

动脉粥样硬化敏感小鼠 C₅₇BL/6J 腹膜巨

噬细胞源性泡沫细胞模型的建立

杨永宗 谭健苗 杨小毅

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Founding of a Model of Macrophage — derived Foam Cell from Peritoneum in C₅₇BL/6J Mouse which Is Susceptible to Atherosclerosis

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

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

ABSTRACT In this study, a typical model of macrophages -derived foam cell was founded by peritoneal macrophage of C₅₇BL/6J mouse, which is susceptible to atherosclerosis, incubated with 10 mg · L⁻¹ oxidized low density lipoprotein. Comparing with macrophages of Swiss strain mouse, these results showed the cultured foam cell-derived from C₅₇BL/6J mouse macrophages continued a large of lipid particles and intracellular total cholesterol increased in the cells, in which cholesteryl ester occupied more than 50% of total cholesterol. It corresponded to the typical characteristics of foam cells. This model supplied a reliable pathological cell tool for the study of atherosclerosis.

KEY WORDS Low density lipoprotein; Macrophages; Foam cell; Atherosclerosis; C₅₇BL/6J mouse

摘要 泡沫细胞的出现是动脉粥样硬化斑块中有特征性的病理形态改变。本实验选择对动脉粥样硬化形成较敏感的纯系小鼠 C₅₇BL/6J, 取其腹膜巨噬细胞与 10 mg · L⁻¹ 氧化低密度脂蛋白共同孵育 96 h, 建立了典型的巨噬细胞源性泡沫细胞模型。实验结果显示,

培养的泡沫样细胞与在无脂蛋白培养基中培养的 C₅₇BL/6J 小鼠巨噬细胞和在氧化低密度脂蛋白中培养的昆明种小鼠巨噬细胞比较, 脂质成分大量增多, 出现脂质颗粒, 细胞内总胆固醇增加, 其中胆固醇酯含量大于游离胆固醇, 符合泡沫细胞的定义。本实验从离体细胞培养方面探索建立小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞的可能性, 为动脉粥样硬化的形成机理分析和防治研究提供了一种可靠的病理细胞模型。

关键词 低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 泡沫细胞模型; 动脉粥样硬化; C₅₇BL/6J 小鼠

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成与多种因素有关, 如血脂、血液凝固和纤维蛋白溶解系统、动脉壁细胞、癌基因、细胞因子和生长因子等。其中单核-巨噬细胞在动脉粥样硬化形成过程中的作用更为突出, 单核细胞的附壁与向巨噬细胞的转化、对低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的修饰、细胞的迁移和对氧化 LDL 的摄取、吞噬和泡沫化, 以及斑块基质成份的产生等^[1], 都有赖于单核-巨噬细胞的直接参与和作用。

巨噬细胞源性泡沫细胞是早期 As 损伤的特征病理细胞, 是最早出现的细胞成分之一。其生物学特征有二: 一是胞浆内脂质成分增多, 并聚集成滴, 苏木素伊红染色镜下可见胞浆呈泡沫样改变; 二是细胞内胆固醇含量增多, 其中胆固醇酯占一半以上。根据上述生物学特征, 就可确认粥样硬化斑块中的泡沫细胞。

离体泡沫细胞的建立, 有助于 As 形成机理的深入研究。本文将 C₅₇BL/6J 品系小鼠腹膜巨噬细胞, 置于氧化低密度脂蛋白中离体培养, 使其成为巨噬细胞源性泡沫细胞, 为动脉粥样硬

化进一步研究提供细胞模型。

1 材料与amp;方法

本文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

不抗凝的新鲜全血来自 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 ℃、4 000 r · min⁻¹ 离心 30 min,获血清 120 ml,加入 NaN₃ 24 mg、100 mg · L⁻¹ EDTA 0.6 ml 防腐、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 ℃、30 000 r · min⁻¹ 离心 18 h,吸出上层乳白色液体即极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)及次层淡黄色液体(中间密度脂蛋白);以密度 1.063、4 ℃、40 000 r · min⁻¹ 离心 24 h,吸出上层黄色液体(LDL),经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为同一区带。LDL 在 4 ℃、含 10 mg · L⁻¹ EDTA 的 PBS 中透析 72 h,过滤除菌,4 ℃ 保存。LDL 的定量分析按 Lowry 方法^[2],在 Shimadzu UV-120-02 型分光光度计上测 700 nm OD 值获得。

1.2 LDL 的氧化修饰及修饰程度鉴定

LDL 在 37 ℃、含 10 μmol · L⁻¹ CuSO₄ 的 PBS 中氧化 12 h,然后在 4 ℃、含 100 mg · L⁻¹ 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 mol/L CCl₃COOH, 0.026 mol/L C₄H₄N₂O₂S, 0.25 mol/L HCl),100 ℃ 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,用总胆固醇试剂盒(北京中生公司)测得。LDL 的氧化修饰程度以每克胆固醇的 TBARS 含量来表示,LDL 为 1.3 μmol · g⁻¹,氧化型 LDL(oxidized LDL, OLDL)为 18.4 μmol · g⁻¹。

1.3 巨噬细胞的收集和培养

参考 Leonard K 等^[3]的方法收集巨噬细胞。取 C₅₇BL/6J 小鼠 30 只和昆明小鼠 10 只(雄性,10 周龄,体重 23.9 ± 2.5 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 RPMI 1640 (Folw Laboratories, Irvine, Scotland),4 天后注射 4 ml 的 RPMI1640 收集腹膜巨噬细胞,以 10⁹/L 密度种植在培养瓶中,每瓶 2 ml,在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱(Cole-Parmer 产品)中培养 12 h,弃培养液,PBS 冲洗

掉未贴壁细胞组分,重复 3 次。分别加入空白对照培养液(含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640,胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所),含 10 mg · L⁻¹ LDL 或 10 mg · L⁻¹ OLDL 培养液 4 ml,继续培养 96 h。

1.4 细胞的形态学观察

将贴壁在盖玻璃片上的上述细胞取出,以 PBS 冲洗 3 次,放在 4 ℃、10% 甲醛中固定 24 h,用油红 O 方法染色;水洗 5 min → 60% 异丙醇中放置 5 min → 新过滤的油红 O 染色 10 min(储备液含 0.5% 油红 O,98% 异丙醇。用前以 40% 水稀释,24 h 后过滤) → 60% 异丙醇分化 5 min → 水洗 5 min → Mayer 氏苏木精明矾染液染色 5 min(染液含 0.1% 苏木精,0.025 碘化钠,5% 钾矾,5% 水合氯乙醛,0.1% 枸橼酸) → 水洗 30 min → 干燥封片。在 Nikon Microphot-FXA 型倒置显微镜下观察,以 10 × 100 倍作彩色照相。

1.5 细胞内胆固醇的定量分析

用 0.25% 胰酶(Koch-Light Laboratories, Coinbrook Bucks, England)消化 1 min,收集细胞,以 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,用 PBS 冲洗 1 次,加入异丙醇 0.5 ml,在 CQ250 超声波清洗器(上海超声波仪器厂)上震动 10 秒/次 × 3 次,以 1 000 r · min⁻¹ 离心 15 min。吸上清用总胆固醇试剂盒及游离胆固醇试剂盒(北京中生公司)分别测定总胆固醇(total cholesterol, TC)及游离胆固醇(free cholesterol, FC),离心沉淀物用 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 0.5 ml 裂解细胞,用 Lowry 方法测得细胞蛋白质含量。细胞内胆固醇含量用每克细胞蛋白质所含的总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯来表示,胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)含量由总胆固醇和游离胆固醇的差值得。

2 结果

2.1 细胞的形态学观察

用油红 O 方法染色,镜下可见实验组细胞与对照组细胞有明显的区别。未经低密度脂蛋白作用的巨噬细胞染色较淡,胞浆中未见明显的脂质颗粒。与 10 mg · L⁻¹ LDL 或 OLDL 孵育 96 h 的巨噬细胞,经油红 O 染色后均显色较深。以 OLDL 组细胞红染颜色最明显。在 OLDL 组细胞中,还可见到染成红色的脂质颗粒(Figure 1)。

2.2 细胞内胆固醇的定量分析

用无脂蛋白 RPMI1640 为对照培养组(A

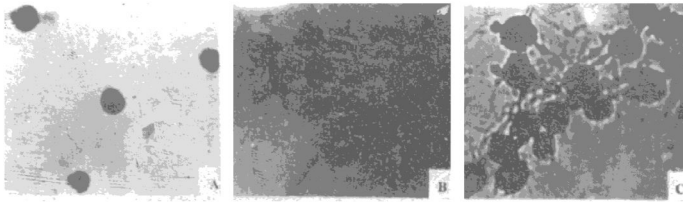


Figure 1. Morphological observation of the three groups of cells with red oil O staining technique. A, B or C displays the morphological manifestation of cells incubated with control medium, 10 mg · L⁻¹ LDL or 10 mg · L⁻¹ oxidized LDL for 96 hours, respectively. With respect to OLDL group, cells were the most remarkably stained and some red-stained lipid particles were also shown, which were comparatively different from the control or LDL group cells.

组), 用昆明种小鼠腹膜巨噬细胞为对照细胞 (D组), 实验结果显示 C₅₇BL/6J 小鼠腹膜巨噬细胞在 10 mg · L⁻¹ OLDL 中孵育 4 天后, 细胞内胆固醇含量大幅度增加, 胆固醇酯在总胆固醇中的比例也明显增大 (Figure 2 and Table)。

Table. Contents of intracellular cholesterol (mg · g⁻¹ protein).

Groups	TC	FC	CE
* A	25.3 ± 2.7	18.1 ± 1.4	7.2 ± 0.9
B	46.1 ± 3.9	28.4 ± 3.2	17.7 ± 2.1
* C	77.6 ± 8.3	36.4 ± 4.0	41.2 ± 4.3
D	48.9 ± 5.2	32.4 ± 3.2	16.5 ± 1.7

This table shows the amounts of intracellular total cholesterol, free cholesterol and cholesteryl esters in this study. A, B, C or D represents the group cells derived from C₅₇BL/6J mouse peritoneal macrophages incubated with control medium, 10 mg · L⁻¹ LDL, 10 mg · L⁻¹ OLDL or the group cells derived from Swiss strain mouse peritoneal macrophages incubated with 10 mg · L⁻¹ OLDL, respectively. With respect to OLDL group cells, the results indicated that the intracellular cholesterol increased apparently comparing to the other group cells. The paired student's *t*-test was used to compare the group of control and OLDL (*), and the statistical result reveals (*P* < 0.05, *n* = 5).

3 讨论

建立小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞模型, 无论从动物的来源和实验材料的选择方面均有可取之处。但在众多的小鼠品系中, 只有少数品系

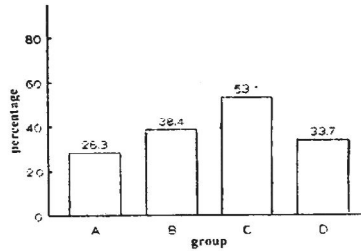


Figure 2. Percentages of intracellular cholesteryl esters within total cholesterol. The four groups were: A, C₅₇BL/6J mouse macrophages in control medium; B, C₅₇BL/6J mouse macrophages in 10 mg · L⁻¹ LDL; C, C₅₇BL/6J mouse macrophages in 10 mg · L⁻¹ OLDL; D, Swiss strain mouse macrophages in 10 mg · L⁻¹ OLDL; From the above figure we can see that the OLDL group cells contained a number of intracellular cholesteryl esters, which occupied more than 50% of total cholesterol.

在一定条件下能形成特征性 As 斑块^[4-6], 其中 C₅₇BL/6J 是病变形最快, 病变特征最典型的敏感株。给 C₅₇BL/6J 喂饲高脂饮食 10~20 周, 在主动脉窦部位就可发现典型的 As 斑块。动物对 As 的易感性由遗传因素决定, 受 Ath-1^[7]、Ath-2^[8]、Ath-3^[9] 等基因的直接调控。其它因素如高密度脂蛋白的水平、低密度脂蛋白的修饰性、细胞因子和生长因子等也有影响。本实验中, 我们选用昆明种小鼠腹膜巨噬细胞与 C₅₇BL/6J 小鼠相应细胞比较, 实验结果提示后者

具有更强的脂蛋白摄取吞噬功能及胆固醇的酯化堆积特性,在氧化低密度脂蛋白环境中更具向泡沫细胞转变的倾向,说明遗传因素在决定As易感性中的重要性。

巨噬细胞与脂蛋白相互作用是一个多环节的过程。一方面,巨噬细胞能对LDL起修饰作用。巨噬细胞通过细胞内多种酶(如脂氧化酶)和活性氧(如超氧负离子)作用于LDL而产生一定程度的氧化修饰。本文实验中LDL组细胞与无LDL对照组细胞比较,胞浆红染明显,细胞内总胆固醇及胆固醇酯含量均相应增高,其机理在于巨噬细胞通过膜B/E受体摄取LDL,特别是大量吞噬已被自身细胞和金属离子修饰的LDL,表现出一定程度的泡沫细胞化倾向。

另一方面,巨噬细胞通过清道夫受体,可能还有Fc受体、CD₃₆受体或其它受体的作用,对OLDL的大量吞噬促成了巨噬细胞源性泡沫细胞的形成^[10~13]。OLDL与不同的受体或不同的受体位点结合,经由一定的跨膜信息转导途径,通过细胞内第二信使(如cAMP, cGMP, Ca²⁺, IP₃或DAG等)的作用,引起包含有氧化脂蛋白—清道夫受体复合物的包裹性囊泡的形成和入泡,并转运给溶酶体。溶酶体中的酸性环境诱使配体受体复合物解离,OLDL中的胆固醇酯被分解为游离胆固醇和脂肪酸。胆固醇的增多可活化内质网与细胞膜上的乙酰辅酶A、胆固醇酰基转移酶,加速游离胆固醇的酯化和细胞内胆固醇的堆积,加上细胞对胆固醇排出能力的相对减弱,于是逐渐形成特征性的巨噬细胞源性泡沫细胞。

本实验用动脉粥样硬化易感品系C₅₇BL/6J小鼠的腹膜巨噬细胞与10 mg·L⁻¹ OLDL孵育4天,建立了巨噬细胞源性泡沫细胞模型。该模型细胞内脂质特别是总胆固醇含量增加,其中胆固醇酯含量占总胆固醇的一半以上,胞浆内可以见到脂质颗粒,符合泡沫细胞的形态学和细胞学定义。实验在离体水平上重建了动脉粥样硬化损伤中的一种病理细胞模型,为泡沫细胞和斑块形成机理分析以及动脉粥样硬化防治研究提供一个新的途径。

参考文献

- 1 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.
- 2 Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193; 265~270.
- 3 Leonard K, et al. Apolipoprotein A I-mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophages. *Arterioscl Thromb and Vasc Biol*, 1995, 15(2): 276~289.
- 4 Beverly P, et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*, 1985, 57: 65~73.
- 5 Stewasrt P J L, et al. Genetically determined susceptibility and resistance to diet-induced atherosclerosis in inbred strains of mice. *J Lab Clin Med*, 1988, 12: 36~42.
- 6 Genvieve R, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid prevent the development of atherosclerotic lesions in mice modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscl Thromb*, 1993, 13(10): 1~10.
- 7 Paigen B, et al. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density liprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 3 763~67.
- 8 Paigen B, et al. Ath-2, a second gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Genetics*, 1989, 122: 163~168.
- 9 Stewart-Phillips JL, et al. Ath-3, a new gene for susceptibility to atherosclerosis in mice. *Clin Invest Med*, 1989, 12: 121~126.
- 10 Diane 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 egress from the acidic compartments (lysosomes /endosomes). *Biochem Biophys Acta. Lipids & Lipid Metab*, 1995, 1 254(3): 283~294.
- 11 Mander EL, et al. Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages. In Press by Biochem. et Biophys Acta 1994.
- 12 Jessup W, et al. The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages. *Biochem Biophys Acta*, 1992, 1 126: 167~171.
- 13 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.

(本文 1994-09-26 收到)