

## 氧化低密度和极低密度脂蛋白对 单核细胞血小板源性生长因子 B 链表达的影响

王国平 邓仲端 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

### The Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and Very Low Density Lipoprotein on Platelet Derived Growth Factor B-chain Expression in Monocytes

WANG Guo-Ping, DENG Zhong-Duan and QU Zhi-Ling

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

It is very clear that hyperlipemia is a risk factor of atherosclerosis. To further understand the role of lipoproteins, especially oxidized lipoproteins in atherogenesis, we examined the effects of oxidized low density lipoprotein (OLDL) and very low density lipoprotein (OVLDL) on platelet-derived growth factor B-chain (PDGF-B) expression in monocytes.

**Methods** Low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) were isolated from normal blood donors by density gradient ultracentrifugation. After exposed to LDL, OLDL, VLDL, and OVLDL for 24 hours and subsequently exposed to lipoprotein-free media for 24 hours, respectively, monocytes were used to immunocytochemical staining by anti-PDGF-B antibody, meanwhile the conditioned by cultured monocytes media were collected, and their influences on  $^3\text{H-TdR}$  incorporation into DNA of smooth muscle cells were observed.

**Results** Monocytes can express PDGF-B, and OLDL and OVLDL enhance the expression; the monocyte conditioned media also can promote the  $^3\text{H-TdR}$  incorporation into DNA of smooth muscle cells.

**Conclusions** OLDL and OVLDL may play an important role in pathogenesis of atherosclerosis through stimulating the secretion of PDGF-B in monocytes,

that promotes the proliferation of smooth muscle cells.

**KEY WORDS** Platelet-derived growth factor; Low density lipoprotein; Very low density lipoprotein; Oxidative modification; Monocyte

**摘要** 在单核细胞的培养基中分别加入  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、氧化 LDL (oxidized LDL, OLDL)、极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和氧化极低密度脂蛋白 (oxidized VLDL, OVLDL), 培养 24 h 后再用无血清脂蛋白培养基收集条件培养基, 并观察此条件培养基对  $^3\text{H-TdR}$  掺入血管壁平滑肌细胞 DNA 的影响。用抗血小板源性生长因子 B 链抗体 (抗 PDGF-B 抗体) 作免疫组织化学染色。结果表明, 单核细胞能表达 PDGF-B, OLDL 和 OVLDL 能明显地促进单核细胞 PDGF-B 的表达, 其条件培养基亦能促进  $^3\text{H-TdR}$  掺入平滑肌细胞 DNA 内。上述结果提示, OLDL 和 OVLDL 通过加强单核细胞分泌 PDGF-B 并促进平滑肌细胞增殖而在动脉粥样硬化的发病过程中起作用。

**关键词** 血小板源性生长因子; 低密度脂蛋白; 极低密度脂蛋白; 氧化修饰; 单核细胞

现已公认, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发病过程中, 外周血单核细胞 (monocyte, MC) 受到动脉壁内趋化因子的作用而迁入内皮下, 此乃 As 早期的重要变化之一。但 MC 在 As 的发病过程中究竟起何作用, 不很清楚。本文的目的是观察人血 MC 中血小板源性生长因子 B 链 (platelet-derived growth factor B chain, PDGF-B) 抗原的表达及 OLDL 和 OVLDL 对其表达的影响。同时观察 MC 条件培养基对  $^3\text{H-TdR}$  掺入平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) DNA 内的影响, 以证实

MC 条件培养基对 SMC 增殖活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白的分离与氧化<sup>[1]</sup>

用超速离心的方法从正常人血浆中分离 LDL 和 VLDL,用终浓度为 10 μmol · L<sup>-1</sup>的 CuCl<sub>2</sub> 氧化修饰 LDL 和 VLDL。LDL 和 VLDL 的硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值为 1.2~3.2 mol · g<sup>-1</sup>蛋白,而 OLDL 和 OVLDL 的 TBARS 值为 63.0~78.5 μmol · L<sup>-1</sup>蛋白。

1.2 正常兔主动脉平滑肌细胞的培养

取 4~6 周龄家兔的主动脉中膜平滑肌进行培养。原代培养采用贴块法<sup>[2]</sup>,待细胞长满瓶底,用胰蛋白酶加 EDTA 消化传代。常规培养用含 10%胎牛血清的 M199 培养基(Nissui 公司)。当第 4 代 SMC 基本上融合时,常规消化法取出细胞。SMC 的鉴定:倒置相差显微镜下,SMC 呈典型“峰与谷”结构。

1.3 人血单核细胞的分离<sup>[3]</sup>及培养<sup>[4]</sup>

在无菌的条件下用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)分离人血单个核白细胞,附壁纯化后获得 MC。用 RPMI 1640(含 50 mg · L<sup>-1</sup>庆大霉素、2 mmol · L<sup>-1</sup>谷氨酰胺)收集 MC,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养(培养皿底放入盖玻片),在培养基中分别加入 25 mg · L<sup>-1</sup>的 LDL、OLDL、VLDL 和 OVLDL,培养 24 h 后分别弃去培养基,PBS 洗涤,分别加入不含 LDL、OLDL、VLDL 和 OVLDL 的上述培养基培养 24 h 后收集条件培养基。同时将生长在盖玻片上的 MC 连同盖玻片一同取出,冷丙酮固定,用抗 PDGF-B 抗体作免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织化学染色

终止细胞培养,将培养基吸出,用 PBS 洗涤生长在盖玻片上的细胞,取出带有 MC 的盖玻片,冷丙酮固定 15 min,用 LAB-SA 方法(该药盒由美国 ZYMED 公司生产)进行免疫细胞化学染色,Triton-TBS 洗涤,加牛血清白蛋白 15 min 后分别加抗 PDGF-B 抗体(1:800,Santa Cruz 公司),4℃过夜,Triton-TBS 洗涤,加生物素标记的羊抗鼠 Ig G(1:100,北京中山生物技术公司),37℃ 30 min,Triton-TBS 洗涤,加酶标 SP(1:100,北京中山生物技术公司)37℃ 30 min,Triton-TBS 洗涤,DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。阴性对照组为 PBS 取代第一抗体和第二抗体,染色为阴性。用 TJTY-300 型医用图像处理系统检测 PDGF-B 抗原在 MC 表达的平

光密度。

1.5 单核细胞条件培养基促平滑肌细胞有丝分裂试验

取生长状态良好的兔胸主动脉 SMC,消化后加含 10%胎牛血清的 M199 培养基调细胞浓度为 7×10<sup>7</sup> · L<sup>-1</sup>,分别种于 48 孔培养板,每孔 200 μl 培养 6 h 后,PBS 洗涤,加 DME/F-12 混合培养基培养 30 h,弃去培养基,清洗后分别加入正常及 LDL、VLDL、OLDL 和 OVLDL 作用后所收集的条件培养基,培养 10 h 后,加<sup>3</sup>H-TdR(北京原子能研究所)使每孔终浓度为 0.5 μci,继续培养 20 h,弃去培养基,每孔加 0.1 mol · L<sup>-1</sup> NaOH 200 μl,30 min 后,用吸管吹打完全,将每孔溶液全部吸入到含 7 ml 闪烁液(二甲苯:Triton=2:1,0.4% 2,5-二甲苯恶唑)的闪烁杯中,液体闪烁计数器(FJ-2107G 型)检测其放射性活度。

2 结果

氧化低密度脂蛋白(OLDL)和 OVLDL 作用于 MC 后,PDGF-B 抗原在 MC 表达的平均光密度( $\bar{x} \pm s_x$ )分别为:OLDL 组 0.317 ± 0.013,与正常对照组(0.194 ± 0.01)相比,其差异有极显著性意义(P < 0.01);OVLDL 组的平均光密度为 0.327 ± 0.016,与正常对照组相比其差异有极显著性意义(P < 0.01);而 LDL 组(0.199 ± 0.016)和 VLDL 组(0.203 ± 0.02)与正常对照组相比其差异无显著性意义(P > 0.05,Table 1)。

Table 1. The effects of OLDL and OVLDL on the antigen expression of PDGF-B in monocytes.

Groups	number of cells	average optical density
control	30	0.194 ± 0.010
LDL	30	0.199 ± 0.166 <sup>△</sup>
VLDL	30	0.203 ± 0.019 <sup>*</sup>
OLDL	30	0.317 ± 0.013 <sup>△△</sup>
OVLDL	30	0.329 ± 0.016 <sup>**</sup>

△△compared with △, P < 0.01; \*\* compared with \*, P < 0.01; △ and \* compared with control, P > 0.05.

单核细胞的各种条件培养基促 SMC 有丝分裂试验结果显示,经 OLDL 刺激的 MC 的条

件培养基对<sup>3</sup>H-TdR 掺入 SMC DNA 的掺入量 ( $\bar{x} \pm s_x$ , cpm) 为  $1\ 729 \pm 74$ , 与正常对照组  $1\ 059 \pm 76$  和 LDL 组  $1\ 093 \pm 69$  相比, 其差异有极显著性意义 ( $P < 0.01$ ); OVLDL 刺激的 MC 的条件培养基对<sup>3</sup>H-TdR 掺入 SMC DNA 的掺入量为  $1\ 789 \pm 92$ , 与正常对照组和 VLDL 组 ( $1\ 130 \pm 68$ ) 相比, 其差异有极显著性意义 ( $P < 0.01$ ); LDL 组和 VLDL 组与正常对照组相比, 虽有所增加, 但其差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ , Table 2)。

Table 2. The effects of various monocyte conditioned media on the incorporation of H-TdR into SMC DNA.

Groups	n	<sup>3</sup> H-TdR incorporation into SMC DNA (cpm)
control-CM	6	1 059 ± 76
LDL-CM	6	1 093 ± 69 <sup>△</sup>
VLDL-CM	6	1 130 ± 68*
OLDL-CM	6	1 729 ± 74 <sup>△△</sup>
OVLDL-CM	6	1 789 ± 92**

CM: monocyte-derived conditioned media; <sup>△</sup>△ compared with <sup>△</sup>,  $P < 0.01$ ; \*\* compared with \*,  $P < 0.01$ ; <sup>△</sup> and \* compared with control,  $P > 0.05$ .

### 3 讨论

目前,大量的研究表明,MC 受到各种趋化因子的作用向血管内迁移,乃是 As 发生的早期重要变化之一。因此,讨论 MC 的作用机制及其影响,这对于研究 As 的发生和发展有极为重要的意义。

现已知道,PDGF 是由 2 个相关多肽链 A 链和 B 链组成,分别由 2 个不同的基因所编码。B 链是原癌基因 c-sis 的编码产物,BB 链二聚体是主要的活性物质,在 As 的发病过程中有极为重要的作用,它可促进中膜 SMC 迁入

内膜并增殖<sup>[5]</sup>。既然 OLDL 和 OVLDL 与 As 的发生发展都有着极为密度的关系,那么,OLDL 和 OVLDL 与 PDGF-B 的表达和分泌到底有何联系呢? 本文用免疫组织化学的方法证明,在人外周血 MC 中,有 PDGF-B 抗原表达,而且,OLDL 和 OVLDL 对其表达有加强作用。作者用其相对应的条件培养基作为生长因子的来源,研究了此条件培养基对 SMC 增殖活性的影响。结果显示,经 OLDL 和 OVLDL 刺激后的 MC 条件培养基,亦能明显地促进 SMC 的增殖,从而表明,OLDL 和 OVLDL 可促进 MC 分泌 PDGF-B。

本文结果提示,MC 能表达 PDGF-B, OLDL 和 OVLDL 能增强 MC 表达并分泌 PDGF-B 从而促进 SMC 增殖。因而 OLDL 和 OVLDL 可通过这一途径而在 As 发病过程中发挥重要的作用。

### 参考文献

- Zawadzki Z, Milne RW, Marcel YL, et al.  $Cu^{2+}$ -mediated oxidation of dialyzed plasma; effects on low and high density lipoprotein and cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 243~250.
- 邓仲端,邱红明,瞿智玲, et al. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. *中华病理学杂志*, 1993, **22**(3): 163.
- 王国平,邓仲端,李丽珠, et al. 平滑肌细胞源性趋化因子所致单核细胞迁移的钙依赖性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**(1): 1~5.
- Brach MA. Effect of antiinflammatory agents on synthesis of MCP-1/JE transcripts by human blood monocytes. *Mol Pharmacol*, 1992, **42**: 63~68.
- Ross R, Masuda J, Raines EW, et al. Location of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherosclerosis. *Science*, 1990, **248**: 1 009~12.

(本文 1995-03-11 收到,1995-08-10 修回)