

mm-LDL 与 M-CSF 对动脉壁细胞 胆固醇酯蓄积的协同作用

南京医学院动脉粥样硬化研究中心 朱宇 蔡海江 范乐明 陈秀英 王南

摘要 本研究发现当鼠腹腔巨噬细胞或牛主动脉平滑肌细胞经单核细胞集落刺激因子(M-CSF)预孵育后再加入轻度修饰 LDL(mm-LDL)可显著增加两种细胞内胆固醇酯蓄积程度。这说明在致细胞内脂质蓄积方面 mm-LDL 与 M-CSF 具有协同作用。还发现 M-CSF 有加强巨噬细胞氧化修饰正常 LDL 的作用,这可能是其作用机制之一。

关键词 轻度修饰 LDL; 单核细胞集落刺激因子; 动脉粥样硬化

近年来动脉粥样硬化(As)的氧化修饰脂蛋白学说^①受到研究者普遍关注,已成为 As 研究的热点之一。Fogelman^②首先提出了轻度修饰 LDL(mildly modified LDL, mm-LDL)这一概念, mm-LDL 在 As 早期中的作用也日益受到重视。Rajavashisth 等^③首先报道 mm-LDL 可促使主动脉内皮细胞内集落刺激因子(CSFs)mRNA 水平升高并且蛋白分泌增多。Liao 等^④进一步发现注射 mm-LDL 可使小鼠血清 M-CSF 水平升高 7~26 倍。我们的研究已发现 mm-LDL 可使动脉壁平滑肌细胞及单核巨噬细胞胆固醇酯蓄积,但作用程度不如氧化 LDL(Oxidized LDL, Ox-LDL)明显。由于 mm-LDL 可诱导 M-CSF 分泌增加,故我们推测两者可能具有协同作用。因此本研究观察了 mm-LDL 与 M-CSF 协同作用对离体巨噬细胞与平滑肌细胞源性泡沫细胞形成的影响,并对其作用机理进行了初步探讨,着重观察了 M-CSF 对巨噬细胞氧化修饰正常 LDL 作用的影响。

1 材料与方

1.1 M-CSF 的制备及活性检测 本实验所用 M-CSF 样品为含 M-CSF 的 L929 细胞条件培养液。即 L929 细胞加入无血清 RPMI-1640 培养液 37℃, 7 天后收集上清液即为含 M-CSF 的条件培养液。M-CSF 活性检测按 Wing 等^⑤改良法进行。即收集 C57BL/6J 小鼠股骨髓细胞,加

入含 M-CSF 的条件培养液,在半固体培养基中孵育 7 天后数细胞形成的克隆数,1 个克隆相当于 1 个活性单位。本实验所用 M-CSF 样品活性为 100u/ml。

1.2 人血浆 LDL 制备及氧化修饰 常规分离新鲜健康人空腹血浆, EDTA 抗凝, 63000 rpm 2h 密度梯度超速离心(L8-80M 超速离心机为美国 Beckman 公司产品)分离 LDL($1.019 < d < 1.063$), 以 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液充分透析, 充 N₂ 防止 LDL 自发氧化, 加 10 μ mol EDTA 4℃保存备用, 即为正常 LDL(N-LDL)。LDL 蛋白量按 Lowry 法^⑥测定。mm-LDL 按 Berliner 等^⑦方法进行, 即 LDL 充分透析后去除 EDTA, 4℃贮存 2~3 月后即 mm-LDL。Ox-LDL 制备包括重金属离子催化氧化及细胞氧化修饰。重金属催化氧化法按 steinbrecher 等^⑧改良法进行, 即 LDL 充分透析后稀释至蛋白浓度 0.5 mg/ml, 加新配制 CuSO₄ 40 μ mol, 37℃孵育 24h 加 EDTA 10 μ mol 即为 Ox-LDL。细胞氧化修饰则按 Whally 等^⑨改良法进行。mm-LDL 与 Ox-LDL 以 MDA 值及琼脂糖凝胶电泳鉴定氧化修饰程度。MDA 值按 Folcik 等^⑩方法测定。

1.3 细胞培养 小鼠腹腔巨噬细胞分离及培养按 Edelson 等^⑪改良法进行。昆明种小鼠由江苏省实验动物中心提供。牛主动脉平滑肌细胞分离

及培养按 Campbell 等^②方法进行。

1.4 细胞内微量胆固醇测定 按 Heider 等^③改良法进行。胆固醇标准液、胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、辣根过氧化物酶均为美国 Sigma 公司产品。细胞内脂质染色为苏丹Ⅳ染色法。

1.5 统计学方法 为两样本均数比较的 t 检验。

2 结 果

2.1 鉴定不同氧化程度的 LDL:

本研究所用 N-LDL、mm-LDL 及 Ox-LDL 经测定 MDA 值分别为 1.2、4.7 及 25.7 nmol MDA/mg 蛋白。琼脂糖凝胶电泳 120 v, 1 h, 如以 N-LDL 的电泳迁移率为 1, 则 mm-LDL 相对电泳迁移率为 2, Ox-LDL 相对电泳迁移率为 8 (见图 1)。



Fig 1 The LDL of the different oxidized degree were identified with the agarose gel electrophoresis. The concentration of the agarose was 0.5% and the electrophoretic solution was the barbital buffer solution, pH 8.6, 120v, 1h.

2.2 小鼠腹腔巨噬细胞及牛主动脉平滑肌细胞脂质蓄积实验

小鼠腹腔巨噬细胞分为 3 组, 分别加入 N-LDL、mm-LDL 及 Ox-LDL (终浓度皆为 0.1 mg 蛋白/ml), 37℃ 孵育 72h 后分别测定细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)含量。结果发现加 mm-LDL 的细胞 TC 量($136.9 \pm 7.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)较加 N-LDL 细胞 TC 量(96.4 ± 1.5

$\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)明显升高($p < 0.001$), 主要是其中 CE 量明显升高(两者分别为 63 ± 4.9 和 $23.7 \pm 2.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)($p < 0.001$), FC 量则无明显差别。加 Ox-LDL 细胞 TC 量($188.7 \pm 36.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)较加 N-LDL 和 mm-LDL 细胞 TC 量均明显升高($p < 0.001$), 也是其中 CE 量明显升高($p < 0.01$), FC 量无明显变化(表 1)。

Table 1 Effect of mm-LDL and Ox-LDL on the lipid accumulation in mouse peritoneal macrophages ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\bar{x} \pm s$)

	n	total cholesterol	cholesteryl ester	free cholesterol
N-LDL	12	96.4 ± 1.5	23.7 ± 2.9	72.7 ± 2.8
mm-LDL	14	$136.9 \pm 7.9^*$	$63 \pm 4.9^*$	72.9 ± 6.8
Ox-LDL	12	$188.7 \pm 36.4^{\Delta}$	$102.6 \pm 18.8^{\Delta}$	86.9 ± 32.2

* compared with N-LDL, $p < 0.001$ Δ compared with mm-LDL, $p < 0.01$

牛主动脉平滑肌细胞分为3组,分别加入N-LDL、mm-LDL及Ox-LDL(终浓度皆为0.1mg蛋白/ml),37℃孵育72h后测定TC、CE和FC含量。结果发现加mm-LDL的细胞TC量(50.6±2.8 μg/mg蛋白)较加N-LDL的细胞TC量(43.9±4.8 μg/mg蛋白)升高(p<0.05),主要是其中

CE量升高(两者分别为18±2.9与11.7±1.9 μg/mg蛋白)(p<0.01),FC量则无明显差异。加Ox-LDL细胞TC量(59.9±1.7 μg/mg蛋白)及其中CE量(28.1±2.8 μg/mg蛋白)较加N-LDL与mm-LDL细胞TC和CE量明显升高(p<0.01),FC量则无明显变化(表2)。

Table 2 Effect of mm-LDL and Ox-LDL on the lipid accumulation in the bovine aortic smooth muscle cells (μg/mg protein, $\bar{x} \pm s$)

	n	total cholesterol	cholesteryl ester	free cholesterol
N-LDL	5	43.9±4.8	11.7±1.9	32.1±3.1
mm-LDL	5	50.6±2.8*	18.0±2.9**	32.6±4.1
Ox-LDL	4	59.9±1.7△△*	28.1±2.8△△	31.9±1.8

compared with N-LDL, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

compared with mm-LDL △△p<0.01

2.3 M-CSF和mm-LDL对巨噬细胞及平滑肌细胞脂质蓄积的协同作用

将小鼠腹腔巨噬细胞分为两组,一组以L929条件培养液2ml预孵72h,另一组加同样量无血清RPMI-1640培养液为对照。两组细胞再各加mm-LDL(终浓度为0.1mg蛋白/ml),37℃孵育72h后测定细胞胆固醇含量。结果发现预孵细胞较对照细胞总胆固醇量明显升高,分别为197.1±9.

2及125.9±10.1 μg/mg蛋白(p<0.001),其中胆固醇酯量明显升高,分别为120.5±8.1与69.1±5.8 μg/mg蛋白(p<0.001),而游离胆固醇量无明显差异。预孵细胞胆固醇酯蓄积程度达到Ox-LDL单独作用水平(表3)。以苏丹N染色法观察胞内脂质颗粒结果也发现,预孵细胞内红染颗粒较对照细胞明显增多。

Table 3 The synergism of mm-LDL and M-CSF on the lipid accumulation in mouse peritoneal macrophages (μg/mg protein, $\bar{x} \pm s$)

	n	total cholesteryl	cholesteryl ester	free cholesteryl
mm-LDL	6	125.9±10.1	69.1±5.8	63.2±4.8
mm-LDL+ M-CSF	6	197.1±9.2**	120.5±8.1**	76.9±7.3
Ox-LDL	12	188.7±36.4**	102.6±18.8*	86.9±32.2

compared with mm-LDL, * p<0.01, ** p<0.001

以 L929 细胞条件培养液预孵牛主动脉平滑肌细胞内脂质测定结果显示了类似结果,预孵细胞较对照细胞总胆固醇量明显升高,分别为 58.4 ± 5.6 及 $50.5 \pm 4.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白 ($p < 0.05$),其中胆

固醇酯量明显升高,分别为 $23.4 \pm 2.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白与 $12.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白 ($p < 0.05$),游离胆固醇量无明显差别。预孵细胞胆固醇酯蓄积程度达到 Ox-LDL 单独作用水平(表 4)。

Table 4 The synergism of mm-LDL and M-CSF on the lipid accumulation in the bovine aortic smooth muscle cells ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, $\bar{x} \pm s$)

	n	total cholesterol	cholesteryl ester	free cholesterol
mm-LDL	4	50.5 ± 4.2	12.8 ± 0.5	34.7 ± 3.9
mm-LDL + M-CSF	6	$58.4 \pm 5.6^*$	$23.4 \pm 2.2^{***}$	34.7 ± 4.6
Ox-LDL	4	$59.9 \pm 1.7^{**}$	$28.1 \pm 2.8^{***}$	31.9 ± 1.8

compared with mm-LDL, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

2.4 M-CSF 对巨噬细胞氧化修饰 LDL 能力的影响

正常 LDL 除了能被重金属离子催化氧化外,也能被体外培养细胞氧化修饰。为了探讨 M-CSF 与 mm-LDL 作用的机理,我们首先研究了 M-CSF 对巨噬细胞氧化修饰 LDL 能力的影响。

将小鼠腹腔巨噬细胞分为两组,一组以 M-CSF 200 u 预孵,另一组以无血清 RPMI-1640 培

养液预孵为对照,37℃,72 h 后倾去上清,加入无血清 Hams F-10 培养液。各加无抗氧化物质的 N-LDL(终浓度为 0.05mg 蛋白/ml),37℃孵育 24h 后测定上清中 MDA 含量,结果发现以 M-CSF 预孵细胞较对照细胞 MDA 含量明显升高,分别为 8.18 ± 0.82 及 $6.68 \pm 0.46 \text{nmol MDA}/\text{mg}$ 蛋白 ($p < 0.01$)。测定两组细胞蛋白量结果无明显差异(表 5)。

Table 5 Effect of M-CSF on the oxidized capability of the LDL by macrophages($\bar{x} \pm s$)

	n	malondialdehyde (nmolMDA/mg protein)	cellular protein (μg)
N-LDL	6	6.68 ± 0.46	40 ± 4
m-CSF + N-LDL	6	$8.18 \pm 0.82^*$	41 ± 6

compared with N-LDL, * $p < 0.01$

3 讨论

泡沫细胞是 As 早期出现的特征性病理改变^①。有实验结果表明^{②,③},动脉壁中早期浸润的巨噬细胞通过清道夫受体途径摄取经氧化修饰的

LDL 而非正常 LDL,造成胞内胆固醇酯蓄积,形成泡沫细胞。近年来由于 mm-LDL 可诱导一些细胞因子如集落刺激因子^④,组织因子^⑤等的产生,这促使我们进一步研究其在 As 发生过程中所起的作用及机理。本研究结果表明,mm-LDL 和 M-

CSF 在致细胞内脂质蓄积方面有协同作用。

M-CSF 是一种分子量为 85kDa 的糖蛋白,可刺激单核细胞前体的增殖和分化。M-CSF 除具有一般生长因子的功能外,更重要的是能激活成熟巨噬细胞的一系列功能^{⑧,⑨}。M-CSF 可通过增加细胞膜脂蛋白受体数目促进细胞对脂蛋白的摄取^⑩,或是直接促进细胞内游离胆固醇的酯化,造成细胞内胆固醇酯的蓄积^⑪。我们发现,M-CSF 可促使巨噬细胞氧化修饰 LDL 的能力明显升高,因此可产生更多的 Ox-LDL,经细胞膜清道夫受体途径摄入细胞,造成胞内胆固醇酯蓄积。但是 M-CSF 预孵并未使细胞蛋白质含量明显改变,这说明氧化修饰能力的增加并不是由于细胞增殖,而可能是由于细胞本身代谢增强。至于氧化能力增强是由于产生了更多的 O_2^- 、 OH^+ ,还是其他因素目前尚不清楚,需要进一步研究。

参 考 文 献

1. Steinberg D, et al. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915~924
2. Berliner JA, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocytes endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990;85:1260~1266
3. Rajavashisth T. B. et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254~257
4. Liao F, et al. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest* 1991;87:2253~2257
5. Wing E, J. et al. Effect of colony stimulating factor on murine macrophages. *J Clin Invest* 1982;69:270~276
6. Lowry O. H, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265~275
7. Steinbrecher V, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3883~3887
8. Whally C. U, et al. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990;39:1734~1750
9. Folcik V, et al. Assessment of 5-lipoxygenase involvement in human monocyte-mediated LDL oxidation. *J Lipid Res* 1993;34:69~79
10. Edelson P, et al. Purification and cultivation of monocytes and macrophages. In Bloom B. et al. eds *In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity*. New York Academic Press 1976;333~340
11. Campbell J, et al. Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1983;47:279~295
12. Heider J, et al. The picomole determination of free and total cholesterol in the cells in culture. *J Lipid Res* 1978;19:514~518
13. Zhang H, et al. Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in culture macrophages. *J Lipid Res* 1990;31:1361~1369
14. Carew T. Role of biologically modified low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1989;64:18G~22G
15. Drake T, et al. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1990;138:601~607
16. Clark S, et al. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987;236:1229~1237
17. Bussolino F, et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989;337:471~473
18. Hansson G. et al. Immune mechanism in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989;9:567~571
19. Ishibashi S, et al. Monocyte colony-stimulating factors enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and chole-

Synergism of mm-LDL and M-CSF on the Accumulation of Cholesteryl Ester in Aortic Cells

Zhu Yu, Cai Haijiang, et al

Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical College, 210029

The accumulation of cholesteryl ester in mouse peritoneal macrophages and in bovine aortic smooth muscle cells by adding the mildly modified LDL (mm-LDL) was greatly enhanced when these cells were preincubated with monocyte colony-stimulating factor (M-CSF), indicating the synergism of mm-LDL and M-CSF on the lipid accumulation in cells. We also found that M-CSF increased the oxidative capability of cultured macrophages. This might be one of the mechanisms of synergism of mm-LDL and M-CSF.

Key Words mildly modified LDL; monocyte colony-stimulating factor; atherosclerosis