℃ 冰箱保存。

1.1.2 主要仪器 离心机 (H1650-W, 美国 Sigma), 细胞培养箱 (2406-2, 美国希尔顿公司), 超净工作台 (SW-CJ-2F, 中国苏州净化设备有限公司), 酶标仪 (680, 美国 BIO-RAD), 倒置荧光显微镜 (TI-U, 日本 Nikon), 流式细胞检测仪 (FACS Vantage SE, 美国 Becton Dickinson 公司)。

1.1.3 细胞株 大鼠主动脉平滑肌细胞 A7r5 由第三军医大学提供, DMEM 培养基中加入 10% 的胎牛血清于 37 ℃、5% CO₂、100% 饱和湿度培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞株 A7r5 的免疫荧光鉴定 细胞爬片后, 待细胞融合 80% 左右取出盖玻片, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min, 0.5% Triton-X100, 通透 20 min, PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min。滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体不洗。滴加一抗 (小鼠抗大鼠平滑肌细胞肌动蛋白单克隆抗体) (1:200), 超过组织边缘 2 mm, 置于湿盒内 4 ℃ 过夜。取湿盒于 37 ℃ 温箱复温 30 min, 滴加二抗 (绿色荧光标记的羊抗小鼠-FITC-IgG 抗体) (1:100), 37 ℃ 温箱孵育 1 h (避光操作和存放), PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min。滴加 DAPI 液 (5 μ g/ml), 室温避光显色 15 min。激光共聚焦显微镜下观察, 拍照。

1.2.2 油红染色观察细胞形态学变化及脂质浸润 盖玻片先泡酸过夜, 冲洗干净后用 75% 酒精浸泡, 在超净工作台上用小镊子夹取盖玻片, 小心在酒精灯火焰上灼烧, 轻置于 6 孔板的孔内; 细胞用胰酶消化并制成悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 以每孔 0.5 ml 接种到 6 孔板的盖玻片上, 待细胞 12 h 贴壁后, 吸出培养基, 用 PBS 洗 2~3 次, 再每孔补加 2 ml 含不同浓度三油酸甘油酯的培养基; 待细胞生长到规定时间 (96 h) 后, 根据一步法油红染色试剂盒操作说明完成染色; 倒置显微镜观察, 拍照。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖率 取对数生长期的 A7r5 细胞, 以 3.0×10^4 个/ml 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l, 共接种 6 块细胞板, 每块细胞板分别用作 1 个时间点的检测。以正常培养基培养 24 h 后, 各细胞板均换含有不同浓度 (0、62.5、125、250、500、1 000、2 000 mg/dl) 三油酸甘油酯的培养基继续分别培养 24、48、72、96、120、144 h, 并设正常对照组, 每组各设置 5 个平行孔。各个时间点分别做如下处理, 每孔加 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l, 继续孵育 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加 150 μ l DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长下, 测定各

组细胞的吸光度(absorbance,A)值。以对照组细胞增殖率为100%,实验组的细胞增殖率=[(实验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)] $\times$ 100%。

1.2.4 流式细胞技术检测细胞周期 VSMC 以 1×10^5 个/ml 接种于 6 孔板,每孔 2 ml,其中 3 个平行孔为对照组,另外 3 个孔为三油酸甘油酯组,共接种 6 块 6 孔板,每块细胞板分别用作 1 个时间点的检测。培养 24 h 后,各细胞板三油酸甘油酯组均换含有三油酸甘油酯(500 mg/dl)的培养基,再分别培养 24、48、72、96、120、144 h 后,按照周期检测试剂盒说明书进行样品制备,用流式细胞仪进行周期检测。

1.2.5 流式细胞技术检测细胞凋亡 VSMC 以 1×10^5 个/ml 接种于 6 孔板,每孔 2 ml,其中 3 个平行孔为对照组,另外 3 个孔为三油酸甘油酯组,共接种 6 块 6 孔板,每块细胞板分别用作 1 个时间点的检测。培养 24 h 后,各细胞板实验组均换含有三油酸甘油酯(500 mg/dl)的培养基,再分别培养 24、48、72、96、120、144 h 后,按照凋亡检测试剂盒说明书进行样品制备,用流式细胞仪进行凋亡检测。

1.3 统计分析

采用 SAS 9.1 统计分析软件进行分析处理。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,由于各个时间点的检测样本并非同一样本,故未采用重复测量方差分析。对细胞增殖率、各周期百分比及凋亡率同一时间点不同浓度之间的比较采用独立方差分析。另外,细胞增殖率各浓度组分别与对照组相比较采用多重比较方法中的 Dunnett- t 检验方法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RASMC 形态及免疫荧光鉴定

RASMC 正常形态及免疫荧光结果见图 1。正常细胞在倒置显微镜下(100 $\times$)观察可见,细胞呈长梭形,折光性强,胞浆丰富,胞核卵圆形,细胞密度低时常交织呈网状,密度高时呈漩涡状或者栅栏状,呈典型的“峰-谷”状生长。免疫荧光双

标染色显示($\times 400$),绿色部分与整个细胞的长轴平行,表示平滑肌的特征蛋白——肌动蛋白。蓝色部分为细胞核,用 DAPI 进行染色,DAPI 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,DAPI 与 DNA 双螺旋的凹槽部分发生相互作用,从而与 DNA 的双链紧密结合。

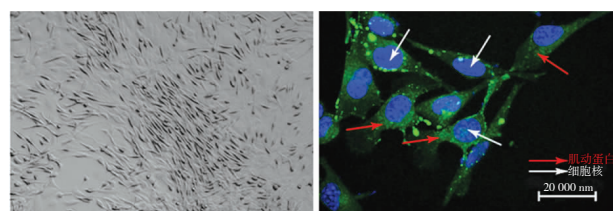


图 1 RASMC 显微形态学观察 (100 $\times$) 及鉴定 (400 $\times$)

Fig.1 Microscopic morphology of rat aortic vascular smooth muscle cells (100 $\times$) and its identification (400 $\times$)

2.2 三油酸甘油酯对 RASMC 形态的影响及脂质浸润情况

油红染色结果见图 2。与对照组相比,随着三油酸甘油酯浓度的增高,脂质浸润程度及细胞形态变化越明显。这种变化始于 125 mg/dl;细胞形态变化较明显,胞体变大,失去原有的长梭形外观,在 2 000 mg/dl 浓度刺激下,已经没有正常细胞的存在。

2.3 三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响

MTT 结果见图 3,增殖率见表 1。24 h,在低浓度(≤ 125 mg/dl)时增殖率随着浓度升高而下降,而 ≥ 250 mg/dl 时表现为促进增殖作用,在 1 000 mg/dl 时增殖率最大约为 115.9%,与对照组相比差异有统计学意义($t=-3.74, P=0.002$)。48、72 h, < 500 mg/dl 时,随着三油酸甘油酯浓度的升高增殖率不断增长,在 500 mg/dl 时达最大值;48、72 h 在三油酸甘油酯浓度 > 500 mg/dl 时,表现为明显的抑制增殖作用,其中 2 000 mg/dl 的抑制作用最强,增殖率与对照组相比差异有统计学意义($t=13.08, P=0.000; t=129.53, P=0.000$),与对照组比增殖率下降值分别为 42.7%、65%。96~144 h 这 3 个时间点,均表现为抑制增殖作用。在 62.5~125 mg/dl 时,增殖率呈下降趋势;

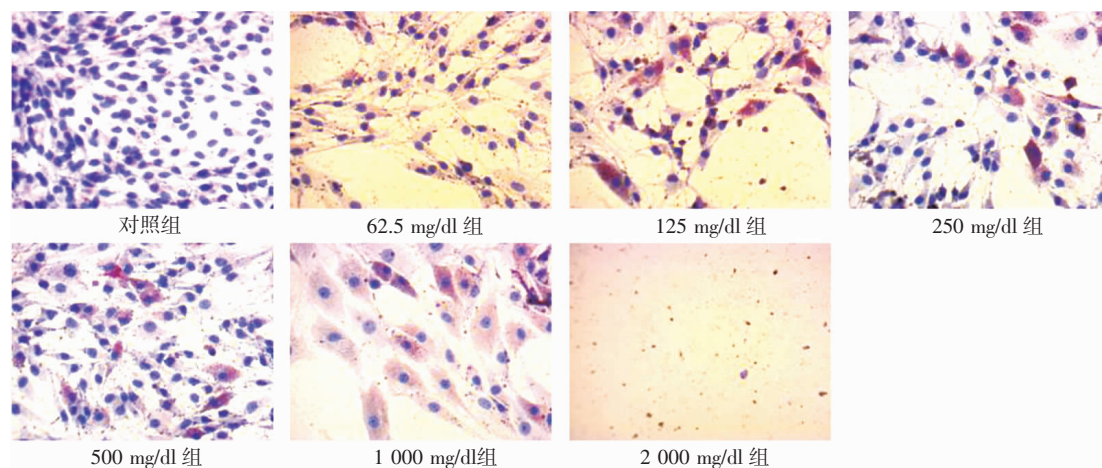


图 2 三油酸甘油酯对 RASMC 形态的影响及脂质浸润情况 (400 $\times$)

Fig.2 Effect of glyceryl trioleate on the morphology of RASMC and lipid infiltration (400 $\times$)

125~500 mg/dl 时,增殖率几乎无变化,为平台期;>500 mg/dl 时,增殖率继续下降,其中 500~2 000 mg/dl 下降最明显,分别下降约 49.2%、54.3%、50.9%。

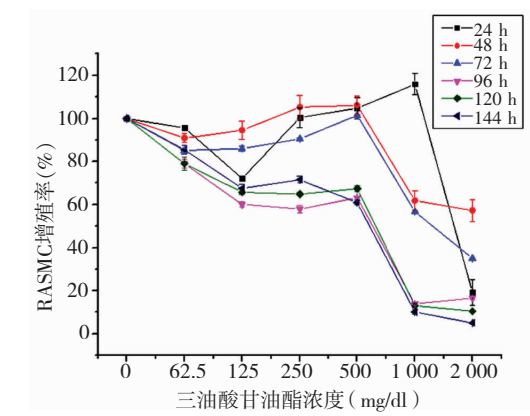


图 3 三油酸甘油酯对 RASC 增殖的影响

Fig.3 Effect of glyceryl trioleate on the proliferation of RASC

表 1 不同浓度三油酸甘油酯及不同时间处理的 RASMC 的增殖率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)						
Tab.1 Proliferation rate of RASMC treated with different concentrations of glyceryl trioleate for different time periods ($\bar{x} \pm s, n=5$)						
组别	RASMC增殖率 (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
对照组	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
62.5 mg/dl 组	95.5 $\pm$ 0.4	90.9 $\pm$ 1.9 ^a	85.1 $\pm$ 1.0 ^a	78.9 $\pm$ 2.0 ^a	78.9 $\pm$ 3.0 ^a	85.4 $\pm$ 2.0 ^a
125 mg/dl 组	72.2 $\pm$ 1.1 ^a	94.6 $\pm$ 4.3	86.0 $\pm$ 1.2 ^a	60.1 $\pm$ 1.1 ^a	65.8 $\pm$ 1.0 ^a	67.5 $\pm$ 2.1 ^a
250 mg/dl 组	100.4 $\pm$ 4.5	105.3 $\pm$ 5.5	90.5 $\pm$ 0.4 ^a	58.0 $\pm$ 1.7 ^a	64.8 $\pm$ 0.9 ^a	71.6 $\pm$ 1.6 ^a
500 mg/dl 组	104.8 $\pm$ 4.9	106.0 $\pm$ 4.3	101.5 $\pm$ 0.1 ^a	63.2 $\pm$ 0.6 ^a	67.4 $\pm$ 1.3 ^a	61.0 $\pm$ 0.9 ^a
1 000 mg/dl 组	115.9 $\pm$ 4.9 ^a	61.9 $\pm$ 4.3 ^a	56.7 $\pm$ 0.1 ^a	14.0 $\pm$ 0.6 ^a	13.1 $\pm$ 1.3 ^a	10.1 $\pm$ 0.9 ^a
2 000 mg/dl 组	19.2 $\pm$ 5.9 ^a	57.3 $\pm$ 5.1 ^a	35.0 $\pm$ 0.3 ^a	16.6 $\pm$ 0.5 ^a	10.5 $\pm$ 0.8 ^a	5.1 $\pm$ 0.3 ^a
<i>F</i> 值	117.69	76.18	4 760.32	2 318.93	1 758.69	2 282.28
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$

表 2 三油酸甘油酯作用不同时间的 RASMC 周期百分比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)							
Tab.2 Cell cycle percentage of RASMC treated with glyceryl trioleate for different time periods ($\bar{x} \pm s, n=3$)							
组别	周期	RASMC各周期百分比 (%)					
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
对照组	G0/G1	83.0 $\pm$ 1.2	92.9 $\pm$ 1.8	91.4 $\pm$ 0.4	91.8 $\pm$ 3.4	97.8 $\pm$ 0.4	94.3 $\pm$ 1.2
	S	13.3 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 1.9	7.7 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 4.7	1.5 $\pm$ 0.3	3.0 $\pm$ 1.1
	G2/M	3.7 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 1.3	0.7 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.5
	G0/G1	76.2 $\pm$ 2.1 ^a	84.4 $\pm$ 1.1 ^a	82.5 $\pm$ 3.9 ^a	85.4 $\pm$ 2.6	87.5 $\pm$ 1.1 ^a	81.4 $\pm$ 1.3 ^a
	S	17.9 $\pm$ 1.1 ^b	9.1 $\pm$ 2.0	13.3 $\pm$ 2.6 ^b	12.9 $\pm$ 3.1 ^b	10.1 $\pm$ 1.6 ^b	18.6 $\pm$ 1.3 ^b
	G2/M	5.9 $\pm$ 1.1 ^c	6.5 $\pm$ 0.9 ^c	4.3 $\pm$ 1.6 ^c	1.7 $\pm$ 0.5 ^c	2.5 $\pm$ 0.5 ^c	0.0 $\pm$ 0.0 ^c
F1 值	G0/G1	23.31	47.54	15.67	6.48	206.22	158.99
P1 值	G0/G1	0.009	0.002	0.017	0.064	0.000	0.000
F2 值	S	27.20	3.83	13.16	8.07	81.57	259.88
P2 值	S	0.006	0.122	0.022	0.047	0.001	0.000
F3 值	G2/M	10.02	98.84	13.85	12.86	21.12	102.82
P3 值	G2/M	0.034	0.001	0.020	0.023	0.010	0.001

注:a、b、c 分别表示三油酸甘油酯组 G0/G1 期、S 期、G2/M 期细胞百分比与对照组相比, $P<0.05$;F1、F2、F3 值分别表示 G0/G1 期、S 期、G2/M 期的 F 值;P1、P2、P3 值分别表示 G0/G1 期、S 期、G2/M 期的 P 值

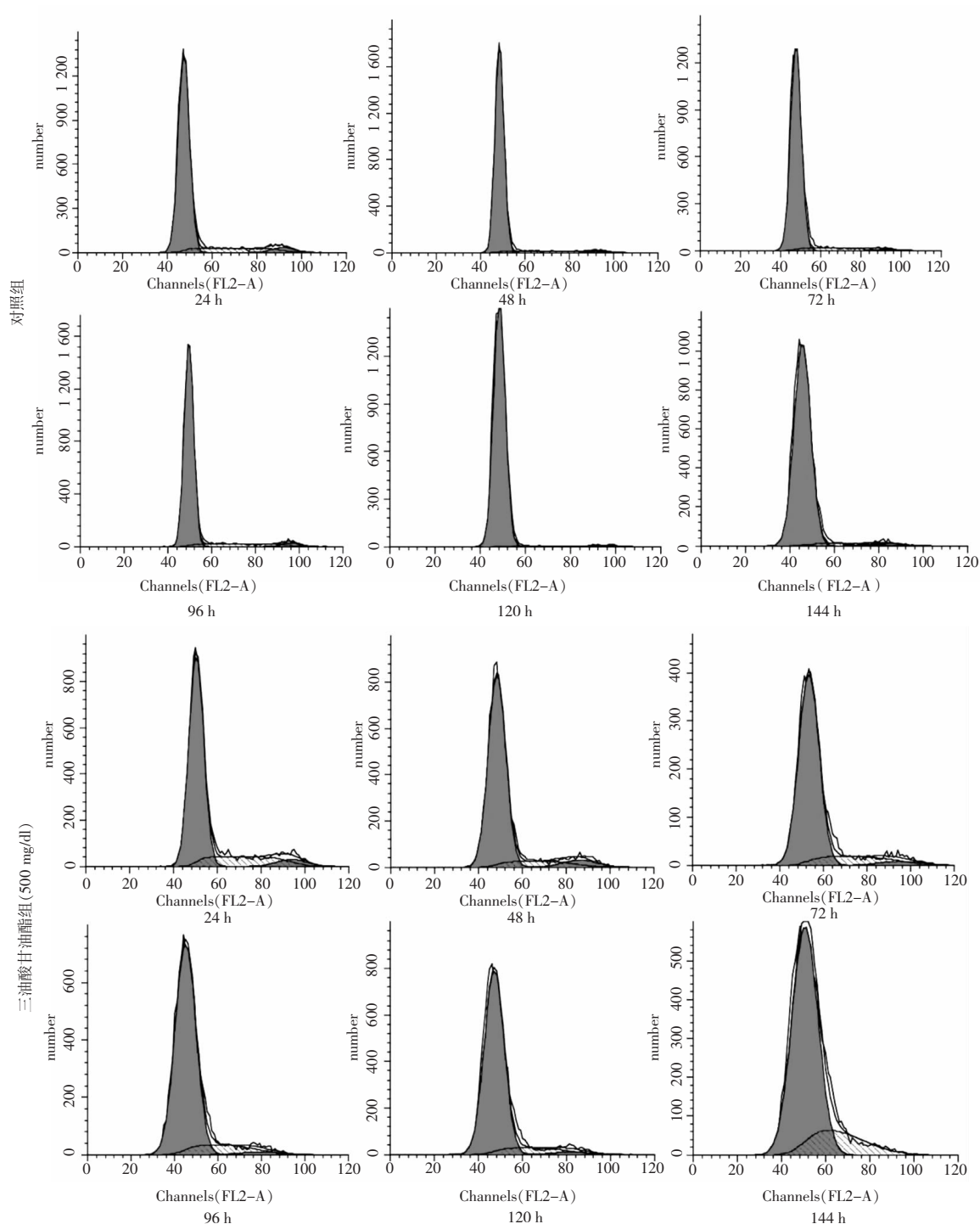


图 4 三油酸甘油酯对 RASMC 增殖周期的影响

Fig.4 Effect of glyceryl trioleate on the cell cycle of RASMC

表 3 三油酸甘油酯作用不同时间的 RASMC 凋亡率 ($\%, \bar{x} \pm s, n=3$)Tab.3 Apoptosis rate of RASMC treated with glyceryl trioleate for different time periods ($\%, \bar{x} \pm s, n=3$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
对照组	3.0 ± 1.9	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.8	5.8 ± 4.3	4.2 ± 1.9	4.0 ± 0.3
三油酸甘油酯组 (500 mg/dl)	3.2 ± 1.6	2.3 ± 1.1	1.1 ± 0.2^a	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2^a	6.0 ± 1.2^a
F 值	0.02	0.55	14.39	4.06	9.96	7.76
P 值	0.901	0.498	0.019	0.114	0.034	0.050

注: a, 与对照组相比, $P < 0.05$

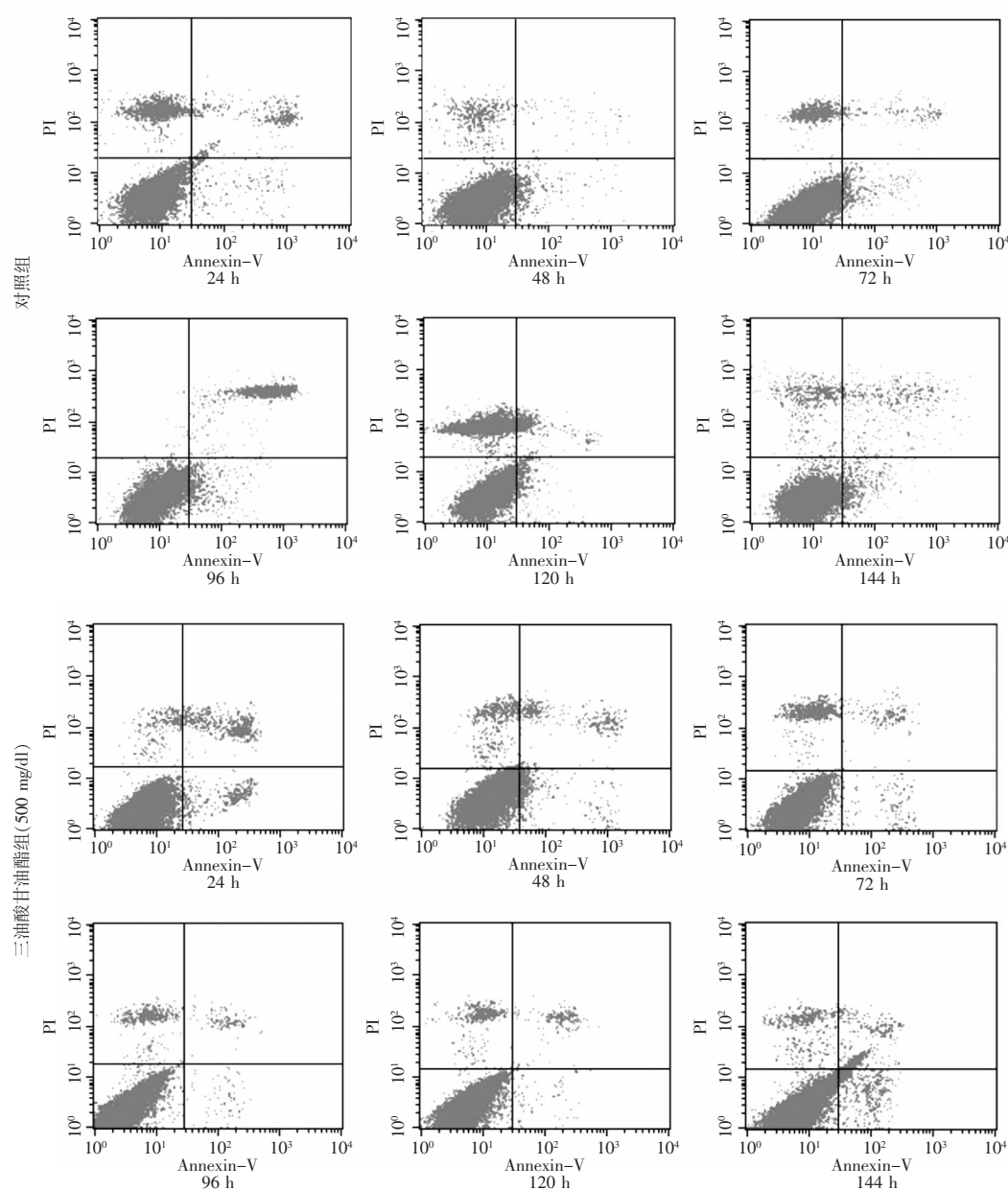


图 5 三油酸甘油酯对 RASMC 凋亡的影响

Fig.5 Effect of glyceryl trioleate on the apoptosis of RASMC

3 讨论

动脉粥样硬化是多细胞(如 T 细胞,巨噬细胞,内皮细胞,VSMC 等)参与的复杂病理过程^[12]。目前广泛被接受的动脉粥样硬化病理假说是 Ross^[13]的内皮-损伤反应学说。高甘油三酯血症、高血压或促炎症介质等因素激活内皮细胞是 AS 的始动环节,随后单核细胞渗透到内皮层吞噬 LDL 或 ox-LDL 形成泡沫细胞,导致内皮下炎症反应的发生^[14-15]。近年来的研究关注血管中膜主要成分——平滑肌细胞在 AS 中的作用,VSMC 异常的增殖与迁移是 AS 的

重要组成成分^[16]。Bennett 等^[17]的研究表明 AS 患者的 VSMC 凋亡率高,是粥样斑块不稳定的一个重要因素^[18-19]。

脂质浸润试验结果提示:RASMC 的脂质浸润及其氧化毒性作用^[20-21],可能是三油酸甘油酯抑制细胞增殖的病理通路之一。

细胞增殖试验结果表明,三油酸甘油酯对 RASMC 增殖的影响是双向性的:既能促进 VSMC 增殖,又能抑制其增殖;而且这种关系与作用时间及三油酸甘油酯的浓度密切相关。在 24、48、72 h 3 个时间点,随着三油酸甘油酯浓度的升高,其对细胞增殖的影响表现为先升后降,在 500~100 mg/dl

达最大增殖作用;在 96、120、144 h 3 个时间点,三油酸甘油酯对细胞增殖的影响则表现为抑制作用的逐步增强。依据美国国家胆固醇教育计划成人治疗组 III (NCEP-ATP III)^[22]中甘油三酯血症的分类标准,本实验发现的促增殖初始浓度属于高甘油三酯血症的范围(200~500 mg/dl),而最大作用浓度处于极高甘油三酯血症(>500 mg/dl)的诊断范围内。

细胞增殖周期试验结果支持三油酸甘油酯具有一定的促进或抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖作用。

细胞凋亡结果表明,实验组与对照组凋亡率之间的差异无统计学意义,提示三油酸甘油酯抑制细胞增殖作用可能与凋亡无关,其具体和完整的抑制细胞增殖作用机制还有待于深入研究。

此外,本实验发现在 72~120 h,500 mg/dl 时,三油酸甘油酯培养的大鼠 VSMC 出现增殖与凋亡变化方向一致性的现象。前人的研究表明,富甘油三酯脂蛋白与活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)的过度产生有关^[23],ROS 既能促进 VSMC 的增殖,也能促进其凋亡,并且这种效应与浓度相关^[24];本实验结果为上述发现提供了新的实验证据。VSMC 的增殖或凋亡都可能参与调控 VSMC 的数目及功能,无论是凋亡还是增殖,只要其中一方作用过强就会导致 VSMC 的失衡及粥样斑块的不稳定^[24]。这可能更有力的支持我们的实验结果。

血浆 TG 浓度的高低与心血管疾病的风险高低之间存在着一定的相关性,作为体内主要的长链甘油三酯,三油酸甘油酯可能是一个较好的心血管疾病风险预测指标。

总之,现有的研究结果,为将来的探索工作提供了新的、有意义的、初步的试验证据。但是,本研究也存在着不足,比如,缺乏分子机制方面的研究,没有进行可逆性试验研究等,这些不足,有待今后进行补充和完善。

参 考 文 献

- [1] Le NA, Walter MF. The role of hypertriglyceridemia in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2007, 9(2): 110-115.
- [2] Feeman WE Jr. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis[J]. Ann Intern Med, 1998, 128(1): 73-74.
- [3] Hodis HN. Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis[J]. Circulation, 1999, 99(22): 2852-2854.
- [4] 秦旭平, 廖端芳, 李元建. 血管平滑肌细胞增殖及其调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(5): 450-454.
- [5] 周晓霞, 周晓慧, 杨鹤梅, 等. 高甘油三酯血清促血管平滑肌细胞的增殖作用[J]. 中华心血管病杂志, 2000, 28(4): 316.
- [6] 殷 忠, 高好考, 李兰荪, 等. 人高脂血清对大鼠血管平滑肌细胞

增殖的影响及阿托伐他汀的干预作用[J]. 心脏杂志, 2008, 20(2): 180-183.

- [7] 周海滨, 莫俊奎, 王 俊, 等. 深圳市居民血脂异常流行病学调查[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(11): 1364-1366.
- [8] Lu G, Meier KE, Jaffa AA, et al. Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 1998, 31(4): 978-985.
- [9] Kwok CF, Shih KC, Hwu CM, et al. Linoleic acid and oleic acid increase the endothelin-1 binding and action in cultured rat aortic smooth muscle cells[J]. Metabolism, 2000, 49(11): 1386-1389.
- [10] Yun MR, Lee JY, Park HS, et al. Oleic acid enhances vascular smooth muscle cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. Pharmacol Res, 2006, 54(2): 97-102.
- [11] Underberg JA, Hays R. Bridging the gap in treatment options for patients with hypertriglyceridemia[J]. J Fam Pract, 2007, 56(12 Suppl New): S24-S31.
- [12] Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis[J]. BMB Rep, 2014, 47(1): 1-7.
- [13] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801-809.
- [14] Pidkivka NA, Cherepanova OA, et al. Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro[J]. Circ Res, 2007, 101(8): 792-801.
- [15] Berliner JA, Watson AD. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis[J]. N Engl J Med, 2005, 353(1): 9-11.
- [16] Ho KJ, Spite M, Owens CD, et al. Aspirin-triggered lipoxin and resolvin E1 modulate vascular smooth muscle phenotype and correlate with peripheral atherosclerosis[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4): 2116-2123.
- [17] Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques[J]. J Clin Invest, 1995, 95(5): 2266-2274.
- [18] Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis[J]. Nat Med, 2006, 12(9): 1075-1080.
- [19] Tabas I. Pulling down the plug on atherosclerosis: finding the culprit in your heart[J]. Nat Med, 2011, 17(7): 791-793.
- [20] Salvayre R, Auge N, Benoist H, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2-3): 213-221.
- [21] Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010: 698-709.
- [22] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) [M]. JAMA, 2001, 285(19): 2486-2497.
- [23] Wang L, Sapuri-Butti AR, Aung HH. Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis increases aggregation of endothelial cell membrane microdomains and produces reactive oxygen species[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(1): 237-244.
- [24] Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(32): 5695-5703.

(责任编辑: 关蕴良)