

· 论 著 ·

氧化型低密度脂蛋白的不同组分在诱导巨噬细胞凋亡中的作用

刘尚喜 周 玫 陈 瑗

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

Role of the Different Components of Oxidized Low Density Lipoprotein in Induction of Apoptosis in Macrophages

LIU Shang-Xi, ZHOU Mei and CHEN Yuan

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT

Aim To investigate which component in oxidized low density lipoprotein (OLDL) is responsible for the apoptosis in macrophages induced by OLDL, the roles of several components in OLDL in apoptosis in macrophages were studied.

Methods LDL was modified by Cu^{2+} ; cell nuclei were stained with Hoechst 33258; DNA ladder was observed by agarose gel electrophoresis.

Results OLDL could induce apoptosis in macrophages characterized by appearance of DNA ladder and nucleus condensation, but native LDL and acetylated LDL (Ac-LDL) could not. Pre-clearance of lipid hydroperoxides (LOOH) in OLDL by ebselen plus GSH could partly inhibit apoptosis induced by OLDL.

Lipid moiety in OLDL could induce apparent apoptosis, but protein moiety could not. Both linoleic acid and cholesterol, the main components of LDL lipid, oxidized separately, could induce apoptosis in macrophages. The DNA fragmentation induced by linoleic acid and cholesterol oxidized together was much more apparent than that induced by either of linoleic acid and cholesterol oxidized alone.

Conclusions LOOH and oxidized cholesterol in OLDL may be responsible for the apoptosis in macrophages induced by OLDL.

KEY WORDS Oxidized low density lipoprotein; Lipid hydroperoxides; Oxidized cholesterol; Macrophages; Apoptosis

摘要 通过观察凋亡巨噬细胞的特征性 DNA 梯形图谱和细胞核的形态变化,研究了氧化型低密度脂蛋白的不同组分在其诱导的巨噬细胞凋亡中的作用。结果发现:氧化型低密度脂蛋白可引起巨噬细胞凋亡,表现在 DNA 图谱呈典型的梯形,细胞核固缩,正常和乙酰化低密度脂蛋白均未引起巨噬细胞的明显凋亡,用谷胱甘肽过氧化物酶模拟物 ebselen 清除氧化型低密度脂蛋白上的脂氢过氧化物,可部分抑制氧化型低密度脂蛋白引起的 DNA 断裂。氧化型低密度脂蛋白的脂质组分可引起巨噬细胞 DNA 的明显断裂,而蛋白组分引起的断裂则不明显。低密度脂蛋白脂质的主要成份亚油酸和胆固醇单独氧化后均可引起巨噬细胞 DNA 断裂,二者混合在一起氧化后引起的 DNA 断裂更加明显。

关键词 氧化型低密度脂蛋白; 脂氢过氧化物; 氧化型胆固醇; 巨噬细胞; 细胞凋亡

在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 进展性损伤中,巨噬细胞来源的泡沫细胞的死亡对 As 脂质中心的形成起着重要作用,但其死亡的机制仍不太清楚^[1]。近年来的研究发现低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化修饰是引起动脉粥样硬化的重要因素^[2]。体外研究表明氧化型 LDL (oxidized LDL, OLDL) 不仅可以被巨噬细胞大量吞噬,导致泡沫细胞的形成,而且可对多种细胞产生损伤效

应^[3,4]。OLDL 对巨噬细胞的脂质过氧化损伤是导致巨噬细胞向泡沫细胞转变的重要因素^[5]。

细胞凋亡是有别于细胞坏死的细胞死亡的另一种方式。它是机体生命过程中由细胞固定基因程序所控制的细胞生理性死亡的过程,所以又称为细胞程序性死亡。凋亡细胞在形态上常常表现为细胞皱缩、染色质固缩、浆膜皱缩变形、成小泡及形成凋亡小体等^[6]。染色体上的双链 DNA 断裂是凋亡细胞的另一重要特征,在琼脂糖电泳时 DNA 呈现梯形图谱(DNA ladder),它常用来作为细胞凋亡的标志^[7]。近年来的研究发现细胞凋亡的发生与活性氧有关^[8], OLDL 作为活性氧的携带者可以诱导细胞凋亡的发生^[9]。本文通过观察 DNA 梯型图谱和细胞核的形态变化,研究了 OLDL 的不同组份在诱导巨噬细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 低密度脂蛋白的分离、修饰及鉴定

新鲜人血购自南方医院血库,EDTA 抗凝,低速离心分离血浆。人血浆 LDL($d=1.040\sim 1.063\text{ kg/L}$)采用一次性密度梯度超速离心法制备^[10]。LDL 的氧化修饰采用本室建立的方法^[8],无 EDTA LDL(1 g/L)置含 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的 PBS 中, 37°C 温育 24 h。修饰后的 LDL 置含 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中透析 24 h,超滤除菌后 4°C 保存。修饰程度鉴定采用硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)测定法^[8]。

1.2 脂氢过氧化物含量的测定及清除

氧化型低密度脂蛋白上 LOOH 含量测定采用 FOX 法^[11], LOOH 的清除采用我们以前建立的方法^[12],在 OLDL 中加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)模拟物 ebselen(德国 N. Dereu 博士赠送)和 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ GSH, 37°C 温育 3 h, 4°C PBS 中透析 24 h,超滤除菌后 4°C 保存。

1.3 氧化型低密度脂蛋白脂质和蛋白成份的分离

氧化型低密度脂蛋白脂质和蛋白的分离参照 J. H. Chin 等^[13]的方法。在 OLDL 中加入甲醇-氯仿(2:1),使甲醇、氯仿和水的体积比为 2:1:0.8,室温放置 1 h 后, $500\times g$ 离心 10 min 以沉淀蛋白。在上清液中加入等体积氯仿和 0.15 mol/L NaCl, 4°C 放置过夜后, $500\times g$ 离心 10 min,收集有机相,充氮气使氯仿挥发

干净,加入 1 ml PBS,剧烈震荡 5 min,然后通过超声使脂质均匀分布于 PBS 中。通过测定 OLDL 及脂质部分胆固醇的含量,确定脂质浓度相当于 OLDL 的量。蛋白沉淀用甲醇-氯仿洗三次, PBS 洗两次,然后溶于 1 mol/L NaOH,用 HCl 中和, 4°C 于 PBS 中透析 24 h,蛋白浓度用 Lowry 法测定。

1.4 氧化型亚油酸、胆固醇和卵磷脂的制备

根据 Esterbauer H 等^[14] LDL 各种成份含量的报道,制备与 LDL 含量相当的亚油酸、胆固醇和卵磷脂。亚油酸、胆固醇和卵磷脂(Sigma)首先用无水乙醇配成浓缩液,然后以相当于 0.5 g/L LDL 的浓度稀释到 PBS 中,震荡制成乳浊液,加入 Cu^{2+} 至 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$, 37°C 温育 24 h, -20°C 保存。用此法分别制备亚油酸、胆固醇、卵磷脂的单独氧化产物和亚油酸与胆固醇的共同氧化产物。通过测定硫代巴比妥酸反应物质值和 LOOH 来判断制备产物的氧化程度。

1.5 巨噬细胞的制备和培养

将小鼠拉颈处死,用 70%酒精消毒,往腹腔注射无血清 RPMI1640 培养基(GIBCO),收集腹腔液, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min 收集细胞,用含 10%小牛血清的 1640 调整细胞浓度,接种于 25 ml 培养瓶中, 37°C 5% CO_2 培养箱培养,2 h 后洗去未贴壁细胞,根据需要加入含不同成份的培养基继续培养 24 h。

1.6 细胞活性测定

氧化型低密度脂蛋白处理后巨噬细胞的活性测定采用台盼蓝排斥法。在本实验中细胞经 OLDL 处理后,90%以上的细胞是活细胞。

1.7 细胞 DNA 的提取及凝胶电泳

细胞总 DNA 的提取采用 Blin 和 Stafford 的方法^[15],略加修改。处理后的细胞用 PBS 洗两次, TE 液洗一次,然后直接往培养瓶中加入细胞抽提缓冲液(10 mmol/L Tris HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS, 100 mg/L 蛋白酶 K) 1 ml , 50°C 温育 3 h,加入等体积的酚氯仿(1:1, v/v),将液体转移至 5 ml 离心管中, $15\text{ }000\times g$ 离心 15 min,在水相中加入 1/5 体积的 10 mol/L 乙酸铵和两倍体积的无水乙醇, -70°C 放置 1 h, $15\text{ }000\times g$ 离心 15 min,沉淀用 70%乙醇洗一次,溶于含 50 mg/L RNase 的 TE 缓冲液中。DNA 样品用 Beckman DU-640 分光光度计定量,1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察 DNA 图谱。

1.8 细胞核的形态观察

细胞经不同的处理后,用多聚甲醛固定,用 Hoechst 33258 对细胞核进行染色,在荧光显微镜下观

家,照相。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡

用正常 LDL(native LDL, n-LDL)、乙酰化 LDL(acetylated LDL, Ac-LDL)和 OLDL 分别处理巨噬细胞,提取细胞总 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳,结果见 Figure 1。从凝胶图谱可以看出 OLDL 处理的细胞其 DNA 图谱呈现梯形状,其第一条带约为 180 bp,依次倍增,对照组及用 n-LDL 和 Ac-LDL 处理的细胞其 DNA 未发生明显断裂。对细胞核形态的观察发现 OLDL 处理的细胞细胞核染色质发生了明显的固缩现象,而 n-LDL 处理的细胞则未出现明显的固缩现象(Figure 2),说明 OLDL 可以诱导巨噬细胞凋亡。

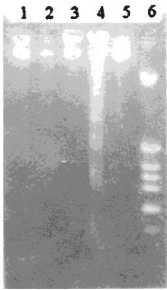


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of extracted total cellular DNA (1.5% agarose, 10 μ g DNA/well). 1. Control; 2. n-LDL (50 mg/L); 3. Ac-ADL (50 mg/L); 4. OLDL (50 mg/L); 5. n-LDL (100 mg/L); 6. Molecular weight marker (pBR322 cut with HinfI, 1 632, 517, 506, 396, 344, 298, 221, 220, 154 bp).

2.2 氧化型低密度脂蛋白的不同组分在诱导巨噬细胞凋亡中的作用

用分离 OLDL 的脂质和蛋白组分分别处

理巨噬细胞,发现脂质组分可引起巨噬细胞的 DNA 断裂,而蛋白组分引起的断裂则不明显。用 ebselen 和谷胱甘肽处理 OLDL 可以使其 LOOH 含量大幅度下降 (Table 1),但其对 OLDL 诱导的巨噬细胞 DNA 断裂只有部分抑制作用 (Figure 3),说明 OLDL 诱导巨噬细胞凋亡的因素除 LOOH 外还有其它的成份。

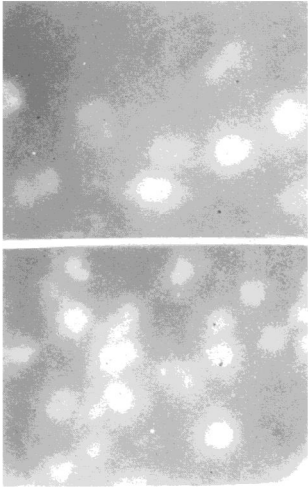


Figure 2. Morphology of macrophage nucleus stained with Hoechst 33258. Upper. Cells treated by n-LDL; Under. Cells treated by OLDL.

Table 1. Changes of lipid peroxide in OLDL after treatment by ebselen plus GSH (μ mol/g LDL).

	n-LDL	OLDL	Lipid	Protein
- ebselen	6.9	109.5	99.9	3.4
+ ebselen		9.5	4.5	3.4

- ebselen represents OLDL before treatment by ebselen plus GSH; + ebselen represents OLDL after treatment by ebselen plus GSH.

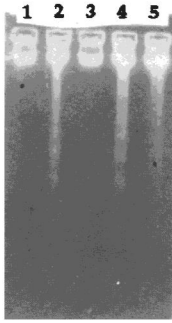


Figure 3. Role of protein, lipid and LOOH in OLDL induced DNA fragmentation of macrophages. 1. Control; 2. OLDL (50 mg/L); 3. Protein (50 mg/L); 4. Lipid (equivalent with that in 50 mg/L OLDL); 5. OLDL treated by ebselen plus GSH.

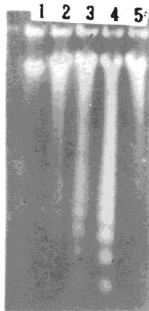


Figure 4. Effect of oxidized linoleic acid, cholesterol and phosphatidylcholine on DNA fragmentation of macrophages. 1. Control; 2. Oxidized linoleic acid; 3. Oxidized cholesterol; 4. Linoleic acid and cholesterol oxidized together; 5. Oxidized phosphatidylcholine (The amount of oxidized linoleic acid, oxidized cholesterol and oxidized phosphatidylcholine used was equivalent with that in 40 mg/L OLDL)

根据 Esterbauer H 等^[14]报道,分别制备

LDL 脂质的主要成份亚油酸、胆固醇和卵磷脂的单氧氧化产物及亚油酸和胆固醇的共同氧化产物(氧化前后 LOOH 和硫代巴比妥酸反应物质值的变化见 Table 2),用与 40 mg/L LDL 含量相当的浓度分别处理巨噬细胞,发现亚油酸和胆固醇的单氧氧化产物均可引起巨噬细胞 DNA 断裂,二者的共同氧化产物引起的断裂更加明显,而卵磷脂的氧化产物引起的断裂不明显(Figure 4),说明氧化型胆固醇可能是 OLDL 诱导巨噬细胞凋亡的另一重要因素。

Table 2. LOOH and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in native and oxidized linoleic acid, cholesterol and phosphatidylcholine($\mu\text{mol/g LDL}$).

	LOOH		TBARS	
	Native	Oxidized	Native	Oxidized
LA	1.67	112.7	2.48	15.02
Cholesterol	3.04	28.8	11.43	15.50
PD	2.05	9.6	10.43	15.21
LA+C	2.52	86.7	11.55	17.65

LA, linoleic acid; PD, phosphatidyl choline; C, cholesterol.

3 讨论

越来越多的证据表明 OLDL 是导致 As 发生的重要因素。OLDL 不仅可被巨噬细胞大量吞噬导致泡沫细胞的形成,而且对多种体外培养细胞具有毒性效应^[3,4]。最近的研究发现 OLDL 可以诱导巨噬细胞的凋亡,巨噬细胞系 P388D1 经 OLDL 处理可导致 DNA 的断裂,凝胶电泳显示典型的 DNA 梯型图谱^[16]。巨噬细胞用 OLDL 处理后扫描电镜显示膜变皱和浆膜广泛性小泡,透射电镜显示 50% 细胞粗面内质网空泡化和核中异染色质重组,呈现典型的凋亡性变化^[9]。我们的研究进一步证实 OLDL 可以诱导巨噬细胞的凋亡,而 n-LDL 和 Ac-LDL 则不能。LDL 经过 Cu^{2+} 的氧化修饰后其结构和组成发生了一系列的变化,包括不饱和脂肪酸和胆固醇含量的降低,LOOH、硫代巴比妥酸反应物质和氧化型胆固醇的形成及载脂蛋白 B 的降解、电泳迁移加快、荧光物质含量升高等^[3,12-17]。究竟哪一种因素是引起细胞毒性和凋亡的原因目前还不太清楚。一般认为

OLDL 携带的活性 LOOH 是引起细胞毒性的主要原因^[18]。而且活性氧可以诱导细胞凋亡的发生^[19]。我们用谷胱甘肽过氧化物酶模拟物 ebselen 清除 OLDL 上的 LOOH,使其含量接近 n-LDL 水平,观察对 OLDL 诱导的巨噬细胞凋亡的影响,发现清除 LOOH 只能部分抑制 OLDL 诱导的凋亡,说明 LOOH 仅是 OLDL 引起巨噬细胞凋亡的原因之一。对 OLDL 脂质和蛋白成份的研究发现蛋白组分不能引起巨噬细胞的凋亡,而脂质组分可以引起巨噬细胞的凋亡,说明 OLDL 上引起凋亡的主要因素在其脂质部分。对 LDL 脂质主要成分亚油酸、胆固醇和卵磷脂的单独氧化产物及亚油酸和胆固醇的共同氧化产物的研究表明氧化型胆固醇可能是 OLDL 引起巨噬细胞凋亡的另一重要因素。单独的亚油酸氧化后虽然产生了大量的 LOOH,但是引起的巨噬细胞凋亡并不是很明显,而亚油酸和胆固醇一起氧化后则可引起明显的巨噬细胞凋亡,胆固醇单独氧化后也可引起明显的巨噬细胞凋亡。胆固醇与 As 及冠心病的关系很早就引起了人们的关注,但其致病机理一直没有阐明。本文的研究结果提示,LDL 携带的胆固醇在 LDL 氧化修饰过程中被氧化形成氧化型胆固醇,并和 OLDL 一起被巨噬细胞吞噬导致其凋亡,可能是胆固醇导致 As 发生的重要因素之一。

参考文献

- 1 Ball RY, Stowers EC, Burton JH, et al. Evidence that the death of macrophage foam cell contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 45~54.
- 2 陈瑗,周玫. 脂质过氧化作用与动脉粥样硬化. *生物化学与生物物理进展*, 1989, **16**(4): 278~282.
- 3 Esterbauer H, Diber-Rotheneder M, Waeg G, et al. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*, 1990, **3**: 77~92.
- 4 Reid VC, Mitchinson MJ. Toxicity of oxidized low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Atherosclerosis*, 1993, **98**: 17~21.
- 5 Liu SX, Chen Y, Zhou M, et al. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*, 1996, **121**: 55~61.
- 6 Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 593~608.
- 7 Arends MJ. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol*, 1990, **136**: 593~608.
- 8 Abello PA, Fidler SA, Bulkley GB, et al. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch Surg*, 1994, **129**: 134~141.
- 9 Reid VC, Mitchinson MJ, Skepper JN. Cytotoxicity of oxidized low density lipoprotein to mouse peritoneal macrophages: an ultrastructural study. *J Pathol*, 1993, **171**: 321~324.
- 10 张林华,刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血浆脂蛋白. *生物化学和生物物理学报*, 1992, **21**(3): 257~260.
- 11 Woff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for the measurement of hydroperoxide. *Methods in Enzymology*, 1994, **223**: 182~189.
- 12 Liu SX, Chen Y, Zhou M, et al. Inhibitory effect of ebselen on the oxidation of low density lipoprotein. *Redox Report*, 1995, **1**: 357~360.
- 13 Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoprotein. *J Clin Invest*, 1992, **89**: 10~18.
- 14 Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med*, 1992, **13**: 341~390.
- 15 金冬雁,黎孟枫,等译. 分子克隆实验指南(第二版). 第三章第三节,从哺乳动物细胞中提取 DNA. 北京: 科学出版社, 1992, 464~476.
- 16 Reid VC, Hardwick SJ, Mitchinson MJ. Fragmentation of DNA in P388D1 macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *FEBS*, 1993, **3**: 218~220.
- 17 Jialal I, Freeman DA, Grundy SM. Varying susceptibility of different low density lipoprotein to oxidative modification. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 482~488.
- 18 Thomas JP, Geiger PG, Girotti AW. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein role of selenoperoxidase in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron-mediated reaction. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 479~490.
- 19 Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, 1994, **15**: 7~10.