

氧化型低密度和极低密度脂蛋白诱导人血单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白-1 α

张旭明, 邓仲端, 瞿智龄, 倪娟

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

[主题词] 巨噬细胞炎性蛋白 1 α ; 单核细胞; 脂蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在动脉粥样硬化病变中的表达以及天然和氧化型低密度及极低密度脂蛋白是否诱导人外周血单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 用原位杂交检测兔食饵性动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达。用逆转录聚合酶链式反应研究上述脂蛋白对人单核细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 表达的影响, 用细胞酶联免疫吸附实验检测脂蛋白对人血单核细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的蛋白表达。结果原位杂交显示, 兔主动脉粥样硬化斑块中的泡沫细胞及内皮细胞的胞浆均被染成棕紫色, 而胞浆内的脂质不着色, 以致整个泡沫细胞区呈网架状构象。逆转录聚合酶链式反应显示, 氧化型低密度及极低密度脂蛋白能显著诱导人单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA, 分别为对照组的 2.4 倍和 1.6 倍。细胞酶联免疫吸附实验亦显示, 氧化型低密度及极低密度脂蛋白能明显诱导人单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白, 分别为对照组的 2.3 倍和 2.0 倍, 而天然低密度及极低密度脂蛋白的作用则不明显。由此可见, 动脉粥样硬化斑块中的泡沫细胞和内皮细胞能表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 氧化型低密度及极低密度脂蛋白可诱导人单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 从而可招募更多的单核细胞迁入动脉内膜而促进动脉粥样硬化病变的发生和发展。

[中图分类号] R363.21

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein and Very Low Density Lipoprotein Induce the Expression of Macrophage Inflammatory Protein 1 α in Human Blood Monocytes

ZHANG Xu-Ming, DENG Zhong-Duan, QU Zhi-Ling, and NI Juan

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Macrophage Inflammatory Protein1 α ; Monocyte; Lipoproteins; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To study the expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α in atherosclerotic lesions and to examine the effects of native and oxidized low density (LDL, oxLDL) and very low density lipoproteins (VLDL, ox-VLDL) on the expression of MIP-1 α in human peripheral blood monocytes. **Methods** The expression of MIP-1 α mRNA in dietary atherosclerotic lesions in rabbits was detected by in situ hybridization. The effects of LDL, ox-LDL, VLDL and ox-VLDL on the expression of MIP-1 α mRNA and protein in human blood monocytes were determined by RT-PCR and cell ELISA respectively. **Results** In situ hybridization showed that the cytoplasm of the foam cells was stained brownish purple, and the lipid droplets in the cytoplasm were not stained so that the whole foam cell area looked like a brownish purple network. The cytoplasm of endothelial cells was stained as well. RT-PCR demonstrated that ox-LDL and ox-VLDL induced a 2.4-fold and a 1.6-fold increase in MIP-1 α mRNA expression in human blood monocytes respectively compared with the control group, and cell ELISA also showed that ox-LDL and ox-VLDL induced a 2.3 fold and a 2.0-fold increase in MIP-1 α protein expression in monocytes respectively, while LDL and VLDL didn't. **Conclusions** The Foam cells and endothelials in the atherosclerotic plaques can express MIP-1 α . ox-LDL and ox-VLDL might be able to induce increased expression of MIP-1 α mRNA and protein in human blood monocytes, and could, therefore, enhance the atherogenesis through increased recruitment of more and more monocytes into the arterial intima.

[基金项目] 国家自然科学基金(编号 39730220)资助

[作者简介] 张旭明,男,1972年出生,心血管病理学博士研究生,从事趋化因子在动脉粥样硬化中作用的研究。邓仲端,男,1927年出生,病理学教授,博士生导师。

高脂血症是动脉粥样硬化的重要致病因素。高胆固醇饮食可使粘附于血管内皮细胞的单核细胞增多,随后迁入内皮下间隙,摄取大量脂蛋白而转变成泡沫细胞。这些泡沫细胞在内皮下的聚积导致形成

脂纹病变^[1]。其间脂蛋白与单核/巨噬细胞的相互作用可导致许多细胞因子及趋化因子的表达和分泌,参与调控这一病理过程。其中单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 是招募单核细胞进入血管壁的重要趋化因子之一,另外 Hayes 等^[2]证实动脉粥样硬化病灶中还有巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α) mRNA 表达。本文旨在研究 MIP-1 α 在动脉粥样硬化斑块中的表达和分布,以及脂蛋白对人单核细胞表达 MIP-1 α 的影响。

1 材料和方法

1.1 动脉粥样硬化模型的建立

取 4~6 周龄雄性日本大耳白兔(同济医科大学动物中心提供),实验组给予高脂饮食,对照组喂以标准颗粒饲料。3 个月后处死动物,迅速取出主动脉。用 10% 缓冲的甲醛液固定,常规石蜡包埋切片。分别进行 HE 染色及平滑肌肌动蛋白(α -SMC-actin)免疫染色以区分斑块中巨噬细胞源性及肌源性泡沫细胞。

1.2 单核细胞的分离和培养

参照 Pawlowski 等^[3]方法并稍作修改。将新鲜健康人抗凝血用 PBS 1:1 稀释后,以 2:1 比例从试管壁徐徐加于淋巴细胞分离液上(上海试剂二厂),500 μ g 水平离心 30 min,吸取中间灰白色的单个核细胞层,并用 PBS 洗涤细胞,继用 RPMI 1640 培养液悬浮细胞沉淀,再分别接种于直径培养皿及 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱温育 2 h。吸去未粘附的淋巴细胞即得单核细胞。粘附的单核细胞于 RPMI 1640 培养液(含 10 \times FBS)中培养。

1.3 脂蛋白的分离制备

用密度梯度离心法分离健康新鲜人血得到低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和极低密度脂蛋白(very LDL, VLDL),并于 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,测其蛋白含量。分别将终浓度为 500 mg/L 的 LDL 及 VLDL 与终浓度为 10 μ mol/L 的 CuCl₂ 于 37 $^{\circ}$ C 氧化 24 h,透析后 4 $^{\circ}$ C 备用。用硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)值鉴定其氧化程度。结果未氧化修饰的 LDL 及 VLDL 的 TBARS 值分别为 1.6~3.5 μ mol/g 蛋白及 1.5~3.5 μ mol/g 蛋白,而 ox-LDL 及 ox-VLDL 的 TBARS 值分别为 58~61 μ mol/g 蛋白及 53~57 μ mol/g 蛋白。

1.4 实验分组

将分离所得的单核细胞培养于 RPMI 1640 中 8

h,继于无血清培养基培养 8 h。将细胞随机分为 5 组,分别加入终浓度为 25 mg/L 的 LDL、VLDL、ox-LDL 及 ox-VLDL,对照组加等量的 PBS,温育 20 h 后,进行以下实验。

1.5 细胞总 RNA 的提取及逆转录聚合酶链反应

收集各组细胞,用 Trizol 试剂(Gibco)提取各组细胞总 RNA。取各组细胞的总 RNA 各 1 μ g,按 RT-PCR 试剂盒说明书(Gibco)逆转录合成 cDNA,取产物 2 μ L 进行 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环,末次延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 储存)。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,包括 1 \times PCR buffer,1.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,引物各 20 pmol/L, Taq 酶 2 u。所用 MIP-1 α 引物序列为:正链 5'-CTGCCCTTGCTGTCCTCCTCTG-3';负链 5'-CTGCCGCTTCGCTTGTTA-3';PCR 扩增产物长度为 197 bp。分析内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列为:正链 5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT-3';负链 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3';扩增产物长度为 235 bp。反应后取终产物 10 μ L 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分析,紫外线照像,用 SQ9636 扫描系统及图像分析系统测出目的基因及 GAPDH 的积分吸光度(A)值,并计算二者的比值,以此比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

1.6 细胞酶联免疫吸附实验

参照 Nakagawa 等^[4]的报道,将接种于 96 孔板的单核细胞分别与 25 mg/L 的 LDL、VLDL、ox-LDL 及 ox-VLDL 共育 24 h 后,弃去培养液,PBS 洗涤,用 4% 多聚甲醛固定。用 3% 过氧化氢-甲醇灭活内源性酶后,加入 0.3% Triton X-100 温育 15 min, PBS 洗。滴加正常兔血清封闭液 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min,再加入 1:400 羊抗人 MIP-1 α 单克隆抗体(Sigma)4 $^{\circ}$ C 过夜,继加生物素化兔抗山羊 IgG 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min, PBS 洗,加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, PBS 洗, DAB 室温避光显色,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。于 490 nm 下测量各孔的积分 A 值。同时,各组细胞于 0.1 mol/L NaOH 37 $^{\circ}$ C 下裂解 30 min,收集各组细胞裂解物,并测各组细胞总蛋白量(每组 3 份),以使各组细胞量标准化。

1.7 原位杂交

巨噬细胞炎性蛋白 1 α cDNA 探针根据地高辛随机引物标记试剂盒(Boehringer 公司)进行标记。石蜡切片脱蜡后,梯度酒精入水,0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗,继用 0.2 mol/L HCl 室温下作用 20 min,接着用 5 mg/L 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 下消化 30 min,0.2% 甘

氨酸 PBS 终止反应,继用 4% 多聚甲醛再固定。滴加预杂交液(含 50% 去离子甲醛液, $5 \times \text{SSC}$, 10% 硫酸葡聚糖, $1 \times \text{Denhardt}$ 溶液, 0.5 g/L 变性鲑精 DNA 及 0.25 g/L 酵母 tRNA)放入湿盒 42°C 温育 2 h 后,去预杂交液,加入含 2.5 mg/L 标记的变性 MIP-1 α 探针杂交液 42°C 温育 18 h。接着依次用 $2 \times \text{SSC}$ 和 $1 \times \text{SSC}$ 室温下各洗涤 1 h,继以 $0.5 \times \text{SSC}$ 分别于 37°C 和室温下各洗涤 0.5 h。然后用抗地高辛抗体(1:2000)进行免疫显色,脱水,透明,中性树胶封片。

1.8 统计学处理

各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异以方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化斑块内 MIP-1 α mRNA 表达

实验组兔主动脉形成典型的动脉粥样硬化斑块,其中含大量巨噬细胞源性泡沫细胞和少量肌源性泡沫细胞(图 1A, 1B)。原位杂交显示,斑块内两种泡沫细胞均被染成棕紫色,整个泡沫细胞区呈网架状构像。而且内皮亦有 MIP-1 α mRNA 表达(图 1C)。

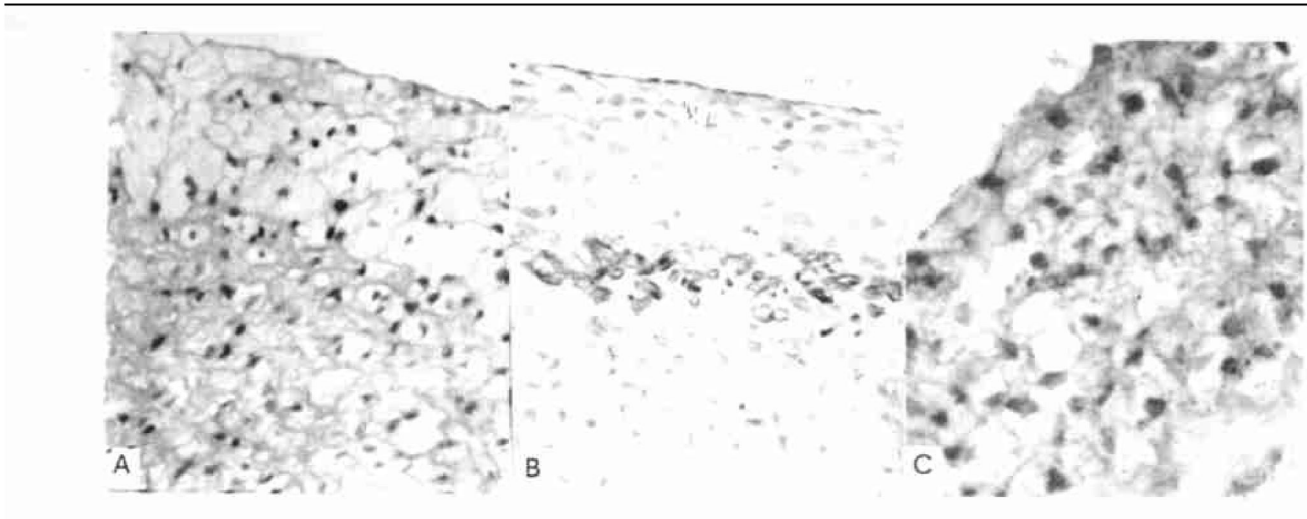


图 1. 兔主动脉斑块区泡沫细胞。A: 有大量泡沫细胞, B: 肌源性泡沫细胞表达阳性, C: 胞浆显示棕紫色颗粒, 而脂滴不染(原位杂交 $\times 260$)

Figure 1. Aorta plaque in rabbit. A: bundant foam cells by HE stain, B: Positive stains of myogenic foam cells, C: Cytoplasm of foam cells were stained brownish purple, while lipid droplets were not stained ($\times 260$)

2.2 脂蛋白对单核细胞巨噬细胞炎性蛋白-1 α mRNA 表达的影响

图 2 (Figure 2) 显示, 各组细胞均表达 MIP-1 α mRNA, ox-LDL 组和 ox-VLDL 组表达的 mRNA 明显升高(三次独立实验结果), 其电泳条带相对积分 A 值分别为对照组表达 mRNA 的 2.4 倍和 1.6 倍(5.457 ± 0.709 、 3.518 ± 0.139 比 2.263 ± 0.261)。

2.3 脂蛋白对人单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白-1 α 蛋白的影响

各组 MIP-1 α 蛋白的表达水平见表 1 (Table 1)。LDL 组和 VLDL 组的蛋白表达与对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 而 ox-LDL 组和 ox-VLDL 组的蛋白表达却分别为对照组的 2.3 倍和 2.0 倍, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$), 与 MIP-1 α mRNA 表达基本一致。

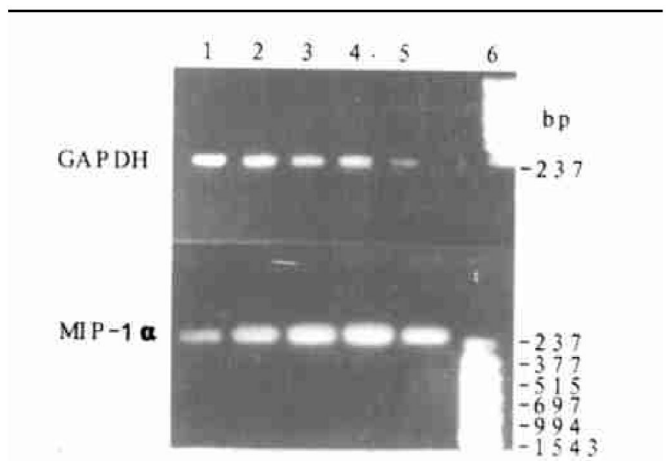


图 2. 人血单核细胞巨噬细胞炎性蛋白-1 α mRNA 的表达
Figure 2. Expression of MIP-1 α mRNA in human blood monocytes detected by RT-PCR. 1: normal control, 2: LDL, 3: VLDL, 4: ox-LDL, 5: ox-VLDL, 6: DNA marker

表 1. 脂蛋白对人单核细胞 MIP-1 α 蛋白表达的影响Table 1. The effects of lipoprotein on the expression of MIP-1 α protein in human monocytes($x \pm s$, $n = 5$)

Groups	MIP-1 α protein expression
Control	2.442 \pm 0.094
LDL	2.323 \pm 0.072 ^a
VLDL	2.470 \pm 0.092 ^a
ox-LDL	5.600 \pm 0.229 ^b
ox-VLDL	4.908 \pm 0.203 ^b

a: $P > 0.05$; b: $P < 0.01$, compared with control group.

3 讨论

现已明确, 动脉粥样硬化 (As) 是一种炎症性疾病^[5], 在各种病因, 包括 ox-LDL 和 ox-VLDL 的作用下, 血液单核细胞和 T 淋巴细胞迁入内皮下间隙, 继而中膜平滑肌迁入内膜并增生, 成为动脉粥样硬化病变中的主要细胞来源。血液单核细胞迁入内膜受多种趋化因子的招募, 其中 MCP-1 对于病灶中单核细胞的募集起着重要作用^[6]。最近, Hayes 等^[2]证实, 在动脉粥样硬化病变中除 MCP-1 外, 还表达 MIP-1 α 和正常 T 细胞表达和分泌、活化时下降的因子 (reduced upon Activation, normal T cell, expressed and secreted, RANTES)。然而, MIP-1 α 在动脉粥样硬化病变中的表达分布如何? 脂蛋白对 MIP-1 α 的表达影响又如何? 尚未见文献报道。本研究结果表明, 动脉粥样硬化斑块中内皮细胞及泡沫细胞皆有 MIP-1 α mRNA 表达。关于脂蛋白对单核/巨噬细胞的作用, Thomas 等^[7]及 Lipton 等^[8]分别证实 ox-LDL 能诱导人单个核细胞及动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞源性泡沫细胞产生 IL-1 β 和 IL-1 α , 王国平等^[6]也报道 ox-LDL 和 ox-VLDL 能刺激巨噬细胞表达与分泌 MCP-1。我们通过 RT-PCR 和 ELISA 则证明了 ox-LDL 和 ox-VLDL 能显著诱导单核细胞表达 MIP-1 α mRNA 和蛋白。进一步证实了氧化型脂蛋白在动脉粥样硬化中的重要作用。

大量实验已证实 MCP-1 在 As 早期单核细胞进入血管壁的过程中起着重要作用。敲除鼠 MCP-1 或其受体的基因而产生的 MCP-1^{-/-} 高脂血症鼠模型发现, 该鼠动脉硬化病灶明显减少。但即便如此, 这些基因敲除鼠模型的动脉中仍然有单核巨嗜细胞的浸润及泡沫细胞的形成^[9, 10], 表明除了 MCP-1 外, 还有其它的趋化因子同样参与单核细胞的募集及泡沫细胞的形成。我们的实验结果则更进一步明确了 MIP-1 α 参与这一病理过程的可能性。MIP-1 α 、MCP-1 和 RANTES 同属 C-C 型趋化因子, 其趋化作用的靶细胞是 T 淋巴细胞和单核/巨噬细胞^[11], 体内实验

更明确表明 MIP-1 α 可引起单核细胞及淋巴细胞的浸润, 并能活化血管内皮细胞^[12], 而我们的实验表明单核细胞在氧化型脂蛋白的诱导下可增加表达 MIP-1 α , 从而可吸引更多的淋巴细胞和单核细胞进入病变区, 构成恶性循环, 促进 As 斑块的发展。由此可见, MIP-1 α 也跟其他 C-C 型趋化因子一样, 参与 As 的发生。

参考文献

- [1] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial fatty streak and intermediate lesion of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1994, **14**: 840-856
- [2] Hayes IM, Nicola JJ, Sewah T, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for cc chemokines [J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1998, **18**: 397-403
- [3] Pawlowski NA, Kaplan G, Hamill A, et al. Arachidonic acid metabolism by huamn monocytes studies with platelet-depleted cultures [J]. *J Exp Med*, 1983, **158**: 393-412
- [4] Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, et al. Oxidized LDL increases and interferon γ decreases expression of CD36 in human monocyte derived macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1998, **18**: 1350-357
- [5] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115-126
- [6] Wang GP, Deng ZD, Ni J, et al. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein 1 in rabbit peritoneal exudate [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **133**: 31-36
- [7] Thomas CE, Jakson RL, Ohlweiler DF, et al. Multiple Lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin 1 beta release from human blood mononuclear cells [J]. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 417-427
- [8] Lipton BA, Parthasarathy S, Ord VA, et al. Components of the protein fraction of oxidized low density lipoprotein stimulate interleukin-1 α production by rabbit arterial macrophage derived foam cells [J]. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 2232-2242
- [9] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B [J]. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 773-778
- [10] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein 1 α induces significant recruitment of neutrophils and monocytes [J]. *J Immunol*, 2000, **164**: 3392-402
- [11] Oh KO, Zhou Z, Kim KK, et al. Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein 1 alpha [J]. *J Immunol*, 1991, **147**: 2978-983
- [12] Dawson TC, Fuziel WA, Osahar TA, et al. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 205-211

(此文 2000-10-30 收到, 2001-04-20 修回)

(此文编辑 朱雯霞)