

氧化低密度和极低密度 脂蛋白对单核细胞的趋化性研究*

阮秋蓉 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室 武汉 430030)

A Study on Chemotactic Activity of Oxidized Low Density and Very Low Density Lipoprotein for Monocytes

RUAN Qiu-Rong and DENG Zhong-Duan

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

ABSTRACT The chemotactic activity of low density lipoprotein (LDL), oxidized LDL (OLDL), very LDL (VLDL) and oxidized VLDL (OVLVDL) for human monocytes was examined, respectively, by micropore filter method using modified Boyden chamber. The results showed that LDL was chemotactic for monocytes, and its chemotactic activity increased significantly when it was modified by oxidation. However VLDL was not chemotactic, whereas OVLVDL was significantly chemotactic for human blood monocytes.

KEY WORDS Chemotaxis; Lipoprotein; Monocyte; Atherosclerosis

摘要 用改良的 Boyden 小室微孔滤膜法检测低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白及氧化低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白对人血单核细胞的趋化作用。结果表明,低密度脂蛋白对单核细胞具有趋化活性,而且当其被氧化后,对单核细胞的趋化活性明显增强。极低密度脂蛋白对单核细胞无趋化活性,而氧化极低密度脂蛋白对单核细胞有明显的趋化活性。

关键词 趋化性; 脂蛋白; 单核细胞; 动脉粥样硬化

已经证明,动脉粥样硬化斑块中的泡沫

细胞主要来源于血单核细胞 (monocyte, MC) 和动脉中膜平滑肌细胞。培养的内皮细胞、平滑肌细胞均可产生单核细胞趋化因子,吸引血 MC 进入内皮下间隙^[1,2]。高脂血症是动脉粥样硬化的危险因素,斑块形成早期,脂蛋白首先沉积于内皮下间隙,并可被氧化。已知氧化的低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, OLDL) 对 MC 有趋化活性^[3],但是氧化极低密度脂蛋白 (oxidized very low density lipoprotein, OVLVDL) 对 MC 是否也具有趋化活性,目前不太清楚。本实验用微孔滤膜法检测低密度脂蛋白 (LDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL)、OLDL 及 OVLVDL 对人血单核细胞的趋化作用,以期进一步探讨 MC 进入内皮下间隙的机制。

1 材料和方法

1.1 脂蛋白的分离

取正常人新鲜血液,采用超速梯度离心法^[4]分离出 LDL 和 VLDL。经琼脂糖电泳为单一区带。将分离的 LDL 和 VLDL 用 0.9% NaCl 4℃ 透析 24 h。

1.2 蛋白质含量测定

按 Lowry 法测定 LDL 和 VLDL 的蛋白含量。

1.3 脂蛋白的氧化修饰及鉴定

在 LDL 及 VLDL 中加入 CuCl_2 , 终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37℃ 温育 24 h, 0.9% NaCl 4℃ 透析 24 h。测硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid-reactive substance, TBARS) 值以判定脂蛋白是否被氧化。用 Cu^{2+} 氧化后脂蛋白的 TBARS 值明显高于非氧化脂蛋白,分别为 1.2~3.2 及 63.0~78.5 $\text{mmol} \cdot (\text{g protein})^{-1}$ 。

1.4 人血单核细胞的分离及鉴定

按我们曾报道的方法^[5]分离人血 MC, 用 Giemsa 和非特异性酯酶染色鉴定 MC, 纯度大于 75%, 用

* 本文为国家八五科技攻关项目

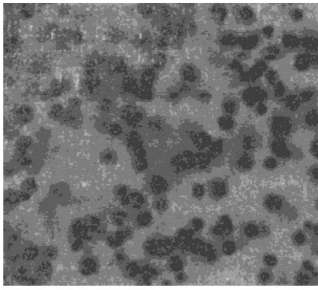


Figure 1. Monocytes on surface of filter. Hematoxylin, $\times 400$.

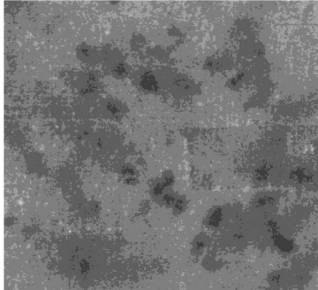


Figure 2. Monocytes migrated to middle segment of filter. Hematoxylin, $\times 400$.

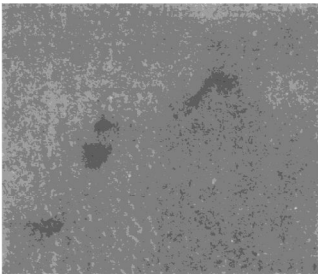


Figure 3. Monocytes migrated to terminal point. Hematoxylin, $\times 400$.

0.4%台盼蓝拒染试验检查MC存活率,活细胞数大于90%。

1.5 趋化试验

用改良的Boyden小室。下室加满各种实验液,上下室之间以硝酸纤维素微孔滤膜,上室加入MC悬液,将小室置于37℃培养箱中温育80 min,取出滤膜,Hariss苏木素染色。

1.5.1 MC移动距离的检测 在高倍显微镜下,用微调旋钮对准滤膜表面(可见膜结构和大量MC)作为起点,转动旋钮可见细胞数由多变少,直至1~3个细胞为止,即为细胞移动的终点(Figure 1~3)。从微调旋钮刻度上读出起点到终点的微米数,即为MC移动距离。每膜随机取5个视野,每组各两张膜共10个视野读数,算出平均数和标准差($\bar{x} \pm s$)。统计学方法用多组均值两两比较的方差分析。

1.5.2 趋化试验分组 基本分为4组,由于将LDL与OLDL, VLDL与OVLVDL进行对比研究,因此,需分为6组。上室加入细胞悬液,其中的液体除两个化学促动组外,其余4组均用M199培养基制成细胞悬液。(1)趋化运动组:包括两组,下室分别加滴含LDL和OLDL或VLDL和OVLVDL(浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的M199培养基,以检测LDL及OLDL或VLDL和OVLVDL对MC的趋化活性。(2)化学促动组:亦包括两组,上下室所加液体分别为含LDL和OLDL或VLDL和OVLVDL(浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的M199培养基。以检测当上下室不存在上述脂蛋白的浓度梯度时它们是否能促进MC的随机移动。(3)随机移动组:即阳性对照组,下室为M199培养基,不含脂蛋白,检测MC的随机移动。(4)阳性对照组:下室加满人活化血清,含Ca²⁺,对MC有很强的趋化活性^[1](Table 1)。

2 结果

2.1 LDL及OLDL的趋化试验

实验重复3次,共30个读数。各组的MC移动距离见Table 2。

从Table 2所示,LDL趋化运动组的MC移动距离明显大于随机移动组和化学促动组,经统计学处理,亦有极显著性意义($P < 0.01$)。OLDL趋化运动组的MC移动距离亦明显大于随机移动组和化学促动组,差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。然

Table 1. Grouping in chemotactic assay using modified Boyden chamber.

Groups	liquids of monocyte suspension in upper chamber	experiment liquids in lower chamber
(1) chemotaxis (LDL or VLDL)	M199	M199 containing LDL or VLDL
(2) chemokinesis (LDL or VLDL)	M199 containing LDL or VLDL	M199 containing LDL or VLDL
(3) chemotaxis (OLDL or OVLDL)	M199	M199 containing OLDL or OVLDL
(4) chemokinesis (OLDL or OVLDL)	M199 containing OLDL or OVLDL	M199 containing OLDL or OVLDL
(5) random migration	M199	M199
(6) positive control	M199	activated serum

Table 2. Monocyte migration distance induced by LDL and OLDL ($\bar{x} \pm s$, μm).

groups	n	migration distance
(1) LDL chemotaxis	30	77.1 $\pm$ 12.1
(2) LDL chemokinesis	30	61.0 $\pm$ 7.2
(3) OLDL chemotaxis	30	122.5 $\pm$ 13.7
(4) OLDL chemokinesis	30	61.2 $\pm$ 9.3
(5) random migration	30	60.9 $\pm$ 7.1
(6) positive control	30	116.5 $\pm$ 12.3

Table 3. Monocyte migration distance induced by VLDL and OVLDL ($\bar{x} \pm s$, μm).

groups	n	migration distance
(1) VLDL chemotaxis	20	87.1 $\pm$ 5.4
(2) VLDL chemokinesis	20	83.9 $\pm$ 6.8
(3) OVLDL chemotaxis	20	122.1 $\pm$ 6.0
(4) OVLDL chemokinesis	20	83.7 $\pm$ 4.6
(5) random migration	20	84.6 $\pm$ 4.4
(6) positive control	20	121.9 $\pm$ 7.9

而, LDL 趋化运动组的 MC 移动距离则明显小于 OLDL 趋化运动组, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。另外, OLDL 化学促动组与随机移动组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.2 VLDL 及 OVLDL 的趋化试验

实验重复 2 次, 共 20 个读数。各组的 MC 移动距离见 Table 3。

从 Table 3 所示, VLDL 趋化运动组的 MC 移动距离与随机移动组及化学促动组比较, 差异无显著意义 ($P > 0.05$)。然而 OVLDL 趋化运动组的 MC 移动距离则明显大于以上各组, 差异有极显著意义 ($P < 0.01$), 并与阳性对照组接近, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

脂蛋白在动脉粥样硬化斑块的形成和发展的各个阶段中起着重要的作用。动脉粥样硬化的发生, 首先有脂蛋白沉积于内皮下间

隙, MC 随之迁入并被激活, 分化为巨噬细胞, 继而摄取大量脂质而成为泡沫细胞。动脉粥样硬化患者大都有高脂血症。由于我国居民以碳水化合物饮食为主, 血脂升高主要是 VLDL 升高。所以 VLDL 在动脉粥样硬化斑块形成中的作用不能忽视。

本实验结果表明, LDL 对 MC 有趋化性, 而 VLDL 无明显趋化性。但经 Cu^{2+} 氧化修饰后其引起 MC 的移动距离明显大于随机移动组, 而化学促动组, 即上下室不存在 OLDL 或 OVLDL 的浓度梯度时, 则 MC 的移动距离与随机移动组无明显的统计学差异。因此, 可以认为, OLDL 和 OVLDL 所致的 MC 迁移是一种趋化作用 (chemotaxis) 而非化学促动作用 (chemokinesis)。有人报道机体内可能存在 OLDL 及 OVLDL⁽⁵⁾。至于这些脂蛋白氧化的机制不很清楚, 可能与内皮细胞、平滑肌细胞产生的自由基有关⁽⁶⁾。

关于 OLDL 及 OVLDL 引起 MC 迁入

内膜的机制,除了其本身对单核细胞具有趋化活性之外,是否可刺激动脉壁细胞产生趋化因子?我们过去曾报道,培养的人脐静脉内皮细胞、兔主动脉平滑肌细胞及兔腹腔巨噬细胞均可分泌趋化因子^[1,2,7]。现在这种因子已被纯化,称为单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)。MC 胞膜上存在它的特异高亲和性受体。MCP-1 对 MC 迁入内皮下间隙有极其重要的作用^[8]。Cushing 等^[9]报道,LDL 能引起内皮细胞及平滑肌细胞的 MCP-1 表达增强。至于 OXLDL 能否促进动脉壁细胞的 MCP-1 表达增强,有待进一步研究。

参考文献

- 阮秋蓉, 邓仲端, 徐增绶, et al. 培养的人脐静脉内皮细胞产生单核细胞趋化因子的研究. 中华病理学杂志, 1991, 20 (3): 205~208.
- 朱闻宏, 邓仲端, 徐增绶, et al. 兔主动脉平滑肌细胞培养产生单核细胞趋化因子的观察. 中华医学杂志, 1991, 71 (9): 506~507.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidyl-choline: a chemotactic factor for human monocyte and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85 (8): 2805~2809.
- 张志兵, 冯友梅, 宗义强, et al. 巨噬细胞氧化修饰极低密度脂蛋白及 Cu²⁺ 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. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1 (1): 46~49.
- Bjorkhem I, Henriksson Freyschuss A, Breuer O, et al. The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thromb*, 1991, 11 (1): 15~22.
- Panasenko OM, Vol' nova TV, Azizova OA, et al. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 1991, 10 (2): 137~148.
- 魏长理, 徐增绶, 瞿智玲. 兔腹腔巨噬细胞产生单核细胞趋化因子的研究. 中国高血压杂志, 1993, 1 (2): 102~103.
- Yoshimue T, Leonard EJ. Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on monocytes. *J Immunol*, 1990, 145(1): 292~297.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (13): 5134~5138.

(本文 1994-07-13 收到)