

# 极低密度脂蛋白及氧化型极低密度脂蛋白诱导兔主动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化蛋白-1

阮秋蓉 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

单核细胞迁入内皮下间隙是动脉粥样硬化发病的最早变化之一。单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)是一种强的单核细胞趋化物质,在体外可由多种细胞分泌,包括血管壁内皮细胞(EC)和平滑肌细胞(SMC)。也有报道轻微修饰的 LDL 可刺激培养的 EC 和 SMC 产生 MCP-1。然而,目前中国人膳食仍以碳水化合物为主,高脂血症亦以甘油三酯升高为多见。因此,研究 VLDL 在动脉粥样硬化发生中的作用在中国具有特别重要的意义。VLDL 是否也能诱导血管壁细胞产生 MCP-1 未见报道。本文采用斑点杂交法探讨 VLDL 及氧化 VLDL(OVLDL)是否能刺激培养的兔主动脉 SMC 表达高水平的 MCP-1 mRNA,并与氧化低密度脂蛋白(OLDL)比较,以期以此阐明动脉粥样硬化的发病机制。

**方法** 取正常人新鲜血液,用超速梯度离心法分离出 LDL 和 VLDL,用  $\text{Cu}^{2+}$  氧化所分离的 LDL 和 VLDL,使其成为 OLDL 和 OVLDL。氧化修饰后脂蛋白的硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)值明显升高。用贴块法培养 4~6 周龄日本大耳白兔胸主动脉 SMC。3~5 代时 SMC 呈典型峰谷结构生长,此时分别加 OLDL、VLDL 和 OVLDL( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )于培养瓶中,继续培养 24 h 后取出 SMC,用异硫氰酸胍方法提取其总 RNA,在培养的 NIH 3T3 纤维母细胞分别加或不加 OLDL 继续培养 24 h,用同样方法提取其总 RNA 作为对照。杂交用探针是由 Cushing 等报道,由 35 个碱基组成的寡核苷酸,它与 MCP-1 cDNA 的第 257~291 个核苷酸互补。用  $r\text{-}^{32}\text{P}$  5'末端标记法标记寡核苷酸探针。将提取的 RNA 按每个样本  $20 \mu\text{g}$  点样于硝酸纤维素膜上,57℃预杂交 3 h 后,加入  $^{32}\text{P}$  标记的寡核苷酸探针,57℃杂交过夜。杂交膜经洗膜后,-70℃下放射自显影 24 h。用图像分析仪测定每一斑点的积分光密度,根据斑点的积分光密度值来衡量 MCP-1 mRNA 的表达水平。

**结果** 培养的兔主动脉 SMC 表达 MCP-1 mRNA,而 NIH 3T3 纤维母细胞则否。SMC 暴露 OLDL 和 VLDL 和 OVLDL 后,其 MCP-1 的 mRNA 水平明显增高,分别增高约 11 倍、6 倍和 20 倍,而 3T3 细胞暴露于 OLDL 后仍不表达 MCP-1 mRNA。结果提示,OLDL、VLDL 及 OVLDL 均可诱导培养的兔主动脉 SMC 表达 MCP-1 mRNA 增强,而且 OVLDL 的作用更强。这说明 VLDL 及 OVLDL 对动脉粥样硬化的发生,特别是对单核细胞在内膜的累积起着重要作用。