

氧化型低密度脂蛋白在人外周血单核巨噬细胞中的代谢

罗 骏^① 沈成兴 刘乃丰 陈日新 张丽蓉

(南京铁道医学院心血管研究室, 南京 210009)

Metabolism of Oxidized Low Density Lipoproteins by Human Peripheral Monocyte-Macrophages

LUO Jun, SHEN Cheng-Xing, LIU Nai-Feng, CHEN Ri-Xin and ZHANG Li-Rong

(Cardiovascular Research Laboratory, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT

Aim In order to elucidate the role of oxidized low density lipoproteins (OLDL), we have examined the metabolism of OLDL in macrophages and the effect of OLDL on the total cholesterol content in macrophages.

Methods The metabolism of low density lipoprotein (LDL) and OLDL in macrophages was assessed with the radio-receptor assays.

Results Human macrophage metabolized LDL by a receptor pathway with 390.6 $\mu\text{g/g}$ cell protein of the B_{max} and 17.5 mg/L of kd. The receptor pathway exhibited saturative kinetics. The metabolism of OLDL was different from LDL. The binding internalization and degradation of OLDL by macrophages increased significantly as compared with the LDL. The total cholesterol content in macrophages incubated with OLDL was also higher than that of cells incubated with native LDL.

Conclusion OLDL was metabolized by macrophages with different pathway from LDL and may lead to the formation of foams.

KEY WORDS Low density lipoproteins; Oxidative modification; Monocyte-macrophage; Atherosclerosis

摘要 为探讨氧化型低密度脂蛋白在人外周血单核巨噬细胞中的代谢及其致动脉粥样硬化的机制,使用放射配基法观察了两种低密度脂蛋白在单核巨噬细胞中的代谢情况,并测定了细胞内胆固醇含量的变化。结果发现,人外周血单核巨噬细胞通过受体途径代谢低密度脂蛋白。该受体可饱和,最大结合量(B_{max})为 274 $\mu\text{g/g}$ 细胞蛋白,解离常数为 35.7 mg/L。低密度脂蛋白经氧化修饰后,人外周血单核巨噬细胞对其结合、摄取和降解均显著增加;与氧化型低密度脂蛋白共同孵育的人外周血单核巨噬细胞内总胆固醇含量明显高于低密度脂蛋白组。以上结果提示,低密度脂蛋白经氧化修饰后在人外周血单核巨噬细胞内的代谢途径发生改变并导致细胞内总胆固醇的堆积,促进了动脉粥样硬化的发生。

关键词 低密度脂蛋白; 氧化修饰; 单核巨噬细胞; 动脉粥样硬化

血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)浓度升高是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的独立危险因素,但同一 LDL 水平的人群,As 的发病率和病死率差异很大。LDL 在人体内可被氧化修饰,氧化后的 LDL 生物学特征发生一系列改变,在 As 的发生和发展过程中起重要作用^[1]。本文用放射配基法观察 LDL 和氧化型 LDL(oxidized LDL)在人外周血单核巨噬细胞内的代谢过程,为阐明氧化型 LDL 致 As 的可能机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

维拉帕米(knoll),无载体 Na^{125}I (北京原子能研究所),胆固醇酶联试剂盒(上海东瓯生物工程公司), CO_2 培养箱(Queue),超速离心机(日立 Scp 85H)。

1.2 实验方法

国家自然科学基金资助课题(39100050)

①硕士研究生,现在南京医科大学附属南京第一医院

1.2.1 低密度脂蛋白的分离 使用垂直转头, 单个不连续密度梯度超速离心法分离 LDL。在分离和收集过程中保持一定浓度的 EDTA 以防止 LDL 氧化, 然后磷酸盐缓冲溶液透析、浓缩, 过滤除菌。聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定其纯度, 测定蛋白浓度。

1.2.2 氧化型低密度脂蛋白的制备 蛋白含量为 0.5 g/L 的 LDL 与 25 μmol/L 硫酸铜溶液在 37°C 孵育 4 h, 测定其硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 的量。放射配体分析时先放射标记, 后氧化。TBARS 的测定采用 Yajik 改良法。

1.2.3 人外周血单核巨噬细胞的分离和培养 参照 Pertoft 等^[2]方法使用 Percoll 分离液, 密度梯度法从健康人外周血中分离单个核细胞, 用贴壁法分离单核细胞并培养于 12 孔培养板中。使用 1640 培养基在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育 7~10 天后, 细胞成熟为巨噬细胞, 用瑞氏染色法鉴定, 巨噬细胞在 95% 以上。

1.2.4 低密度脂蛋白的¹²⁵I 标记 用一氯化碘法对 LDL 和氧化型 LDL 进行¹²⁵I 标记, 标记后游离碘不超过 3%, 脂质标记率低于 5%, 比放射活性为 (130~170) × 10⁸ cpm/g LDL 蛋白。

1.2.5 放射配体分析 参照 Goldstein^[3]方法, 将培养成熟的单核巨噬细胞经诱导激活后加入给定浓度的放射性碘标记 LDL 或氧化型 LDL 中, 继续培养 10 h, 移入冰柜中止反应, 液体收集到试管中, 使用氯仿提取法测定细胞降解的量。细胞经冲洗后加入含肝素的缓冲液每孔 1 mL, 4°C 放置 60 min 后收集缓冲液测定放射性脉冲数, 代表细胞表面结合 LDL 的量。然后使用 NaOH 碎解细胞后测定其放射性脉冲数, 代表细胞摄入 LDL 的量。结果换算表示为单位时间 (10 h) 内 μg LDL/g 细胞蛋白。

1.2.6 细胞内总胆固醇的测定 按 Huat 方法使用酶联试剂盒测定总胆固醇的量。

2 结果

2.1 两种低密度脂蛋白的代谢

2.1.1 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白浓度与其代谢的关系 从图 1、图 2 和图 3 (Figure 1, 2 and 3) 可见, 人外周血单核巨噬细胞分别与浓度递增的碘标记 LDL 和氧化型 LDL 共同孵育 10 h 后, LDL 组的 LDL 结合、摄取以及降解量在配基浓度低于 20 mg/L 时增加较快, 较高浓度时则趋向饱和。氧化型 LDL 组与 LDL 组变化相似, 但在同一配基浓

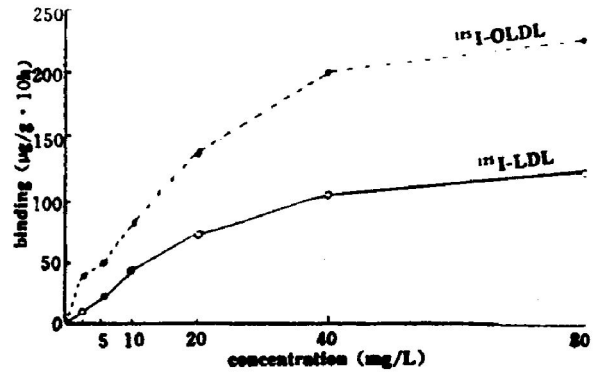


Figure 1. Dose-response curves of binding of ¹²⁵I-LDL and ¹²⁵I-oxLDL by human monocyte-macrophages (n=3).

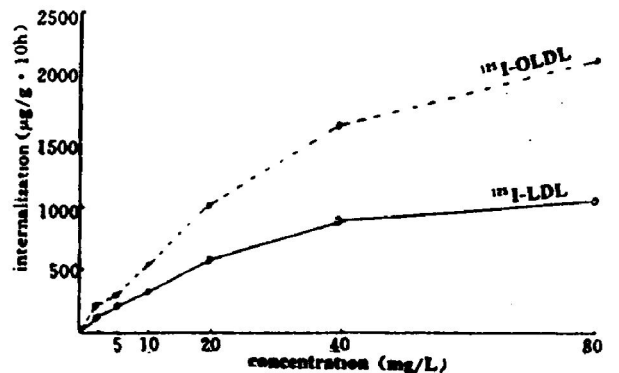


Figure 2. Dose-response curves of internalization of ¹²⁵I-LDL and ¹²⁵I-oxLDL by human monocyte-macrophages (n=3).

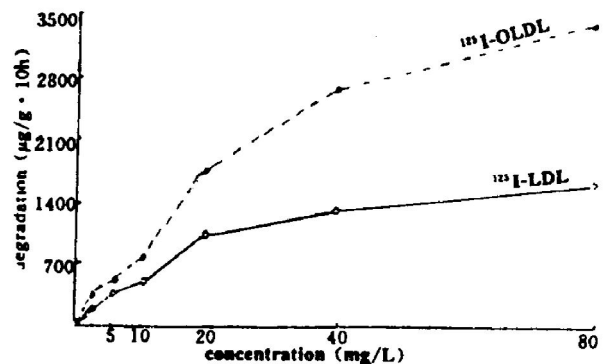


Figure 3. Dose-response curves of degradation of ¹²⁵I-LDL and ¹²⁵I-oxLDL by human monocyte-macrophages (n=3).

度时氧化型 LDL 组的结合、摄取和降解量均高于 LDL 组。用 Scatchard 法和最小二乘法直线回归处理, 得出 LDL 组细胞与 LDL 的最大结合量 (B_{max}) 为 274 μg/g 细胞蛋白, 解离常数

为 35.7 mg/L。而氧化型 LDL 组细胞的最大结合量(Bmax)为 390.6 μg/g 细胞蛋白,解离常数为 17.5 mg/L。

2.1.2 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白作用时间与其代谢的关系 从图 4(Figure 4)可见,随着作用时间的延长,单核巨噬细胞降解¹²⁵I-LDL 和 ¹²⁵I-氧化型 LDL 均有所增加,二相比较¹²⁵I-氧化型 LDL 组增加更显著。

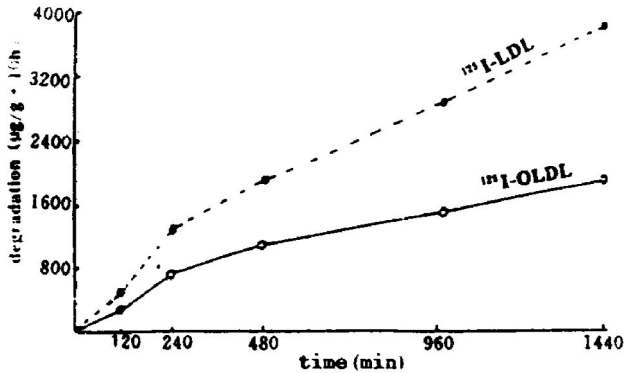


Figure 4. Time-course of degradation of ¹²⁵I-LDL and ¹²⁵I-OLDL by human monocyte-macrophages (n = 3).

2.1.3 低密度脂蛋白的降解与氧化程度的关系 人外周血单核巨噬细胞对不同氧化程度 LDL 的降解也不相同。从图 5(Figure 5)可见,随着 LDL 氧化修饰程度的加重,单核巨噬细胞对 LDL 的降解随之增加,其差异具显著性意义 (P<0.05~P<0.01)

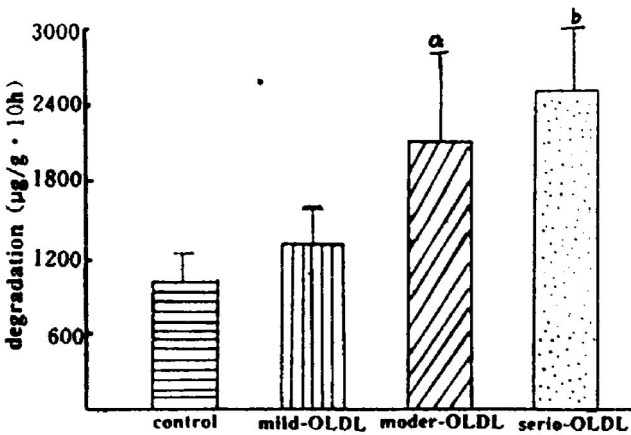


Figure 5. Degradation of different degree oxidative modification by human monocyte-macrophages ($\bar{x} \pm s$, n = 5). a; P<0.05, b; P<0.01, compared with control group.

2.2 胆固醇含量的测定

从图 6(Figure 6)可见,单核巨噬细胞与 50 mg/L 的 LDL 或氧化型 LDL 孵育 20 h 后,氧化型 LDL 组细胞内总胆固醇含量明显高于 LDL 组,其差异具显著性意义(P<0.01)。

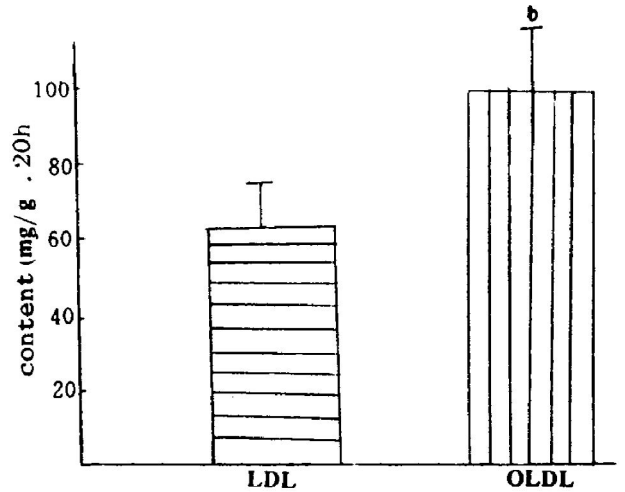


Figure 6. Effect of OLDL on total cholesterol content in human monocyte-macrophages ($\bar{x} \pm s$, n = 5). b; P<0.01, compared with LDL group.

3 讨论

越来越多的证据表明人体内低密度脂蛋白可被氧化修饰,并出现在动脉粥样硬化的病灶中^[4]。最近应用免疫组织化学和透射电镜技术观察发现,泡沫细胞不仅来源于循环中迁移至内膜下的单核巨噬细胞,且伴有局部细胞增殖。氧化型低密度脂蛋白与单核巨噬细胞的相互作用是泡沫细胞形成的重要机制。Brown 和 Goldstein^[5]的早期研究表明富含胆固醇的低密度脂蛋白主要由低密度脂蛋白受体途径被机体所摄取。人外周血单核巨噬细胞具有低密度脂蛋白受体,但表达相当有限^[6]。本实验观察到当配基低密度脂蛋白浓度较低时,细胞对低密度脂蛋白的结合、摄取和降解近乎直线增加,当达到一定浓度时趋向饱和,细胞最大结合量(Bmax)为 274 μg/g 细胞蛋白,解离常数为 35.7 mg/L,符合通过低密度脂蛋白受体途径摄入的特征。

经氧化的低密度脂蛋白在人外周血单核巨

噬细胞内的代谢过程发生了改变。与低密度脂蛋白相比较,细胞对氧化型低密度脂蛋白的结合、摄取和降解均明显增加,通过一具有更高亲和特征的途径摄取氧化型低密度脂蛋白,同时伴细胞内总胆固醇的增加。Brown^[7]首先报道低密度脂蛋白经化学修饰后在细胞内的代谢途径发生改变,大部分经非低密度脂蛋白受体途径摄取。单核巨噬细胞通过一高亲和、可饱和途径摄取具有负电性的乙酰化低密度脂蛋白,具有多价阴离子的基因可竞争此受体途径,此受体称为清道夫受体。清道夫受体具有比低密度脂蛋白受体更高的亲和特征,经此受体摄入不受细胞内总胆固醇的反馈调节。近年来研究表明氧化型低密度脂蛋白也可被单核巨噬细胞的清道夫受体识别。体外铜离子催化产生的氧化型低密度脂蛋白与内皮细胞催化产生的氧化型低密度脂蛋白在生物学特征上相当一致,均可竞争抑制乙酰化低密度脂蛋白结合的90%以上,单核巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白的量约为乙酰化低密度脂蛋白的6倍^[7]。研究表明单核巨噬细胞同时具有氧化型低密度脂蛋白受体^[8]。本实验结果提示低密度脂蛋白经氧化后主要由非低密度脂蛋白受体途径被单核巨噬细胞摄取,推测主要可能通过清道夫受体和氧化型低密度脂蛋白受体途径摄取代谢。

因此,低密度脂蛋白氧化后在人外周血单核巨噬细胞内的代谢途径发生改变,导致细胞

内胆固醇的堆积,有利于泡沫细胞的形成,可能在动脉粥样硬化的形成中起重要作用,为临床抗动脉粥样硬化提供新的途径。

参考文献

- 1 Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1993, **98**: 1~9.
- 2 Pertoft H, Aust SD, Fello A. Separation of human monocytes on density gradient of percoll. *J Immun Methods*, 1980, **33**: 221~229.
- 3 Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in culture cells. *Method Enzymol*, 1983, **98**: 241~260.
- 4 Weisser B, Locher R, Mengden T, et al. Oxidized low density lipoprotein in atherogenesis: possible mechanisms of action. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **19**(Suppl 2): S4~S8.
- 5 Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am*, 1984, **251**: 52~60.
- 6 Van Lenten BJ. Processing of lipoproteins in human monocyte-macrophages. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 1455~1466.
- 7 Sparrow CP, Parthasarathy S, Sternberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1989, **264**(5): 2599~604.
- 8 Aviram M. The contribution of the macrophages receptor for oxidized LDL to its cellular uptake. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **179**(1): 359~365.

(1997-05-13收到,1997-09-26修回)