

# 巨噬细胞氧化修饰极低密度脂蛋白及 $\text{Cu}^{2+}$ 修饰的极低密度脂蛋白对单核细胞与内皮细胞粘附的影响

同济医科大学基础医学院生物化学教研室 张志兵 冯友梅 宗义强 王淳本 袁 敏 冯宗忱

**摘 要** 极低密度脂蛋白(VLDL)与小鼠腹腔巨噬细胞温育24小时和48小时后,其硫代巴比妥酸反应物质值明显高于无细胞对照组,琼脂糖电泳速度也加快,两者一致。结果说明小鼠腹腔巨噬细胞可以氧化修饰极低密度脂蛋白。VLDL在体外用  $\text{Cu}^{2+}$  修饰后,硫代巴比妥酸反应物质明显增加,琼脂糖凝胶电泳速度加快。比较正常的VLDL(n-VLDL)及  $\text{Cu}^{2+}$  氧化的VLDL(Ox-VLDL)对内皮细胞粘附单核细胞的影响时,发现在所用各种浓度下,Ox-VLDL 单核细胞的粘附率比n-VLDL 组大得多( $P < 0.0001$ ),说明VLDL被氧化后明显增加单核细胞与内皮细胞的粘附。

**关键词** 巨噬细胞; 氧化修饰; 极低密度脂蛋白; 单核细胞; 粘附

动脉粥样硬化(As)早期病变的形成取决于两个重要环节:一是血液中单核细胞(MC)粘附到血管内皮,继而迁移到内皮下转变为组织巨噬细胞( $M\phi$ );二是  $M\phi$  或平滑肌细胞(SMC)摄取脂蛋白后转变为泡沫细胞<sup>①</sup>。血浆脂蛋白成份在这二个环节中起一定作用。国外研究表明低密度脂蛋白(LDL), $\beta$ -极低密度脂蛋白( $\beta$ -VLDL)及它们的氧化形式,还有高甘油血症的VLDL都能促进MC粘附到血管内皮,这些脂蛋白在As发病中起重要作用<sup>②③④</sup>。

由于我国居民主要以碳水化合物饮食为主,血脂升高主要是以VLDL升高所致的高甘油三酯血症,因此我室多年来系统研究了VLDL在泡沫细胞形成中的作用,结果表明VLDL可致  $M\phi$  内大量脂质堆积<sup>⑤</sup>。已知氧化修饰的LDL是致As的重要条件,已有大量实验表明LDL可被  $M\phi$ 、SMC等体外氧化,体内实验表明在As斑块区有氧化LDL存在。但VLDL能否被细胞氧化还不清楚。为了解VLDL能否在体内氧化,本实验用小鼠腹腔巨噬细胞对VLDL进行氧化修饰,同时观察用  $\text{Cu}^{2+}$  修饰的VLDL对As形成的另外一个环节,即MC粘附到血管内皮的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 脂蛋白的分离

取正常人空腹新鲜血浆于4℃12000 r/min离心30分钟去乳糜微粒,加入还原型谷胱甘肽(终浓度为0.56mmol/L),用NaCl调血浆密度到1.1kg/L,超速离心,(70Ti,60000r/min,6小时10℃),分离得VLDL及LDL之混合物,再用NaCl制备梯度液(GSH终浓度为0.56 mmol/L,EDTA- $\text{Na}_2$ 为1mmol/L),按上述条件离心3小时,分离出VLDL和LDL,经琼脂糖电泳为单一区带,加青链霉素贮于清洁棕色瓶中,充 $\text{N}_2$ 4℃避光保存。

### 1.2 VLDL的氧化

1.2.1  $\text{Cu}^{2+}$ 氧化: 上述分离的VLDL用0.15mM/L NaCl透析24小时(4℃),浓缩后,用 $\text{CuCl}_2$ 在室温下(25℃左右)氧化24小时( $\text{Cu}^{2+}$ 终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ )。

1.2.2 巨噬细胞的氧化: 收集小鼠腹腔内  $M\phi$ ,用无血清M-199培养基洗细胞三次,加入含VLDL的无血清M-199培养基1.5ml(200 $\mu\text{g}$  VLDL-protein/ml),培养24小时和48小时后,取出培养基透析,测硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)值及进行琼脂糖凝胶电泳。以VLDL在无  $M\phi$  而相同条件下温育为对照。

### 1.3 氧化VLDL的鉴定

1.3.1 TBARS 值测定<sup>①</sup>。

1.3.2 琼脂糖凝胶电泳。

1.4 EC 培养 培养人脐静脉 EC 用 Tafle 法<sup>②</sup>。

1.5 MC 分离与纯化 按 Pawlowski 法。

1.6 蛋白质含量测定 Lowry 法。

1.7 MC 粘附实验

按 Territo 法,将第四代人脐静脉 Ec 在 24 孔

培养板上生长融合,继用含 5% 的 DMEM 1ml(对照)和含不同浓度的 n-VLDL 和 Ox-VLDL 的上述培养液(实验)与之保温 24 小时。然后吸出此培养液,洗二次,再加 MC 培养液 1ml(RPM1640+1%FCS+1×10<sup>6</sup>MC),37℃ 温育 1 小时。每 15 分摇动一次。保温完毕,洗净未粘附细胞,再用 NaOH 溶解,测溶解液蛋白含量。以不加 MC 的培养孔内 EC 蛋白含量为基础,计算 MC 粘附率。

$$\text{粘附率} = \frac{\text{EC+MC 粘附后的细胞蛋白量} - \text{EC 蛋白量}}{\text{加入 MC 蛋白含量}} \times 100\%$$

## 2 结果

2.1.1 TBARS 值测定:结果见表 1。

### 2.1 MØ 对 VLDL 的氧化作用

Table 1 The TBARS value of the lipoprotein modified by cells. ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ )

Classifications	n	TBARS value	
		24h	48h
VLDL	8	4.60±0.55	7.96±0.66
VLDL+MØ	8	10.04±0.77	11.25±0.53

unit: nmol/mg-cell-protein

从表 1 可见,在不同时间,MØ 作用的 VLDL 的 TBARS 值均比对照组 VLDL 高(P<0.0001),且 48 小时比 24 小时高。

### 2.1.2 琼脂糖凝胶电泳

细胞修饰和对照组 VLDL 培养基经透析后,浓缩约 5 倍,其琼脂糖凝胶电泳图如右:

由图 1 可见,温育 48 小时后,MØ+VLDL 组的电泳迁移率明显快于对照组 VLDL,温育 24 小时也有同样结果。

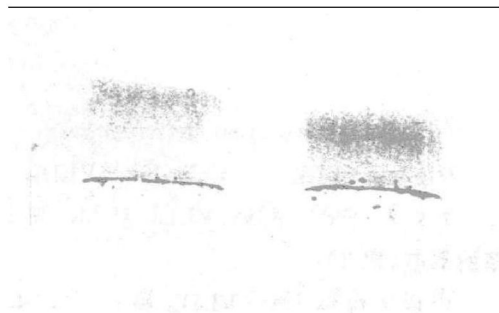


Fig 1 Lipoprotein electrophoregram  
left: MØ + VLDL, right: Control VLDL

### 2.2 Cu<sup>2+</sup>-Ox-VLDL 对 EC 粘附的影响

#### 2.2.1 Cu<sup>2+</sup> 氧化 VLDL 的鉴定

(1) Ox-VLDL 和 n-VLDL 的 TBARS 值

Table 2 The TBARS value of lipoprotein

Lipoprotein	n	TBARS ( $\bar{X} \pm \text{SEM}$ )
Ox-VLDL	4	71.00±7.45
n-VLDL	4	2.40±0.75

unit: nmol/mg VLDL protein

从表 2 的数据可见,按前述条件氧化的极低密度脂蛋白, TBARS 值明显升高, 4 次实验, 平均升高 30 倍。

(2) 琼脂糖电泳测定 Ox-VLDL 和 n-VLDL 的电泳迁移率, 结果见表 3。

Table 3 The migrating distance of lipoproteins in electrophoresis(cm)

lipoproteins	n	migrating distance( $\bar{X} \pm SEM$ )
Ox-VLDL	4	3.30 $\pm$ 0.23
n-VLDL	4	2.70 $\pm$ 0.26

从表 3 可见, VLDL 氧化后, 电泳速度比 n-VLDL 加快。四次实验, 平均增加 1.2 倍(图 2)。

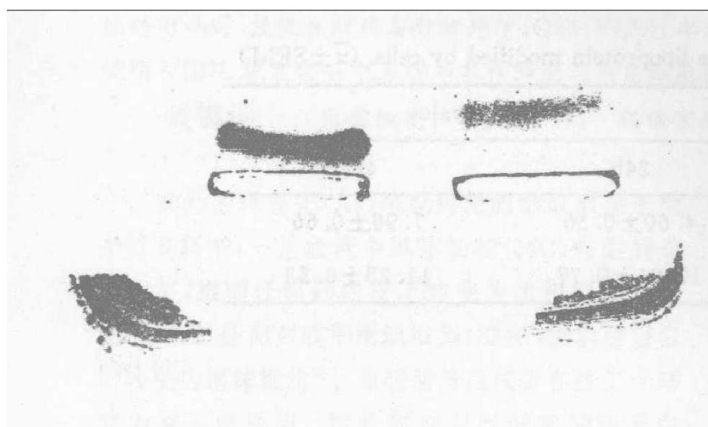


Fig 2 Lipoprotein electrophogram  
left: n-VLDL right: Ox-VLDL

2.2.2  $Cu^{2+}$ -Ox-VLDL 对 MC 与 EC 粘附率的影响(表 4):

由表 4 可见, Ox-VLDL 和 n-VLDL 对 MC 与 EC 的粘附均有促进作用, 但 Ox-VLDL 的作用大得多, 并与其浓度有关。n-VLDL 的促进作用可能是其在实验中有一定的自发氧化所引起的。

### 3 讨论

LDL 的氧化修饰是其致 As 的重要前提条件。已有大量实验表明 LDL 在体内可被氧化修饰, 但 VLDL 能否在体内氧化尚不清楚。本研究用小鼠腹腔 M $\phi$  与 VLDL 温育, 24 小时和 48 小时的 VLDL TBARS 值明显高于对照组 VLDL ( $P < 0.0001$ ), 琼脂糖电泳也变化, 表明 VLDL 可以被 M $\phi$  氧化修饰, 提示 VLDL 在体内可被氧化。

细胞修饰 VLDL 的机理尚不清楚。体外实验表明, 细胞修饰 LDL 与脂加氧酶和自由基有关, VLDL 的细胞氧化是否也受此影响有待于进一步研究。

由于单核细胞粘附到内皮是 As 发生的起始环节, 故研究 Ox-VLDL 对单核细胞粘附的影响有十分重要的意义。由于 M $\phi$  修饰的 VLDL 成份比较复杂, 故用  $Cu^{2+}$  取代 M $\phi$  来氧化 VLDL, 来观察 Ox-VLDL 对 MC 粘附的影响。

同 Ox-LDL 一样,  $Cu^{2+}$ -Ox-VLDL 的 TBARS 值明显升高, 琼脂糖电泳速度加快。

前者是由脂质过氧化作用的结果<sup>①</sup>, 后者是由于脂质降解产物与 apoB 的赖氨酸结合<sup>②</sup>, 封闭了正电荷, 从而使电泳速度加快。氧化 VLDL 也含 apoB, 可能发生类似的变化。

MC 粘附实验表明, 在实验中所用的各种浓度脂蛋白,  $Cu^{2+}$ -Ox-VLDL 较之 n-VLDL 更能明显增加 MC 粘附到培养的 EC 上去。这种作用与 Ox-VLDL 浓度有关, 本研究结果提示 Ox-VLDL 在启动 As 发生, 即使血液 MC 粘附于局部 EC 表面过程中起作用, 这为 MC 进一步迁移到内皮下转变为 M $\phi$  创造了条件。

MC 粘附与很多趋化因子有关, Ox-VLDL 比正常 VLDL 更能使 MC 粘附, 可能原因是 Ox-VLDL 诱导更多趋化因子产生, 详细机理有待进一步探讨。

Ox-LDL 是致 As 的重要危险因素, Ox-VLDL 是否同 Ox-LDL 一样具有广泛的与 As 发生有关的生物学效应, 如细胞毒作用, 抑制 M $\phi$  从动脉壁移出, 促进血小板聚集及抑制 EDRF 介导的

Table 4 The sticking rate of macrophages affected by lipoproteins ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ , n=4)

lipoprotein	concentration	the sticking rate of macrophages(%)
n-VLDL	0	12.10±2.18
	25	15.31±1.73
	50	19.78±0.69
	75	13.54±2.35
	100	15.50±1.23
Ox-VLDL	0	12.10±2.18
	25	27.40±2.66
	50	34.0±2.51
	75	41.34±4.95
	100	43.75±2.91

unit of concentration:  $\mu\text{g-VLDL-Protein/ml}$

血管舒张等<sup>②</sup>,尚需进一步研究。但至少本研究及我们过去的工作表明 Ox-VLDL 在 MC 与 EC 粘附及使 M $\phi$  摄取大量脂质转变为泡沫细胞中都起一定作用,而这正是 As 早期病变形成的二个重要环节,同时,我们的研究还表明在体内可能存在 Ox-VLDL。因此,本实际结果对于结合我国实际指导 As 的防治有重要意义。

### 参 考 文 献

- Gerrity RG, et al. The role of monocyte in atherogenesis. *Am J Pathol* 1981;103(5) : 181~190
- ALderson LM, et al. LDL enhances monocyte adhesion to endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1986;123(2) : 334~342
- Territo MC, et al.  $\beta$ -very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increase monocyte adhesion. *Arteriosclerosis* 1989;9(6) : 824~828
- Parthasarathy S, et al. Oxidative modification of  $\beta$ -very low density lipoprotein, potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 1989;9(3) : 398~404
- Feng Z, et al. The receptor-mediated accumulation of triglyceride in macrophage exposed to very low density lipoprotein. *Acta Acad Wuhan* 1983;3(1) : 8~15
- Steinbercher UP, 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;8(12) : 3882~3887
- Tafle EA, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52(11) : 2745~2756
- Haberland ME, et al. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanable heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988; 241(1) : 215~218
- Josephl Witztam and Daniel Steinberg. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88(12) : 1785~1792.

## Oxidative Modification of Very Low Density Lipoprotein and its Effects on Monocyte Adherence to endothelial Cells

Zhang Zhibing, Feng Youmei, Zong Yiqiang,  
Wang Cunben, Yuan Min, Feng Zongchen

Department of Biochemistry, Tong Ji Medical University, Wuhan, 430030

VLDL (200 $\mu$ g Protein/ml) was incubated with M $\phi$  for 24 and 48 hours. The TBARS in VLDL after incubation for 24 and 48 hrs were  $10.04 \pm 0.77$  and  $11.25 \pm 0.53$  nmol/mg protein respectively, which were much higher than that of controls ( $4.60 \pm 0.56$ ,  $7.95 \pm 0.66$  respectively). The M $\phi$  modified VLDL migrated faster than the controls on agarose electrophoregram. In conclusion, VLDL could be oxidatively modified by M $\phi$  in vitro. It suggests VLDL might be oxidized in Vivo. VLDL is also susceptible to oxidative modification by Cu<sup>2+</sup> in vitro resulting in an increase in electrophoretic mobility and TBARS in the lipoprotein. Cu<sup>2+</sup> - Ox-VLDL had the potential ability to increase MC adherence to EC. The effects were concentration dependent. The percentage of MC adherence in n-VLDL group was much less than that in Ox-VLDL group ( $P < 0.001$ ). It suggests that Ox-VLDL plays an important role in MC adherence to EC.

**Key Words** macrophage; oxidization; VLDL; adherence; monocyte