

巨噬细胞在泡沫细胞化过程中的 Ca^{2+} 变化

谭健苗 杨小毅 杨永宗

(衡阳医学院心血管病研究所 衡阳 421001)

The Change of Intracellular Calcium in the Course of Macrophage-derived Foam Cell Formation

TAN Jian-Miao, YANG Xiao-Yi and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Previous study proved that it generated an in vitro model of macrophage-derived foam cell, namely, the characteristic pathological cell in the early atherosclerotic lesion to incubate $\text{C}_{57}\text{BL}/6\text{J}$ mouse peritoneal macrophages with $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ oxidized low density lipoprotein for 4 days. With the Ca^{2+} fluorescent indicator technique and NADH-oxidizing-coupling-spectrum-analysis method, we determined the intracellular Ca^{2+} -ATPase of the above cultured foam-like cell. The results indicated that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level was 2.7 times higher than that of control group cells, and the activity of Ca^{2+} -ATPase was 24% of that of the later cells. This supported that macrophage-derived foam cell formation is connected with the slow Ca^{2+} entry or release, which possibly derived from long-lasting openings of membranous Ca^{2+} channels and the inactivating of Ca^{2+} -ATPase at the late stage.

KEY WORDS Macrophage; Foam cell; Ca^{2+} ; Ca^{2+} -ATPase; Formative mechanism

摘要 本室曾用 $\text{C}_{57}\text{BL}/6\text{J}$ 品系小鼠腹膜巨噬细胞与 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化低密度脂蛋白孵育 4 天,建立了出现在早期动脉粥样硬化损伤中的巨噬细胞源性泡沫细胞的病理细胞模型。本文报道应用 Ca^{2+} 荧光指示剂技术及 NADH 氧化偶联差光谱变化的分析方法,检测了

前述培养的泡沫样细胞的胞浆 Ca^{2+} 水平及膜上 Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶活性。发现泡沫样细胞内的 Ca^{2+} 水平为对照组细胞的 2.7 倍,膜上 Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶活性为后者的 24%。实验结果提示,在巨噬细胞源性泡沫细胞的形成过程中,伴随着缓慢的 Ca^{2+} 内流或释放,这可能与膜上 Ca^{2+} 通道的持续开放及后期 Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶的钝化有关。

关键词 巨噬细胞; 泡沫细胞; Ca^{2+} ; Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶;

在正常情况下,细胞内 Ca^{2+} 水平约为 $0.1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于细胞外(约为 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或肌质网 Ca^{2+} 库($10^2 \sim 10^3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。 Ca^{2+} 的内流或释放参与着重要的生理性或病理性活动,特别是作为细胞内的第二信使,在特定的跨膜信息转导过程中担负着无可替代的作用。

本实验室曾选用动脉粥样硬化敏感株 $\text{C}_{57}\text{BL}/6\text{J}$ 小鼠腹膜巨噬细胞置于 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化低密度脂蛋白中培养 4 天,可使胞浆内脂质特别是总胆固醇增多,胆固醇酯含量大于总胆固醇的 50%,出现脂质颗粒,形成巨噬细胞源性泡沫细胞模型^[1]。本实验在巨噬细胞源性泡沫细胞模型上,用 Ca^{2+} 荧光指示剂 Indo-1 检测其细胞内 Ca^{2+} 水平,并根据 NADH 氧化偶联差光谱变化来检测膜成分的 Ca^{2+} -ATP 酶活性,从而阐述巨噬细胞在泡沫细胞化过程中的 Ca^{2+} 变化规律及其调节机制。

1 材料与方法

实验所用试剂除注明者外,均为国产分析纯,符合实验要求。

1.1 低密度脂蛋白的制备、鉴定和定量分析

未加抗凝剂的新鲜全血采自 A 型血型的健康成人,由血站提供。取新鲜全血 200 ml,室温下静止 1 h,

弃血凝块,以 4°C 、 $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 获血清 120 ml, 加入 NaN_3 24 mg、 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 0.6 ml 防腐和防氧化。血清在 Hitachi 80P-7 型全自动制备性超速离心机上作序列超速离心。以密度 1.019 、 4°C 、 $30\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 18 h, 吸出上薄层乳白色液体(极低密度脂蛋白)及次层淡黄色液体(中间密度脂蛋白); 以密度 1.063 、 4°C 、 $40\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 24 h, 吸出上层黄色液体(低密度脂蛋白), 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为同一区带。低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在 4°C 、含 EDTA 的 PBS 中透析 72 h, 过滤除菌, 4°C 保存。用总胆固醇试剂盒(北京中生公司)测得 LDL 的胆固醇含量为 $3.41\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 Lowry 方法^[2]测得 LDL 的蛋白质含量为 $5.76\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, LDL 的定量分析结果用蛋白质含量表示。

1.2 低密度脂蛋白的修饰及修饰程度鉴定

低密度脂蛋白在 37°C 、含 $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的 PBS 中氧化 12 h, 然后在 4°C 、含 EDTA 的 PBS 中透析, 每 8 h 换液一次, 透析 24 h。

用硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)的含量来鉴定 LDL 的修饰程度。样品或丙二醛标准品 0.1 ml 加入到 2.9 ml 的复合液中(复合液含 $0.92\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCl_3COOH , $26\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, $0.25\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl), 100°C 水浴中放置 30 min, 冷却后测定 532 nm OD 值得 TBARS 含量。总胆固醇的定量分析根据 CHOD-PAP 方法^[3], 用总胆固醇试剂盒(北京中生公司)测得。LDL 的修饰程度以每克胆固醇的 TBARS 含量来表示, LDL 为 $1.3\text{ }\mu\text{mol}$, 氧化低密度脂蛋白(oxidized LDL, OLDL)为 $18.4\text{ }\mu\text{mol}$ 。

1.3 巨噬细胞的收集和培养

参考 Genevieve R 等^[4]的方法收集巨噬细胞。取 $\text{C}_{57}\text{BL}/6\text{J}$ 小鼠 30 只(雄性, 10 周龄, 体重 $22.8 \pm 2.4\text{ g}$, 中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供), 腹腔注射 2 ml 无血清培养基 RPMI1640(Flow Laboratories, Irvine, Scotland), 4 天后注射 4 ml 的 RPMI1640 收集腹膜巨噬细胞, 以 $10^5 \cdot \text{L}^{-1}$ 密度种植在培养瓶中, 每瓶 2 ml , 在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱(Cole-Parmer 产品)中培养 12 h, 弃培养液, 以 PBS 洗出少量的其它细胞, 重复 3 次, 分别加入空白对照培养液(含 10% 胎牛血清的 RPMI1640, 胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所)、 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LDL 或 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL 4 ml , 继续培养 96 h。

1.4 细胞内 Ca^{2+} 水平的测定

用 Ca^{2+} 荧光指示剂法^[5-9]在 Hitachi F-4010 型荧

光分光光度计上测定。以 $1\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的导入液终浓度将 Indo-1 乙酰甲酯(Sigma 产品)导入细胞, 37°C 继续孵育 1 h, 弃培养液, 用 PBS 洗 3 次, 细胞悬解在 1 ml 的 PBS 中。吸取样品 0.1 ml 加入到 0.6 ml 的 PBS 中, 以 355 nm 为激发波长, 485 nm 为发射波长, A_{23187} ($2\text{ }\mu\text{l}$, Sigma 产品)为 Ca^{2+} 载体(calcium ionophore), Mn-Cl_2 ($10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50\text{ }\mu\text{l}$)为荧光淬灭剂, 在荧光分光光度计上测定指示剂的初始荧光强度 F 、加入 A_{23187} 后的最大荧光强度 F_{max} 、加入 Mn^{2+} 后绝大部分细胞内荧光淬灭后的荧光强度 F_{min} 。根据 Indo-1 的解离常数 K_d , 可由下式计算出细胞内 Ca^{2+} 浓度:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

1.5 膜成分 Ca^{2+} -ATP 酶的活性分析

收集细胞, 以 $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃培养液, 用 PBS 冲洗 1 次, 加入 1 ml 的超声破碎缓冲液($50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Dithiothreitol, pH 8.0)在冰浴中, JY5881 型超声波粉碎仪(宁波精密仪器二厂)上超声破碎 5 秒/次 $\times 10$ 次, 在 Beckman TL-100 型超速离心机上以 4°C 、 $20\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃上清收集膜成分, 加入 PBS $100\text{ }\mu\text{l}$, 吹打混匀制成样品。

膜成分的 Ca^{2+} -ATP 酶活性分析参照中国科学院生物物理研究所的方法, 通过偶联酶反应连续检测 NADH 因氧化而在 366 nm 和 550 nm 波长处的差光谱变化, 在 Hitachi 557 型紫外分光光度计上测定 Ca^{2+} -ATP 酶的水解活力。测定体系含 $40\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES(美国 DNN 公司), $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 , $1.01\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA(美国 ICN 公司), $2.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP(瑞士 Fluka 公司), $0.42\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PEP(磷酸烯醇式丙酮酸环己胺盐, 北京中生公司), pH 7.2, $0.15\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH(英国 BDH 公司, 用前加入)。在 2.4 ml 测定体系中, 加入 $5\text{ }\mu\text{l}$ 丙酮酸激酶(北京中生公司), $15\text{ }\mu\text{l}$ 乳酸脱氢酶(北京中生公司), 样品 $50\text{ }\mu\text{l}$, 30°C 保温 5 min, 加入 $25\text{ }\mu\text{l}$ 的 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 启动反应, 在紫外分光光度计上描记差光谱($366 \sim 550\text{ nm}$)的变化。用 Lowry 法^[2]定量测定细胞蛋白质。 Ca^{2+} -ATP 酶活力用每分钟每克细胞蛋白质所含的酶偶联 NADH 反应的总量来表示, 可由下式获得:

$$A = \frac{\Delta L \cdot N \cdot P}{L \cdot T}$$

式中, A : 酶活力; ΔL : 纵轴变化值; L : 纵轴初始值; N : NADH 总量; T : 描记时间; P : 蛋白质含量。

2 结果

2.1 细胞内 Ca^{2+} 水平的测定

测定细胞内 Ca^{2+} 水平的原始记录如 Figure 1 所示(已缩小 0.5)。在荧光分光光度计上描记的荧光强度变化曲线可大致反映细胞内 Ca^{2+} 的相对量,即 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与 $F-F_{\min}$ 呈正向关系,与 $F_{\max}-F$ 呈反向关系。由曲线可知,细胞内 Ca^{2+} 浓度是:对照组 < LDL 组 < OLDL 组。

根据 Indo-1 的解离常数(为 224)计算出细胞内 Ca^{2+} 浓度见 Figure 2(为两次实验的平均值)。

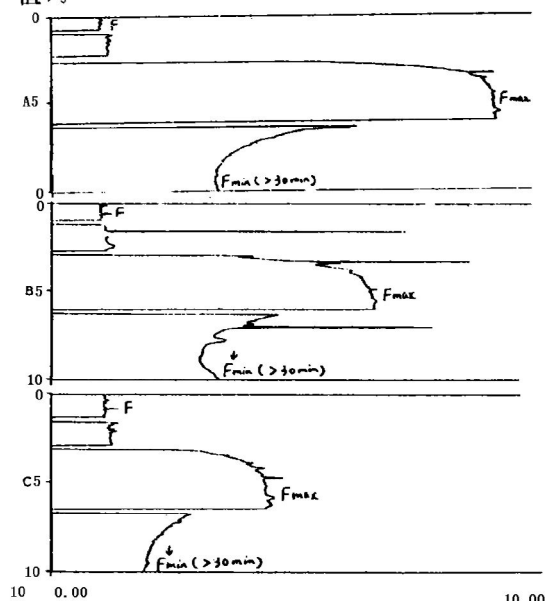


Figure 1. Detected curves for measuring intracellular calcium. A, B or C represents the group cells derived from C₅₇BL/6J mouse peritoneal macrophages incubated with control medium, 10 mg · L⁻¹ low density lipoprotein or 10 mg · L⁻¹ oxidized low density lipoprotein, respectively. The Ca^{2+} fluorescent indicator Indo-1 was used to measure the intracellular Ca^{2+} level. EX wavelength 355 nm, EX bandpass 5 nm; EM wavelength 485 nm, EM bandpass 5 nm; response 2 sec, for more details see the contexts.

2.2 膜成分 Ca^{2+} -ATP 酶的活性分析

膜成分 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定的原始记录见 Figure 3。在 Figure 3 中, Ca^{2+} -ATP 酶活性可由记录纸上描记的差光谱变化曲线反应出来,曲线的斜率粗略地显示了细胞膜上 Ca^{2+} -ATP 酶活性的相对大小,可见 LDL 组 > 对照组 > OLDL 组。

进一步作定量分析,计算得到的每分钟每克细胞蛋白质中的 Ca^{2+} -ATP 酶偶联 NADH 反应的总量见 Figure 4(结果为两次实验的平均值)。

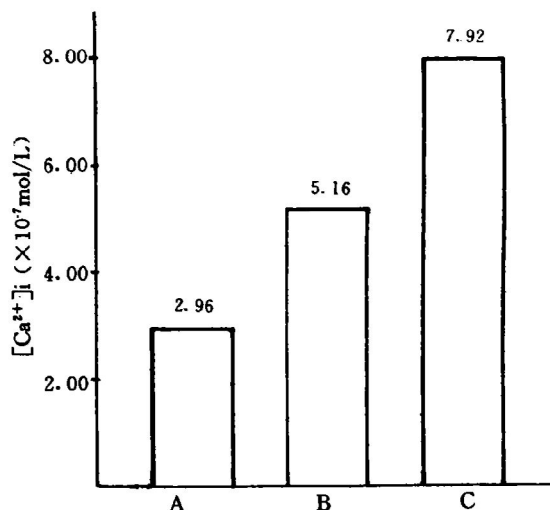


Figure 2. Intracellular calcium in different group of cells. A, B or C represents the same group cells as figure 1. $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d(F-F_{\min})/(F_{\max}-F)$. According to the above formula we can acquire the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ value resulting from the detected curves in figure 1. Each was the mean value of two calculated results.

3 讨论

有资料表明^[10~12], Ca^{2+} 拮抗剂能阻止动脉粥样硬化的发生,能延缓早期和新近动脉粥样硬化斑块的产生, Ca^{2+} 可能参与泡沫细胞的形成过程^[13]。我们应用近年来在细胞生物学领域内发展起来而广泛应用的 Ca^{2+} 荧光指示剂技术,用指示剂 Indo-1 测定了实验中各组细胞的细胞内 Ca^{2+} 水平。结果显示氧化低密度脂蛋白作用于 C₅₇BL/6J 小鼠腹膜巨噬细胞一定时间后,能使细胞内 Ca^{2+} 水平增高,作用 4 天后的泡沫样病理细胞的 Ca^{2+} 约为对照组巨噬细胞的 2.7 倍。结果说明,在巨噬细胞源性泡沫细胞的形成过程中伴随有细胞外 Ca^{2+} 的缓慢内流或肌质网 Ca^{2+} 库中 Ca^{2+} 的缓慢释放,从而在定量分析方面证实了 Ca^{2+} 在动脉粥样硬化中的变化。

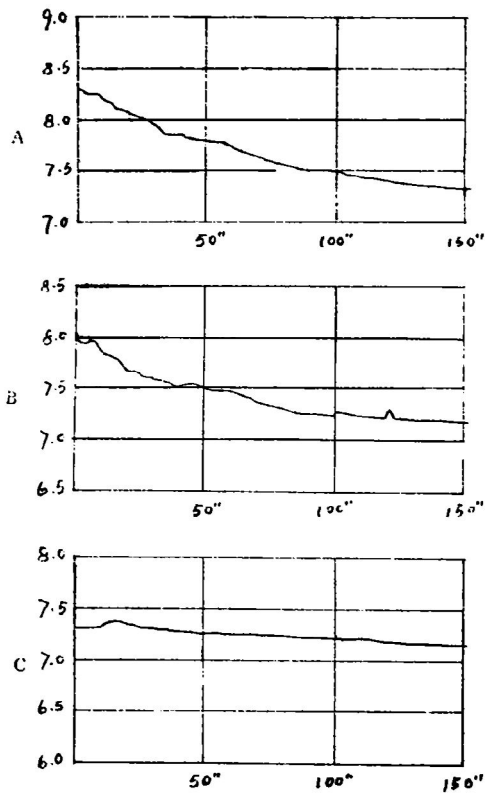


Figure 3. Detected curves for measuring the activities of Ca^{2+} -ATPase. A, B or C represents the group cells derived from C57BL/6J mouse peritoneal macrophage incubated with control medium, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ low density lipoprotein or $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ oxidized low density lipoprotein, respectively. For more details see the contexts.

细胞内 Ca^{2+} 水平的增高作为跨膜信息转导过程中的环节,对于巨噬细胞在 OLDL 环境中的转归及后期效应,可能具有重要的生理性或病理性意义。一方面,细胞内 Ca^{2+} 的增高能启动和强化巨噬细胞的生理功能,加速巨噬细胞对 OLDL 的摄取、吞噬和凋亡^[14]过程,有利于消除局部血管壁中的氧化性脂蛋白和病理性泡沫细胞,在动脉粥样硬化损伤的前期有着一定的防御性和保护性意义。另一方面,巨噬细胞大量吞噬 OLDL 促进脂质特别是胆固醇酯的沉积,巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,泡沫细胞的裂解坏死和动脉粥样硬化损伤中基质成分的产生^[15],导致动脉粥样硬化斑块病变的形成。

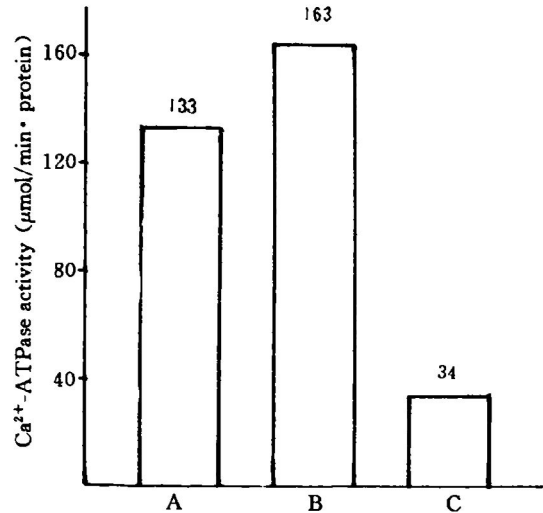


Figure 4. Activities of Ca^{2+} -ATPase in different group cells. A, B or C represents the same group as figure 3 and the calculated values also resulted from the curves in figure 3. Each was the mean value of two calculated results.

巨噬细胞在 OLDL 的作用下细胞内 Ca^{2+} 增高的机制尚未阐明。已经知道,与 OLDL 相关的膜受体有清道夫受体、FC 受体、 CD_{36} 受体等^[16~20],OLDL 与不同的受体或不同的受体位点结合后,由水相途径介导引起 2 型 Ca^{2+} 通道^[21]中一些功能性巯基的氧化和结构改变,从而打开慢 Ca^{2+} 通道,促进 Ca^{2+} 朝向胞浆的持续性内流。肌质网中的 Ca^{2+} 释放可能具有类似的机制。在巨噬细胞源性泡沫细胞形成早期,细胞内 Ca^{2+} 的增高过程中可能起着决定性影响。

另一方面,细胞主动转运 Ca^{2+} 的过程,也影响着胞浆内 Ca^{2+} 水平。在正常情况下,随着细胞生理活动的结束, Ca^{2+} 被泵至细胞外或肌质网内,胞浆内 Ca^{2+} 恢复到正常水平。但在我们的实验中,泡沫样细胞的 Ca^{2+} -ATP 酶活性仅及对照组巨噬细胞的 24%,显示泡沫细胞的病理功能变化。膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性的降低,可能与泡沫细胞的崩解坏死和动脉粥样硬化损伤中基质成分的产生等病理过程有关^[15]。在巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程的后期,膜 Ca^{2+} -ATP 酶的钝化、 Ca^{2+} 泵功能的下降可能是细胞内 Ca^{2+} 持续增高的主要原因。

值得注意的是,与 LDL 孵育的巨噬细胞测

得的 Ca^{2+} -ATP 酶活性(每克细胞蛋白 163 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$),并不少于对照组细胞(每克细胞蛋白 133 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$),可能还有一定程度的增高,造成这种差别的机理不清,可能是由于 LDL 通过 B/F 受体入胞,相对于 OLDL 通过清道夫受体入胞来说,这一活动在量的方面是有限的,难以启动巨噬细胞的泡沫细胞化反应过程。

综上所述,在巨噬细胞源性泡沫细胞的形成过程中伴随有缓慢的 Ca^{2+} 内流或释放,其机制可能与初期膜上 Ca^{2+} 通道持续开放和后期 Ca^{2+} -ATP 酶的钝化有关。

参考文献

- 1 杨永宗,谭健苗,杨小毅.动脉粥样硬化敏感小鼠腹膜巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立.中国动脉硬化杂志,1994,2(4):197~201.
- 2 Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1963, **193**: 265~270
- 3 Diaoe MS, et al. Translocation of both lysosomal LDL-derived cholesterol and plasma membrane cholesterol to the endoplasmic reticulum for esterification may require common cellular factors involved in cholesterol engross from the acidic compartments (lysosomes/endosomes). *Biochim et Biophys Acta "Lipids & Lipid Metab"* 1995, **1** 254(3): 283~294.
- 4 Genevieve R, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice, modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscl Thromb*, 1993, **13**: 10~20.
- 5 Richard N. A practical guide to the study of calcium in living cells. In press by Academic Press Inc. 1994, 155~181.
- 6 Wahl M, et al. Intracellular Ca^{2+} measurement with Indo-1 in substrate-attached cells; Advantages and special conditions. *Cell Calcium*, 1990, **11**: 487~490.
- 7 Richard PH. Handbook of fluorescent probes and research chemicals, molecular probes. In press by Molecular Probes Inc. 1992, 113~128.
- 8 Hallett MB, et al. Direct measurement of intracellular free Ca^{2+} in rat peritoneal macrophages: Correlation with oxygen-radical production. *Immunology*, 1983, **50**: 487~495.
- 9 Grzegorz G, et al. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260**(6):3 440~50.
- 10 Heinrich H, et al. Anti-atherosclerotic effects of calcium antagonists. *J Hypert*, 1993, **11**(Suppl 1): 55~59.
- 11 Bond MG, et al. Antiatherogenic properties of calcium antagonists. *J Cardio Pharmacol*, 1991, **1**(Suppl. 4):87~93.
- 12 Fleckenstein GG, et al. Calcium-a neglected key factor in arteriosclerosis. The pathogenetic role of arterial calcium overload and its prevention by calcium antagonists. *Ann Intern Med*, 1991, **23**: 589~599.
- 13 Sachinidis A, et al. Low density lipoprotein elevates intracellular calcium and PH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts without mediation of LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **167**: 353~359.
- 14 Isabells EB. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Res Commun*, 1994, **8**:1 075~80.
- 15 Ball RY, et al. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 1995, **114**(1):45~54.
- 16 Steinbrecher UP, et al. Scavenger-receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima. *Arterioscl Thromb*, 1992, **12**: 608~611.
- 17 Andrew CV, et al. Oxidized LDL binds to CD_{36} on human monocytederived macrophages and transfected cell lines; evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscl Thromb and Vasc Biol*, 1995, **15**(2):269~275.
- 18 Stanton LW. A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1992, **267**:22 446.
- 19 Endemann G, et al. CD_{36} is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 11 811.
- 20 Marc S, et al. Oxidized lipoprotein, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1994, **108**(Suppl): 21~29.
- 21 Nipavan C, et al. Functional consequences of sulfhydryl modification in the pore-forming subunits of cardiovascular Ca^{2+} and Na^{+} channels. *Circ Res*, 1995, **76**(3):325~334.

(本文 1995-07-31 收到)