

氧化修饰低密度脂蛋白对巨噬细胞的脂质 过氧化损伤在泡沫细胞形成中的作用

第一军医大学脂质过氧化损伤研究组 刘尚喜 周 玫 陈 媛

摘 要 氧化修饰低密度脂蛋白(Ox-LDL)在动脉粥样硬化发生发展中的作用越来越引起人们的重视。本文通过比较 Ox-LDL 和脂质过氧化降解产物丙二醛(MDA)修饰的低密度脂蛋白(MDA-LDL)在致泡沫细胞形成方面的差异,探讨了脂质过氧化对巨噬细胞的损伤在泡沫细胞形成中的作用。结果显示:Ox-LDL 和 MDA-LDL 都可被巨噬细胞清道夫受体所识别,引起大量吞噬,造成细胞内胆固醇的聚集,但由 MDA-LDL 造成的细胞内胆固醇酯聚集可被高密度脂蛋白(HDL₂)所清除,而 Ox-LDL 造成的胆固醇酯聚集则不能。进一步的研究表明 Ox-LDL 和 MDA-LDL 对巨噬细胞 HDL₂ 结合量及细胞内脂质过氧化物(LPO)含量的影响不同。虽然 MDA-LDL 和 Ox-LDL 处理巨噬细胞,都可使其 HDL₂ 结合量有不同程度的下降,细胞内 LPO 含量有不同程度的升高,但当处理因素消除后,细胞继续培养时,由 MDA-LDL 处理的细胞其降低的 HDL₂ 结合量又有一定的恢复,细胞 LPO 含量不再上升;而由 Ox-LDL 处理的细胞,其 HDL₂ 结合量则继续下降,细胞 LPO 含量则继续升高。由 Ox-LDL 导致的巨噬细胞 HDL₂ 结合量下降与细胞 LPO 含量升高之间呈负相关($r = -0.81, P < 0.01$)。用叔丁基氢过氧化物(tbooh) ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)对巨噬细胞损伤 24 小时,然后用两种修饰的 LDL 处理,则两种修饰 LDL 造成的胆固醇酯聚集都不能被 HDL₂ 清除。本文结果提示 Ox-LDL 对巨噬细胞的脂质过氧化损伤可能在巨噬细胞向泡沫细胞转变过程中起着重要作用。

关键词 低密度脂蛋白; 氧化修饰; 丙二醛修饰; 高密度脂蛋白 3; 泡沫细胞; 巨噬细胞

泡沫细胞形成于动脉粥样硬化病变的早期。形态学和组织化学的研究表明这些泡沫细胞主要是由单核细胞来源的巨噬细胞吞噬大量脂质而形成的^①。一般认为血浆低密度脂蛋白(LDL)水平升高是动脉粥样硬化的危险因素,但正常情况下 LDL 经 LDL 受体介导进入细胞,由于 LDL 受体受到细胞内胆固醇水平的反馈调控,不会引起大量吞噬^②。近几年的研究发现 LDL 极易发生氧化修饰,修饰后的 LDL 可被巨噬细胞识别引起大量吞噬,导致泡沫细胞的形成^③。某些化学修饰的 LDL 如乙酰化^④或丙二醛(MDA)^⑤修饰的 LDL 也有同样的作用。目前的研究认为修饰后的 LDL 不能被正常 LDL 受体识别,而被巨噬细胞的清道夫受体识别,后者不受细胞内胆固醇水平的反馈调控,故巨噬细胞可大量吞噬而形成泡沫细胞^⑥。但也有报道认为

氧化修饰与一般化学修饰的 LDL 对细胞生理功能的影响不同。氧化修饰 LDL 有细胞毒作用,可影响花生四烯酸的代谢,抑制巨噬细胞趋向性等,而一般化学修饰的 LDL 则无此效应^⑦。因此氧化修饰 LDL 和一般化学修饰 LDL 在致泡沫细胞形成方面的差异还待探讨。本文分别用 Cu^{2+} (引发氧化修饰)和 MDA 对 LDL 进行修饰,比较了二者在致泡沫细胞形成方面的差异。

1 材料和方法

1.1 LDL、HDL₂ 和无脂血清(LPDS)的制备

人血浆 LDL($d = 1.040 \sim 1.063 \text{ g/ml}$), HDL₂($d = 1.125 \sim 1.170 \text{ g/ml}$)和 LPDS($d > 1.25 \text{ g/ml}$)采用一次性密度梯度超速离心法制备^⑧。

1.2 LDL 的修饰及修饰程度鉴定。

1.2.1 MDA 修饰 用酸水解四乙氧基丙烷

(Sigma) 产生 MDA。将 LDL (1mg/ml) 置含 10mmol/L MDA 溶液中, 37℃ 温育 3 小时, 修饰后的 LDL 在含 EDTA 的 PBS 中透析 24 小时, 超滤除菌保存。

1.2.2 氧化修饰 无 EDTA、LDL (1mg/ml) 置含 10μmol/L Cu²⁺ 的 PBS 中, 37℃ 温育 7 小时。修饰后的 LDL 在含 EDTA 的 PBS 中透析 24 小时 (4℃), 超滤除菌保存。

1.2.3 修饰程度鉴定 采用琼脂糖凝胶电泳^①, 油红染色, 观察电泳迁移率。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞制备和培养

NIH 小鼠 (♀ 20±2g) 购自本校实验动物中心。将小鼠拉颈处死, 腹腔注射无血清 RPMI 1640 培养液 (GIBCO), 收集腹腔液, 1000r/min 离心 10min, 收集细胞, 用含 10% 小牛血清的 1640 调整细胞浓度, 根据需要加入 24 孔板或 25ml 培养瓶, 5% CO₂ 培养箱培养 (37℃), 2 小时后洗去未贴壁细胞, 根据需要加入含不同成份的培养基继续培养。

1.4 巨噬细胞形态观察

将小鼠腹腔巨噬细胞贴壁培养于盖玻片上, 首

先用各种 LDL 处理 48 小时, 然后用 HDL₂ 处理。处理后的细胞用 PBS 洗三次, 2.5% 戊二醛固定 5 分钟, 用 HE 染色, 光镜下观察。

1.5 HDL₂ 的 ¹²⁵I 标记及巨噬细胞 HDL₂ 结合量的测定

HDL₂ 的 ¹²⁵I 标记采用一氯化碘法^②。无载体 Na¹²⁵I 购自北京原子能科学院。所标 HDL₂ 比放射性为 500~700cpm/ng, 脂质标记率 < 4%, 游离碘含量 < 1%。

HDL₂ 结合量的测定采用改良的 Oram 法^③。

1.6 其他测定方法

蛋白质定量采用 Lowry 法; 细胞 LPO 测定用 Yagi 等法^④, 四乙氧基丙烷为标准品; 细胞胆固醇测定用 Gamble 等法^⑤。

2 结果

2.1 LDL 的修饰

将 LDL 用 Cu²⁺ 和 MDA 修饰后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。LDL 经两种方法修饰后其电泳迁移率均大于正常 LDL, MDA 修饰后的 LDL 大于 Cu²⁺ 修饰后的 LDL。

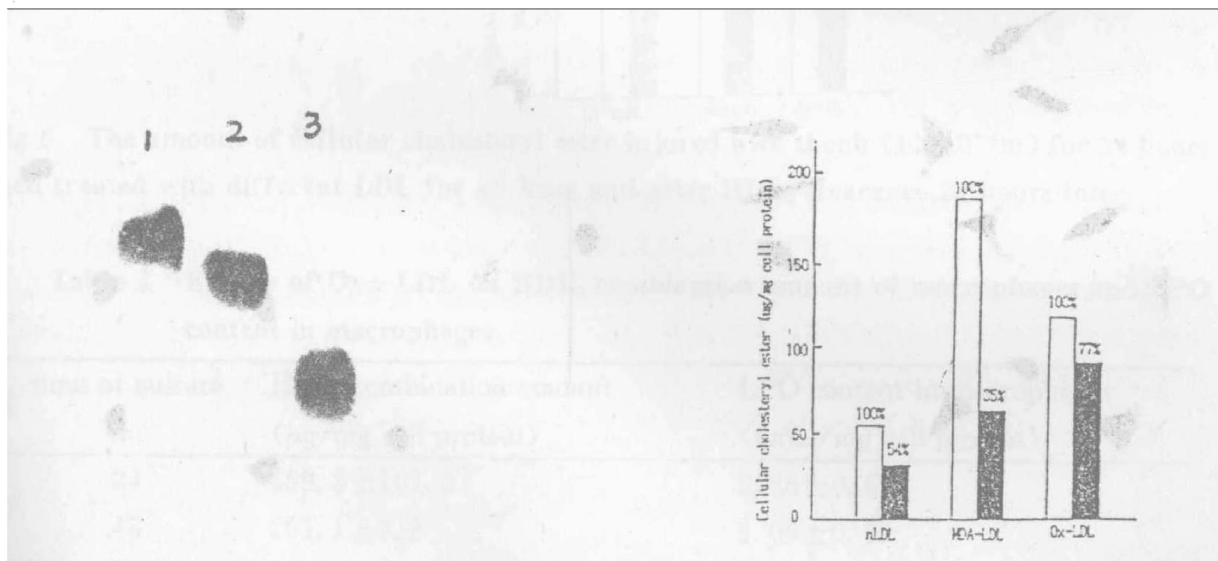


Fig 1 Electrophoretogram of LDL

1. Normal LDL
2. Ox-LDL
3. MDA-LDL

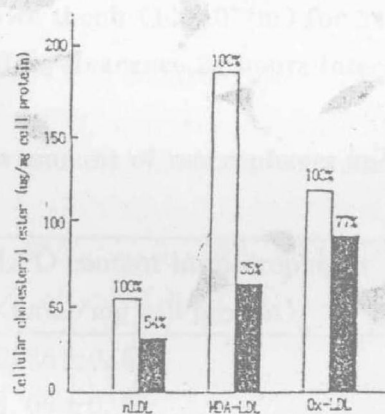


Fig 2 The amount of cellular cholesteryl ester in macrophages of mice

- = the amount of cellular cholesteryl ester with LDL treatment 48 hours later
- = the amount of cellular cholesteryl ester after treatment with LDL for 48h then culture with HDL₂ for 24 h

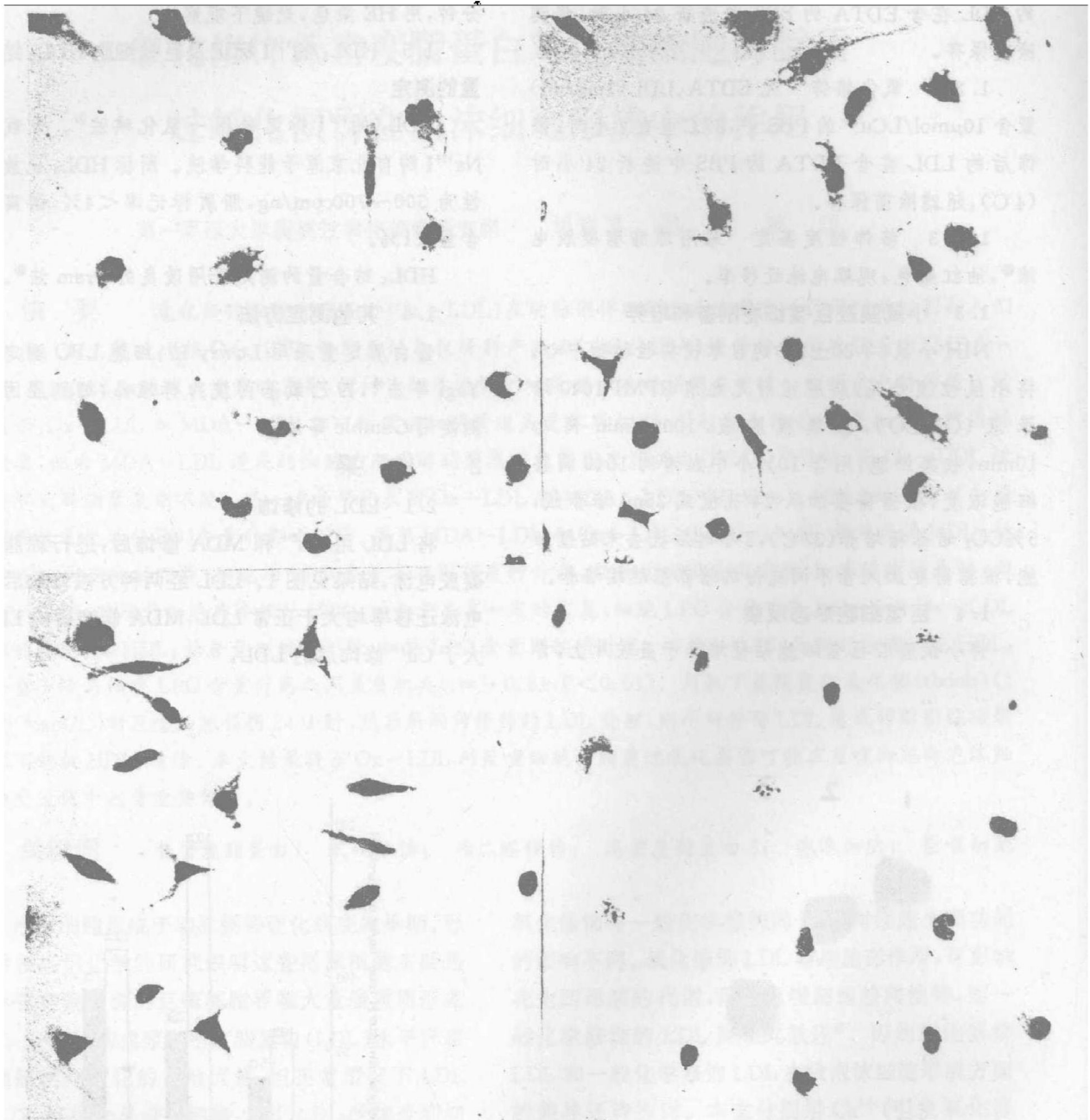


Fig 3 Morphology of mouse abdominal macrophages treated with LDL and HDL, (× 400)

Fig a cellular lipidic vesicula (Ox-LDL treated for 48 hours)

Fig b cellular lipidic vesicula (MDA-LDL treated for 48 hours)

Fig c cellular lipidic vesicula (HDL₂ treated for 24 hours after Ox-LDL treated for 48 hours)

Fig d Disappearance of cellular lipidic resicula (HDL₂ treated for 24 hours after MDA-LDL treatment 24 hours)

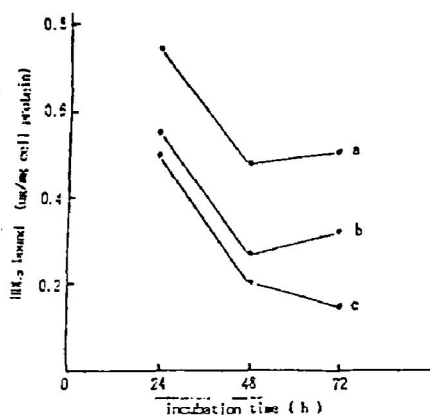


Fig 4 Effects of MDA-LDL and Ox-LDL on HDL₃ combination amount of macrophages

a: lipid-free serum culture
b, c: represent respectively changes of HDL₃ combination amount in 10% LPDS for 24 hours after in MDL-LDL and Ox-LDL for 24, 48h

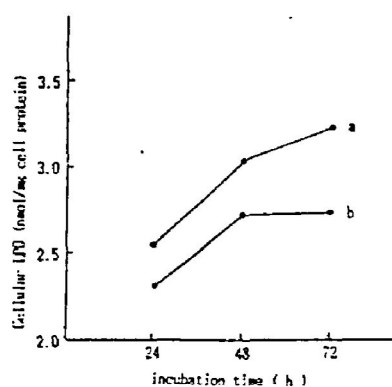


Fig 5 Effects of MDA-LD and Ox-LDL on the content of LPO in macrophages

Macrophages were cultured in 10% LPDS for 24 hours after MDA-LDL (a) and Ox-LDL for 48 hours

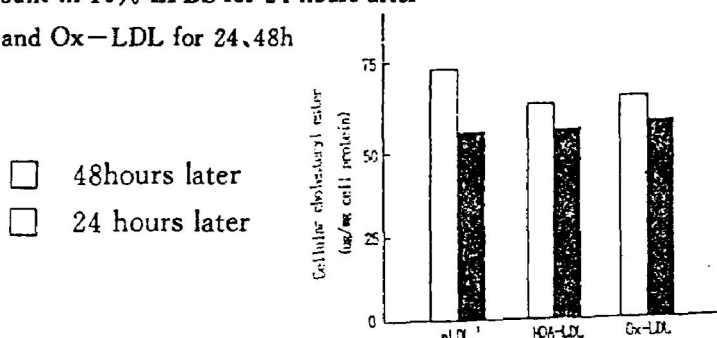


Fig 6 The amount of cellular cholesteryl ester injured with thooh ($1 \times 10^{-5}m$) for 24 hours then treated with different LDL for 48 hour and after HDL₃ clearance 24 hours later

Table 1 Effects of Ox-LDL on HDL₃ combination amount of macrophages and LPO content in macrophages

time of culture (h)	HDL ₃ combination amount (μg/mg cell protein)	LPO content in macrophages (nmol/mg cell protein)
24	499.3±101.3	2.66±0.57
48	203.1±9.2	3.09±0.39
72	152.8±45.0	3.27±0.19

$$r = -0.81, p < 0.01$$

2.2 MDA-LDL 和氧化修饰 LDL (Ox-LDL) 对巨噬细胞胆固醇酯聚集的影响及 HDL₃ 的清除作用

分别用正常 LDL (nLDL), MDA-LDL 和 Ox-LDL 处理小鼠腹腔巨噬细胞 48 小时, 都可不同程度地引起细胞内胆固醇酯的聚集, 当处理细胞在含 HDL₃ (100 μg/ml) 的培养基中继续培养时, 由

nLDL 和 MDA-LDL 引起的细胞内胆固醇酯聚集可被 HDL₃ 大量清除, 而由 Ox-LDL 造成的胆固醇酯聚集则不能被大量清除 (图 2)。

对 HDL₃ 处理前后巨噬细胞形态的观察也说明 Ox-LDL 造成的胆固醇酯聚集不能被 HDL₃ 所清除 (图 3)。

2.3 MDA-LDL 和 Ox-LDL 对巨噬细胞

HDL, 结合量及细胞内 LPO 含量的影响

小鼠腹腔巨噬细胞分别用 MDA-LDL 和 Ox-LDL 处理 24 小时、48 小时后细胞 HDL₃ 结合量都呈下降趋势, 细胞 LPO 含量呈上升趋势(图 4, 图 5)。但当处理细胞在含 10%LPDS 的 1640 中继续培养时, MDA-LDL 处理的细胞, 其降低的 HDL₃ 结合量又有一定的恢复, 细胞 LPO 含量不再升高, 而由 Ox-LDL 处理的细胞, 其 HDL₃ 结合量则继续下降, 细胞 LPO 含量继续升高。由 Ox-LDL 导致的巨噬细胞 HDL₃ 结合量下降与细胞 LPO 含量升高之间呈负相关($r = -0.81, p < 0.01$, 表 1)。

2.4 叔丁基氢过氧化物(tbooh)对 MDA-LDL 和 Ox-LDL 引起的巨噬细胞胆固醇酯聚集及 HDL₃ 清除作用的影响

用 tbooh(1×10^{-5} mol/L)对巨噬细胞损伤 24 小时后, 再用 MDA-LDL 和 Ox-LDL 处理细胞, 发现两种修饰 LDL 引起巨噬细胞胆固醇酯聚集的能力下降, 且造成的胆固醇酯聚集都不能被 HDL₃ 清除(图 6)。

3 讨论

氧化修饰和 MDA 修饰的 LDL 都可被巨噬细胞上的清道夫受体识别, 导致泡沫细胞的形成^[3], 但二者在致泡沫细胞形成上的差异还未见报道。我们以前的研究发现氧化修饰和 MDA 修饰对 LDL 结构和组成的影响不同, 氧化修饰破坏了 LDL 的结构和抗氧化能力^[10]。有报道氧化修饰和一般化学修饰的 LDL 对细胞生理功能的影响不同^[11]。本文的研究结果说明氧化修饰和 MDA 修饰 LDL 在致泡沫细胞形成方面有一定的差异。虽然氧化修饰和 MDA 修饰的 LDL 都可造成巨噬细胞内胆固醇酯的聚集, 但 MDA-LDL 造成的胆固醇酯聚集可被 HDL₃ 大量清除, 而 Ox-LDL 造成的胆固醇酯聚集则不能。Goldstein 等报道乙酰化修饰的 LDL 造成的巨噬细胞胆固醇酯聚集可被 HDL₃ 清除, 这说明在 HDL₃ 存在的情况下, 氧化修饰 LDL 比一般化学修饰的 LDL 更容易造成细胞内胆固醇酯的聚集, 导致泡沫细胞的形成。

进一步的研究发现 MDA-LDL 和 Ox-LDL 对巨噬细胞 HDL₃ 结合量和细胞内 LPO 含量的影响不同。虽然 MDA-LDL 和 Ox-LDL 都可使巨

噬细胞 HDL₃ 结合量下降, 但当处理细胞在含 10%LPDS 培养液中继续培养时, MDA-LDL 处理细胞其降低的 HDL₃ 结合量可有一定的恢复, 而 Ox-LDL 处理的细胞 HDL₃ 结合量则继续下降。这可能与两种修饰的 LDL 对巨噬细胞损伤的程度不同有关。Ox-LDL 与 MDA-LDL 之间的区别在于 Ox-LDL 携带有大量活性脂质过氧化物, 可引发脂质过氧化反应, MDA-LDL 也可能由于自氧化的原因携带有少量的活性脂质过氧化物。Ox-LDL 处理的细胞在处理因素消除后其 HDL₃ 结合量仍继续下降, 说明细胞受损伤较严重, 在损伤因素消除后细胞已无力消除损伤。而 MDA-LDL 对细胞的损伤较轻, 损伤因素消除后细胞可依靠自身的抗氧化系统修复损伤。处理后细胞 LPO 含量的变化也说明了上述问题。

用 tbooh 对细胞损伤的结果间接说明脂质过氧化物对巨噬细胞的损伤是导致巨噬细胞内胆固醇酯不能被 HDL₃ 清除的主要原因。

本文研究结果说明 Ox-LDL 对巨噬细胞的脂质过氧化损伤可能在巨噬细胞向泡沫细胞转变过程中起着重要作用。

参考文献

1. Schaffner T, et al. Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* 1980;100: 57~80
2. Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-Mediated Endocytosis of Low-Density Lipoproteins in Cultured cells. *Methods in Enzymology* 1984;98:241~260
3. Heineke JW. Free radical modification of low-density lipoprotein. *Free Radical Biol Med* 1987; 3:65~73
4. Goldstein JL, et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;76:333~337
5. Fogelman AM, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte -

- macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77: 2214~2218
6. Steinbrecher UP, Zhang H, Coughlin M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med* 1990;9:155~168
7. 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; 21:257~260
8. 王克勤, 周凤兰, 程小颖. 琼脂糖凝胶电泳及其应用于人血清 β 脂蛋白的分离和分型. *生物化学与生物物理学报* 1979;11:37~48
9. Oram JF, Johnson CT, Brown TA. Interaction of HDL with its receptor on cultured fibroblast and macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1972; 260: 212~221
10. Yagi K. A simple flurometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *J lipid Res* 1976;15:212~216
11. Gamble w, Vaughan M, Kruth Hs. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro and nanogram amounts suitable for studies with culture cells. *J Lipid Res* 1978;19:1068~1070
12. 刘尚喜, 周玫, 陈瑗. LDL 的氧化修饰与丙二醛修饰比较. *生物化学与生物物理学报* 1992;24 (6):575~580

Injury to Macrophage by Oxidatively Modified Low Density Lipoprotein May Play an Important Role in Foam Cell Formation

Liu Shangxi, Zhou Mei, Chen yuan

Research Group of Lipid Prooxidative Damage,

The First Military Medical College of PLA, GuangZhou 510515

Both oxidatively and malondialdehyde modified low density lipoprotein (Ox-LDL and MDA-LDL) could be recognized by the scavenger receptor and induce intracellular cholesteryl ester accumulation of macrophage. The cholesteryl ester accumulation caused by MDA-LDL could be cleared by high density lipoprotein (HDL₃), but that caused by Ox-LDL could not be cleared. Further studies showed that both Ox-LDL and MDA-LDL could decrease the binding capacity of HDL₃ and increase the intracellular lipid peroxide (LPO). When macrophage was first cultured with MDA-LDL and then in medium containing 10% (v/v) lipoprotein deficient serum, the decreased binding capacity of HDL₃ was somewhat recovered and the intracellular LPO did not increase any more. However, if macrophage was first cultured with Ox-LDL, the binding capacity of HDL₃ continued to decrease and intracellular LPO continued to increase. There was negative correlation ($r = -0.81, p < 0.01$) between the decrease of the binding capacity of HDL₃ and the increase of intracellular LPO caused by Ox-LDL. These results suggested that lipid peroxidative injury of Ox-LDL may play an important role in the transformation of macrophages to foam cells.

Key Words low density lipoprotein; oxidative modification; malondialdehyde modification; high density lipoprotein 3; foam cell; macrophage