

# 轻度修饰和氧化低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子和一氧化氮的影响

乐毅 周玫 陈瑾

(第一军医大学自由基医学研究室 广州 510515)

## Effects of Minimally Modified and Oxidized Low Density Lipoprotein on Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Production by Peritoneal Macrophages of Mice

LE Yi, ZHOU Mei and CHEN Yuan

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT** A large number of growth factors and cytokines involved in the processes of atherogenesis. A variety of *in vitro* and *in vivo* studies gave indicated that tumor necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO) have close relation to atherogenesis. In order to find out the secretion of TNF and NO production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages preincubated with minimally modified low density lipoprotein (MM LDL) and oxidized low density lipoprotein (OLDL). The results were that after 48 hours treated, the secretion of TNF induced by MM LDL increased up to 2-fold, and the increase of NO production could be up to 5-fold. However, OLDL sharply inhibited the production of TNF in a concentration- and time-dependant with maximum inhibition (>90%) after 48 h preincubation with OLDL, and NO production did not increase ( $P > 0.05$ ). Concerning with other studies, we suggested that in the different stages of atherogenesis, the amount of production of TNF and NO by vessal cells might be different, but more evidents *in vivo* are needed to find out this mechanism.

**KEY WORDS** Minimally modified low density lipoprotein; Tumor necrosis factor; Nitric oxide; Immune response

**摘要** 肿瘤坏死因子和一氧化氮与动脉粥样硬化的进程有着密切关系。本实验发现与轻度修饰低密度脂蛋白共同培养 24 小时的巨噬细胞肿瘤坏死因子的产生量是与未修饰低密度脂蛋白共同培养的 2 倍,同时一氧化氮的产生量是后者的 5 倍。而与氧化低密度脂蛋白共同培养的巨噬细胞,肿瘤坏死因子产生量逐渐减少,减小量与氧化低密度脂蛋白的浓度和作用时间相关,一氧化氮的产生量则未见增加。这可能是氧化低密度脂蛋白损伤了细胞免疫反应能力,从而加速了巨噬细胞泡沫样变性。

**关键词** 轻度修饰低密度脂蛋白; 氧化低密度脂蛋白; 肿瘤坏死因子; 一氧化氮; 免疫反应; 泡沫样变性

近年来研究表明,大量的细胞因子和生长因子都参与了动脉粥样硬化(Atherosclerosis, As)发生和发展的过程。运用单抗技术发现脂肪条纹中的泡沫细胞大部分是由巨噬细胞(macrophage, MP)转变而来的,而MP正是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)的主要来源。Barath等<sup>[1]</sup>运用免疫组织化学技术发现在新鲜尸解的As斑块中有大量的TNF,同时运用原位杂交技术发现As斑块中大量表达TNF mRNA。由此可见TNF和As有着密切关系。此外,一氧化氮(nitric oxide, NO)是血管壁的主要保护因子,并能抑制As的发生和发展。

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在As不同阶段受活性氧攻击发生不同程度的修饰,即轻度修饰(minimally modi-

fied, MM)和氧化(oxidized, O)而形成 MM LDL 和 OLDL, 两者都能影响 As 的进程<sup>(2)</sup>。为此, 本文观察了 MM LDL 和 OLDL 对小鼠腹腔 MP 的 TNF 和 NO 产生量的影响。为各阶段 As 的 TNF 和 NO 的产生变化提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

RPMI 和 SMEM 培养液、脂多糖、叔丁基过氧化物 (tBOOH) 均为 Sigma 公司产品, 人重组 TNF (rhTNF) 购自军事医学科学院, 小牛血清购自杭州四季青生物制品公司。

### 1.2 LDL 的制备、修饰及修饰程度鉴定

1.2.1 人血浆 LDL (密度  $1.040 \sim 1.063 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  采用一次性密度梯度超速离心法制备<sup>(3)</sup>。

1.2.2 轻度修饰 将 LDL 放入含  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$  的 PBS 液中  $4^\circ\text{C}$  透析 48 h。

1.2.3 氧化 将 LDL ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 置含  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  的 PBS 液中,  $37^\circ\text{C}$  水浴 7 h, 修饰后 LDL 于含  $0.01\%$  EDTA 的 PBS 液中透析 24 h ( $4^\circ\text{C}$ ), 除菌保存。

1.2.4 修饰程度鉴定 修饰程度用 LDL 内脂质过氧化物 (lipoperoxide, LPO) 含量、维生素 E 消耗量和琼脂糖凝胶电泳迁移率来鉴定。

### 1.3 小鼠腹腔 MP 制备和培养

收集小鼠腹腔巨噬细胞, 用无血清 RPMI1640 培养液洗细胞三次 (如测  $\text{NO}_2$  则用无酚红 SMEM 培养液), 加入含  $10\%$  小牛血清的 RPMI1640 (或 SMEM), 根据需要加入含不同浓度的 LDL、MM LDL、OLDL 和 tBOOH 培养液,  $5\% \text{ CO}_2$   $37^\circ\text{C}$  培养不同时间后, 观察细胞形态并摄影, 然后弃上清, 用 PBS 冲洗 3 次, 加入含  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  脂多糖的 PBS 培养 4 h 后, 取上清测 TNF。

### 1.4 TNF 的测定

TNF 的测定运用  $\text{L}_{929}$  细胞杀伤法<sup>(4)</sup>, 结晶紫染色, 在  $570 \text{ nm}$  波长测 OD 值, 得出每个样本  $50\%$  杀伤率的稀释倍数, 并在 rhTNF 标准曲线上求出样本的 TNF 含量。

### 1.5 $\text{NO}_2^-$ 的测定<sup>(5)</sup>

将小鼠 MP 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞置入 6 孔培养板, 各加含终浓度  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MM LDL 和 OLDL 的 SMEM 培养 4 h 后, 弃上清, 用 PBS 冲洗

3 次, 再加入含脂多糖 (终浓度  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的全培养液培养不同时间, 取上清, 以 3 体积的待测样品和 1 体积 Gress 试剂 ( $1\%$  对氨基苄磺酸、 $0.1\%$  N-萘基二乙胺、 $2.5\%$  磷酸) 混合, 在  $540 \text{ nm}$  波长中测 OD 值, 样品  $\text{NO}_2^-$  浓度可从已知浓度亚硝酸钠标准曲线上比较得出。

1.6 蛋白含量测定用 Lowry 法, LPO 测定用 Yagi 法<sup>(6)</sup>, 维生素 E 测定用 Li 法<sup>(7)</sup>。实验结果均经  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 LDL 轻度修饰和氧化的不同特性

LDL 中 LPO 含量为每克胆固醇  $3 \sim 5 \mu\text{mol}$  硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 被定义为轻度修饰<sup>(2)</sup>, 这时 LDL 中抗氧化物 (如维生素 E) 含量在修饰过程中不断减少, 36 h 后减少到最低点 (Figure 1); 经  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  修饰 7 h 后 LDL 的 LPO 含量为每克胆固醇  $15 \sim 20 \mu\text{mol}$  TBARS, 达到氧化程度。琼脂糖凝胶电泳显示, MM LDL 和 LDL 电泳迁移率大致相同, 说明前者的带电性未改变; 而 OLDL 迁移率大于 LDL, 说明 OLDL 所带的负电荷增加 (Figure 2)。

### 2.2 不同浓度 MM LDL 和 OLDL 对受脂多糖刺激小鼠腹腔 MP 产生 TNF 的影响

从 Table 可见, 随着 MM LDL 浓度增加 (从  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 脂多糖刺激 MP 产生 TNF 的量逐渐增加。与  $200 \text{ mg} \cdot$

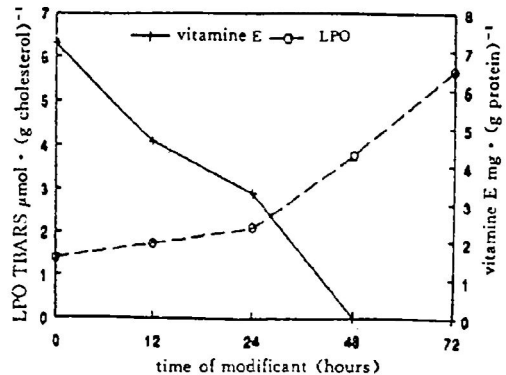


Figure 1. Changes of LPO and vitamin E concentration of LDL, dialysing agalst PBS with  $2 \mu\text{mol} \text{ FeSO}_4$ .

$L^{-1}$  MM LDL 共同培养 24 h, 受脂多糖刺激后 MP 产生的 TNF 是 PBS 对照组的 2 倍; 与同一浓度的 LDL 相比, TNF 产生量的差异具有极显著性意义 ( $P < 0.01$ )。与之相反, 随着 OLDL 浓度增加, MP 产生 TNF 的量逐渐减少; 当浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时 MP 产生 TNF 的量比 PBS 对照组减少 2 倍; 与同一浓度的 LDL 组相比, 减少值具有极显著性意义 ( $P < 0.01$ )。

Table. The change of tumor necrosis factor (TNF) production by lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage treated with MM LDL and OLDL for 24 h.

concentration of MM LDL or OLDL ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	LDL	MM LDL	OLDL
PBS control	$4.1 \pm 1.7$	$4.0 \pm 1.0$	$4.0 \pm 0.7$
50	$4.3 \pm 2.5$	$5.5 \pm 0.6^*$	$3.2 \pm 1.1^*$
100	$4.2 \pm 1.0$	$6.8 \pm 1.5^{\Delta}$	$1.8 \pm 1.3^{\Delta}$
200	$4.2 \pm 1.4$	$8.0 \pm 2.2^{\Delta}$	$1.4 \pm 1.4^{\Delta}$

\*  $P < 0.01$  (for PBS control of same group)

$\Delta P < 0.01$  (for LDL at same concentration),  $n=3$ .

### 2.3 MM LDL 和 OLDL 对受脂多糖刺激的 MP TNF 产生的时间效应

从 Figure 3 所见, MM LDL 和 MP 共同培养 24 h 和 48 h 后再用脂多糖刺激, TNF 产生量增加, 到 72 h 后又呈下降趋势。相反, 用 OLDL 或 tBOOH 作用的 MP 产生 TNF 随时间延长而呈下降趋势。



Figure 2. Electrophoretograms of LDL. a: LDL, b: MM LDL, c: OLDL.

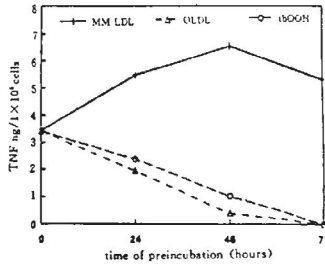


Figure 3. Effects of MM LDL, OLDL and tBOOH on TNF production of macrophages.

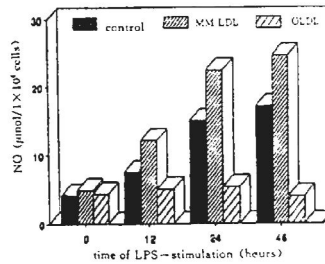


Figure 4. Release of  $\text{NO}_2$  by macrophages, preincubated in medium with  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  of MM LDL and OLDL, then washed and stimulated with lipopolysaccharide ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

### 2.4 MM LDL 和 OLDL 对受刺激的 MP 产生 $\text{NO}_2$ 的不同影响

从 Figure 4 可见, MM LDL 和 MP 共同培养 4 h 后, 再用脂多糖 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激, 随时间延长,  $\text{NO}_2$  产生量增加; 而且都比同时间点的对照组高, 其差值有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。用 OLDL 代替 MM LDL 与 MP 共同培养, 再用脂多糖刺激,  $\text{NO}_2$  产生量并不增加 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 受 MM LDL 和 OLDL 攻击的 MP 的形

态改变

MP 培养 48 h 后, 在显微镜下观察, 50% 的细胞呈梭形贴壁; 其余呈小个圆形, 胞壁清晰 (Figure 5a)。与 MM LDL 共同培养 48 h 的 MP 梭形贴壁减少 (Figure 5b); 而和 OLDL 共同培养 48 h 后, 梭形消失, 细胞变大变圆, 周边有颗粒沉积 (Figure 5c), 并有典型的空泡形成。

3 讨论

在 As 启动期, LDL 首先被活性氧攻击形成 MM LDL, 此时 MM LDL 的抗氧化物质已消耗, 但结构和组成没有较大改变, 仍能被 LDL 受体识别进入内皮细胞或 MP, 调节细胞内一些因子的表达和分泌。本实验发现与 MM LDL 共同培养能使受脂多糖刺激的 MP 的 TNF 产生量比与未修饰 LDL 培养的产生量大一倍, 这可能是 MM LDL 刺激细胞炎性反应, 但这种增加是有限的, 不持久的。

随着进一步氧化, LDL 的结构和带电性发生很大改变, 被 MP 清道夫受体识别而引起大量吞噬, 造成脂肪堆积并产生细胞毒性

作用。郭志刚等<sup>[4]</sup>发现, OLDL 不仅抑制 MP 呼吸爆发功能, 而且抑制 MP 的免疫功能。我们实验表明 OLDL 能使脂多糖刺激的 MP 的 TNF 产生量减少, 而且对 NO<sub>2</sub> 的产生也有抑制作用。这可能是 OLDL 对 MP 的损伤作用, 从而抑制了细胞免疫反应能力。

前文所说在 As 的后期, 即斑块形成期 TNF 的产生是大量增加的, 这和我们的结论并不矛盾。因为 OLDL 单独作用能抑制 MP 免疫反应, 抑制 TNF 的释放, 降低 MP 内脂质清除能力, 造成脂质堆积而成为泡沫细胞, 这样会吸引更多的单核细胞聚集, 并受刺激形成 MP, 这一过程能释放大量的 TNF, 同时 TNF 可以正反馈使 MP 释放更多 TNF<sup>[4]</sup>, 这样在 As 晚期 TNF 是增多的。

在细胞内 NO 是一个高活性、不稳定的化合物, 它迅速分解成亚硝酸盐 (NO<sub>2</sub>) 和硝酸盐 (NO<sub>3</sub>), 因为生成两种盐的比例恒定, 因此我们测得 NO<sub>2</sub> 的生成能代表细胞内 NO 产生。OLDL 能抑制 NO 的产生可能通过抑制 NO 合成酶的活性来减少 NO 的合成, 但需要进一步实验来证实。

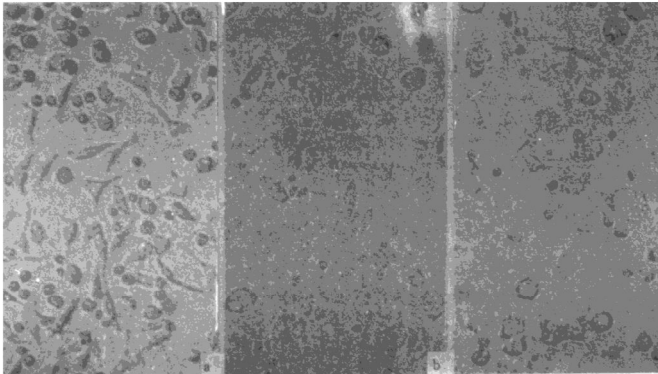


Figure 5. Morphology of murine macrophages treated with a: saline for 48 h. b: MMLDL for 48 h. c: OLDL for 48 h. (× 250)

参考文献

1 Barath P, Petty G. TNF gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Path*, 1990, 137 (3): 503

2 陈瑗,周玫. LDL的氧化修饰和氧化修饰LDL的组成和结构变化. *生物物理学报*, 1993, 9: 334

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*, 1989, 21 (3): 257

4 Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Meth*, 1984, 68: 167

5 Green LC, Wagner DA, Gligowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids.

*Anal Biochem*, 1982, 126: 131

6 Yagi K. A simple flurometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*, 1976, 15: 212

7 Li J, Zhou M, Chen Y. Reversal of inhibition of reactive oxygen species on respiratory burst of macrophage by polysaccharide from coriolus versicolor. *Intern J Immunopharm*, 1993, 15 (3): 429

8 郭志刚,周玫,陈瑗. 脂氢氧化物和氧化修饰的低密度脂蛋白对巨噬细胞免疫功能的影响. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1991, 11: 226

9 Witsell A, Schook LB. Tumor necrosis factor is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4754

(本文1994-05-03收到, 1994-08-11收回)

## 第四届全国脂蛋白学术会议 征文通知

中国生物化学及分子生物学会所属脂蛋白专业组拟于1995年5月18~22日在山西省太原市召开第四届全国脂蛋白学术会议。

征文范围：凡未公开发表的脂蛋白及载脂蛋白的生物化学、分子生物学及其与临床医学有关系的研究论文。按照内容分类如下：①脂蛋白及载脂蛋白结构、功能和代谢；②脂蛋白受体及代谢酶类；③脂蛋白及载脂蛋白测定技术和方法；④脂蛋白、载脂蛋白及脂质与心脑血管疾病、糖尿病、肝、肾及胰等疾病的关系；⑤脂蛋白及载脂蛋白研究进展综述及教学改革内容。

征文要求：

1. 文章以摘要形式，限500字以内，用稿纸工整书写，按上述标明内容分类。综述文章1500字以内。

2. 论文摘要需附单位介绍信，寄往山西省太原市，山西医学院（邮编030001）生物化学教研室 刘德文收。

3. 论文经审定选出后于1995年1月发出会议通知，来稿不退，请自留底稿。

4. 征文截止日期：1994年12月15日。

会议期间将有脂蛋白、载脂蛋白研究进展的学术报告，同时举办生化仪器，试剂及降脂药品展销，欢迎有关公司及厂家参展，具体事宜请与刘德文教授联系。

电话：0351—2021511—281（办）、549（宅）

中国生化及分子生物学会  
脂蛋白专业组

1994. 6