

氧化型低密度脂蛋白介导单核细胞与血管内皮细胞粘附的单细胞定量研究

周向东

黄 勇

(第三军医大学大坪医院内科教研室, 重庆 630042)

Monocellular Quantitative Study on the Adhesion of Monocyte-Vascular Endothelial Cell Mediated by Oxidized Low Density Lipoprotein

ZHOU Xiang-Dong and HUANG Yong

(Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042, China)

ABSTRACT The ability of human monocyte (MC) to interact with human umbilical vein endothelial cell (VEC) mediated by oxidized low density lipoprotein (OLDL) was determined by the use of a micromanipulation technique. The ability of polymorphonuclear neutrophil (PMN) was observed at same condition to show the speciality of OLDL's effect. The results showed that treatment of VEC with OLDL caused a significant increase in critical separation stress (Sc) MC-VEC. In contrast, Sc of PMN-VEC was not increased. Treatment of MC and PMN with OLDL caused a rapid increase in Sc of MC-VEC and PMN-VEC, the Sc was maximal within 1 hour of exposure to OLDL and decreased in 24 hours. The results suggest that OLDL can enhance MC-VEC interaction specially, this effect indicate that OLDL is important factor for the binding of MC to VEC and the entry of MC into the vessel wall in atherosclerotic lesion.

KEY WORDS Atherosclerosis; Lipoprotein, low density; Cell adhesion; Monocyte

摘要 利用细胞微管吸吮技术对单核细胞与血管内皮细胞间的粘附力行单细胞定量测量,以两种细胞间的临界分离应力 Sc 来表示细胞的粘附性。观察氧化型

低密度脂蛋白对单核细胞与培养人脐静脉内皮细胞粘附的影响。结果显示:氧化型低密度脂蛋白可使内皮细胞对正常单核细胞的粘附性明显增大,其发生较缓慢,4 h 达峰值并维持至 24 h 以后。经氧化型低密度脂蛋白处理的内皮细胞对中性粒细胞的粘附性无明显提高。单核细胞和中性粒细胞经氧化型低密度脂蛋白处理后,对内皮细胞的粘附性均有迅速提高,1 h 达峰值,24 h 内逐渐减弱。实验结果提示氧化型低密度脂蛋白可选择性地提高单核细胞与内皮细胞相互粘附性,这种选择性的促粘附作用进一步证明它在动脉粥样硬化发生、发展中起重要作用。

关键词 动脉粥样硬化; 脂蛋白类,低密度; 细胞粘附; 单核细胞

研究证实,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)与单核细胞相互作用是动脉粥样硬化斑块中泡沫细胞形成的重要机制。目前认为单核细胞(monocyte, MC)粘附于血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)是循环 MC 迁移入动脉内膜并在局部进一步形成泡沫细胞的前提^[1],故研究 OLDL 对 MC 与 VEC 间粘附过程的影响对于解释动脉粥样硬化的发病机制具有重要的基础意义。以往由于国内此方面研究手段的缺乏,研究结果难以客观、精确,故未有相关研究报告。本研究利用重庆大学生物工程研究院的细胞微管吸吮技术实现了对 MC 与 VEC 间粘附力的单细胞定量测量,旨在对 OLDL 介导两细胞粘附作用提供动态的精确描述。

1 材料与方法

1.1 低密度脂蛋白的分离与修饰^[2]

取人血浆加入还原型谷胱甘肽(0.56 mmol/L)和 EDTA (1 μ mol/L), 采用密度梯度超速离心法分离 LDL, 取 $d=1.019\sim 1.063$ g/ml 区段, 用 0.15 mol/L NaCl 4℃透析 24 h, 再加 Cu^{2+} 使终浓度为 10 μ mol/L, 置 4℃作用 24 h, 然后再次经 0.15 mol/L NaCl 透析 24 h, 用 0.4 μ m 微孔滤膜过滤后 4℃保存待用, 其蛋白质含量用 Lowry 法测定, 乙酰丙酮法测定甘油三酯 (triglyceride, TG)

1.2 细胞的来源

取健康献血员静脉血采用 Percoll 密度梯度离心法分离收集单个核细胞, 分离液(华美公司进口分装, 比重 1.077), 等体积徐徐加入血液后, 2 000 r/min, 离心 30 min, 吸取白膜层, Hanks 液洗涤 2 次后仍混悬于 RPMI 1640 培养液(内含青霉素 100 Ku/L, 链霉素 100 mg/L, 10 mmol/L Hepes 缓冲液), 置细胞悬液于玻璃平皿, 37℃温箱静置 30 min, 倾去未粘附的淋巴细胞, 加入相同培养液振荡并用毛细吸管吹打, 得纯度达 90% 以上的单核细胞悬液, 调整细胞数约 1×10^6 /ml, 4℃保存待用。

取正常人新鲜血采用 Percoll 密度梯度离心法分离收集中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN), 同单核细胞条件混悬保存待用。

采用传代良好的人脐静脉 VEC, 接种于细胞微管吸吮系统的样品腔中, 样品腔已用硅胶粘于薄型载玻片上, 37℃ 5% CO_2 条件下传代培养, 待细胞长满腔底面时即可加入待测细胞, 上机测定该细胞与 VEC 的粘附力。

1.3 细胞的分组处理

1.3.1 对照组 MC: 未施加条件的正常 MC + 未施加条件的正常 VEC。PMN: 未施加条件的正常 PMN + 未施加条件的正常 VEC。

1.3.2 实验组 MC: 培养的 MC 中加入 OLDL 使终浓度为 50 mg TG/L, 37℃, 5% CO_2 分别温育 30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后收集细胞待测。PMN: 用 MC 处理组相同条件处理。VEC: 传代接种于样品腔中的 VEC 长满腔底面时, 加入 OLDL 使终浓度为 50 mg TG/L, 37℃, 5% CO_2 分别孵育 30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 后加入待测细胞上机检测。

1.4 细胞粘附性的测量

采用细胞微管吸吮实验系统(由微管控制系统、三维进针系统、压力控制系统和图像采集分析系统组成), 首先拉制微管, 控制口径在 2~3 μ m 控制好的微管先预灌悬浮待测细胞的溶液, 然后置微管于进针器上, 油镜下找到针尖并置于视野中央, 调节针位使针尖

口刚刚接触粘附于内皮细胞表面的待测细胞, 从低压开始加负压并操作推进器, 观察在此负压下能否拉离该细胞, 如不能则继续加大负压, 直至找到能拉离粘附细胞所需的最小负压阈值, 同此过程连续测定 10 个以上细胞, 取均值作为结果。细胞粘附性以临界分离应力 Sc 来表示^[3]; $\text{Sc} = (\text{Rp}/\text{Ri})^2 \cdot \text{Pc}$

其中 Pc 为最小负压阈值, Rp 为微管口半径, Ri 为两细胞接触面半径。

1.5 统计学处理

采用两组间均数 t 检验法。

2 结果

实验结果显示正常 MC 和 PMN 与正常 VEC 间均有一定的基础粘附力, PMN 的基础粘附力稍大于 MC。OLDL 处理的 VEC 可提高对 MC 的粘附力, 其时间动力学表现为 1 h 开始增加, 3~6 h 达高峰, 此时可达到静息时 4~5 倍的粘附性, 这种增加一直持续至 24 h 以后 (Table 1)。经 OLDL 处理的 VEC 对 PMN 的粘附性未有提高 (Table 1)。而经 OLDL 处理的 MC 和 PMN 其粘附性均有增加, 其发生较快, 1 h 内即达高峰, 24 h 内基本稳定 (Table 2)。

Table 1. Effect of OLDL on adhesive ability of ras-cular endothelial cell ($\bar{x} \pm s$, kPa)

Time	n	monocyte	PMN
0 ^①	15	6.34 $\pm$ 0.76	7.22 $\pm$ 0.83
30 min	9	8.14 $\pm$ 0.92	7.31 $\pm$ 0.92
1 h	13	5.71 $\pm$ 1.79	7.20 $\pm$ 0.76
3 h	15	29.67 $\pm$ 2.31**	7.29 $\pm$ 0.85
6 h	15	32.20 $\pm$ 2.79**	7.13 $\pm$ 0.79
12 h	15	31.04 $\pm$ 3.14**	7.40 $\pm$ 0.89
24 h	15	3.06 $\pm$ 2.93*	7.18 $\pm$ 1.21

① 0 time point as control

② * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; compared with control

3 讨论

本实验结果揭示了 OLDL 介导 MC 与 VEC 以及 PMN 与 VEC 之间的相互作用有着较明显的规律性。首先从时相动力特征来看, OLDL 处理的 MC 对 VEC 粘附力的增加发生

Table 2. Effect of OLDL on ability of monocyte and neutrophils ($\bar{x} \pm s$, kPa)

Time	n	monocyte	PMN
0 ^①	15	6.34 ± 0.76	7.22 ± 0.83
30 min	8	15.23 ± 6.17*	23.56 ± 3.12**
1 h	10	21.47 ± 2.13**	24.05 ± 3.34**
3 h	13	21.32 ± 2.03**	24.12 ± 2.93**
6 h	13	24.41 ± 2.37**	24.09 ± 3.10**
12 h	15	21.26 ± 2.97**	24.13 ± 2.84**
24 h	15	21.41 ± 2.12**	23.57 ± 3.03**

① 0 time point as control

② * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; compared with control

快, 1 h 内达高峰后基本稳定维持于该高粘附状态; 而经 OLDL 处理后 VEC 所增加的对 MC 的粘附性则发生相对较慢, 3~6 h 达高峰, 达高峰后维持 24 h 以上, 其次 OLDL 所诱导的 VEC 粘附性增加有着明确的特异性, 即只增加对 MC 的粘附性而不增加对 PMN 的粘附性。

目前认为 VEC 的粘附性升高系由于其表面粘附分子的表达及表达增强, 这些粘附分子中与白细胞粘附关系密切的主要有内皮细胞白细胞粘附分子-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1)、细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), 前两者与 PMN-VEC 间的粘附有关, 后者与 MC-VEC 间的粘附有关^[4], 故 VEC 粘附性增加的选择性系由于 OLDL 相对特异地刺激诱导了 VEC 膜表面 VCAM-1 的表达而不导致 ELAM-1 和 ICAM-1 的表达或表达增强, 而 VLAM-1 的配体极晚期抗原-4 (very late antigen-4, VLA-4) 只在 MC 膜表面有分布而不分布于 PMN, 故 OLDL 对 VEC 粘附性增加的刺激诱导作用表现出对 MC 的专一性。

此外, 本研究显示 VEC 对 MC 粘附性增加的动力学规律与以往报告的 VCAM-1 表达

规律高度一致, 也佐证了 VCAM-1 作为 VEC 对 MC 粘附性增加分子基础的解释。同时也为动脉粥样斑块病灶中的细胞成分主要源于 MC 而非 PMN 提供了部分依据。

与 OLDL 对 VEC 的作用形成对照的, OLDL 对 MC 和 PMN 两者粘附性的增强无明显选择性, 即可使两者粘附性均增加。目前对 MC 的解释仍为其膜表面粘附分子 VLA-4 的表达, PMN 则由于其膜表面 CD11b/CD18 的表达。由于 MC、OLDL 对 MC 和 VEC 的粘附性有着双重增强作用, 而 OLDL 可通过清道夫途径被 MC 大量摄入, 加之 OLDL 进一步介导 MC 牢固粘附于 VEC, 从而发生进一步向动脉内膜的迁移, 此作用在动脉粥样硬化的早期发生过程中起重要作用^[5], 大量的流行病学调查也证实血浆低密度脂蛋白浓度升高与动脉粥样硬化的高发具有明显相关性, 也间接支持了上述观点^[6], 此外, 本实验显示 OLDL 亦可刺激诱导 PMN 粘附性的升高, 其确切意义还有待于进一步探讨。

参考文献

- Steinbrecher UP, Zhang H, Coughlin M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 1990, **9** (2): 155.
- Kuzuya M, Yokoyama M, Chojkier X. Oxidation of low-density lipoprotein by copper and iron in phosphate buffer. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1084**: 198.
- Sung P, Kuhlman P, Maldonado F. Force contribution of the LFA/ICAM-1 complex to T cell adhesion. *J Cell Sci*, 1992, **103**: 259.
- Pattarroyo M, Makgoba MW. Leucocyte adhesion to cells in immune and inflammatory response. *Lancet*, 1989, **2**: 139.
- Berliner JA, Bellomo G. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest*, 1990, **85**: 126.
- Carew TE. Role of biologically modified low density lipoprotein in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1989, **64**: 18.

(1995-07-26 收到, 1996-02-06 修回)