

## 巨噬细胞对肌源性泡沫细胞生成的影响

张 骅 楼定安 单子茵 毛峥嵘 魏克荣

(浙江医科大学病理学教研室, 杭州 310031)

### Effects of Macrophages on Formation of Smooth Muscle Cell-derived Foam Cells

ZHANG Hua, LOU Ding-An, SHAN Zhi-Yin, MAO Zheng-Rong and WEI Ke-Rong

(Department of Pathology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031, China)

**ABSTRACT** The smooth muscle cell-derived foam cell formation is one of the characteristics at the intermediate and late stages of atherosclerosis. In this paper we studied the effect of macrophages on the formation of smooth muscle cell-derived foam cells. The volumes of oxidized low density lipoprotein binding and uptake were measured with cell enzyme linked immunosorbent assay method to show the scavenger receptor activities. The contents of intracellular cholesterol were also measured. The results indicated that macrophage conditioned medium could induce the smooth muscle cells (SMC) scavenger receptor expression and its intracellular cholesterol accumulation, and that increase the SMC intracellular cholesterol contents. This supported that macrophages could release some factors to enhance the SMC scavenger receptor expression and the intracellular lipid accumulation, and that the interaction between SMC and macrophages may play an important role in the development of atherosclerosis.

**KEY WORDS** Smooth muscle cells; Foam cells; Macrophages; Scavenger receptors; Atherosclerosis

**摘要** 平滑肌细胞增殖并形成泡沫细胞是动脉粥样硬化的中晚期病变特点之一。本实验研究了巨噬细胞

对平滑肌细胞清道夫受体活性及肌源性泡沫细胞形成的影响。用细胞酶联免疫吸附法测定平滑肌细胞对氧化型低密度脂蛋白的结合和摄入量以显示清道夫受体活性,另测定细胞内胆固醇含量以显示脂质沉积。结果发现:巨噬细胞条件培养液可促进平滑肌细胞清道夫受体的表达和平滑肌细胞内胆固醇积聚;巨噬细胞的含脂碎片也能促使平滑肌细胞内胆固醇的增加。结果提示,巨噬细胞可分泌某些因子促进平滑肌细胞的清道夫受体表达及其胞内的脂质积聚,这两种细胞的相互作用是动脉粥样硬化发展的一个重要机制。

**关键词** 平滑肌细胞; 泡沫细胞; 巨噬细胞; 清道夫受体; 动脉粥样硬化

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖并摄取脂质形成泡沫细胞,是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变的特点之一。现已知悉,早期 As 病灶中的泡沫细胞主要是由单核巨噬细胞通过清道夫受体大量摄取修饰性低密度脂蛋白(如氧化型低密度脂蛋白, oxidized low density lipoprotein, LDL)引起脂质过度积聚而形成的。国内邱近明等<sup>[1]</sup>已有过这方面的报道。但中晚期 As 病灶中 SMC 源泡沫细胞逐渐增多,其形成机制尚未明了,有关 SMC 清道夫受体活性的报道也不尽相同。一般情况下, SMC 缺乏清道夫受体活性。本实验在探讨这两个问题方面作了初步研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 平滑肌细胞和巨噬细胞的分离培养

平滑肌细胞取材于新生牛胸主动脉中膜。按常规方法贴块培养传代。实验用第 10~15 代细胞。巨噬细胞取自 MIH 小鼠腹腔,常规分离培养。以上细胞均用 MEM 培养基,含 10%~20% 小牛血清。巨噬细胞条件培养液(macrophage conditioned medium, MCM)的制

备是:以含 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的 MEM 培养巨噬细胞,24 h 后离心(1 000 r/min)5 min 取上清即为 MCM,使用时与含 1% BSA 的 MEM 1:1 混合。

### 1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

取新鲜人血浆,用改良的 Chung<sup>[2]</sup>方法分离低密度脂蛋白,然后在 25℃、含 5  $\mu\text{mol}$   $\text{CuSO}_4$  的 PBS 中透析 18~24 h;在 4℃、0.01% EDTA-PBS 中透析中止氧化反应,所得 OLDL 的电泳迁移率较 LDL 高 2~3 倍。硫代巴比妥酸反应物质由 2.0  $\mu\text{mol/g}$  胆固醇提高到 12  $\mu\text{mol/g}$  胆固醇。0.25  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,4℃ 保存。

### 1.3 细胞内脂质测定

细胞内中性脂质(包括胆固醇酯)采用油红 O 染色显示。细胞接种于盖玻片,4% 多聚甲醛固定后,于油红 O-丙二醇染色液中浸 20 min,明胶甘油封片。光镜观察,细胞内中性脂质含量多少以“-”~“+++”表示。胞内无脂滴为“-”,少量脂滴(占整个细胞面积的三分之一以下)为“+”,“++”为二分之一以下,“+++”为二分之一以上。培养细胞内脂质用己烷-异丙醇抽提,以酶联试剂盒(宁波生化试剂厂)测定总胆固醇含量。细胞用 0.1 mol/L NaOH 溶解后用 Lowry 方法测蛋白含量。

### 1.4 平滑肌细胞清道夫受体测定

采用细胞酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)方法测定受体活性。SMC 接种至 96 孔板,生长至汇合成单层后,换含 1% BSA 的 MEM 培养 24 h,然后在下述各种条件下加入 OLDL,培养 24 h,PBS 清洗三次,4% 多聚甲醛固定 15 min,1% BSA 封闭,加抗 OLDL 单抗(1:1 000,单抗由意大利米兰大学药理学研究所 Catapano 教授惠赠),37℃ 恒温 1 h 后,顺序加入生物素化羊抗鼠 IgG 及 Streptavidin-HRP(迈新生化试剂公司),邻苯二胺(OPD)显色,490 nm 测光密度值,并以细胞蛋白值校正,所得值为细胞结合和摄入 OLDL 总量。非特异性结合及摄入量测定时,在相同条件下加入 Polyinosinic acid (Poly I)100 mg/L,以竞争抑制 OLDL 与清道夫受体结合及摄入。以总结合及摄入量减非特异性结合及摄入量的值表示清道夫受体结合及摄入量,即清道夫受体活性。

## 2 结果

### 2.1 不同条件下胞内胆固醇含量和油红 O 染色变化

平滑肌细胞经 OLDL(50 mg/L)培养 24 h

后,其胞内胆固醇含量由  $58.5 \pm 4.6$  mg/g 细胞蛋白上升到  $81.2 \pm 6.8$  mg/g 细胞蛋白;而 MCM 可明显加强这一过程,培养后胆固醇含量由  $58.5 \pm 4.6$  mg/g 细胞蛋白上升到  $101.2 \pm 10.6$  mg/g 细胞蛋白,胞内油红 O 染色阳性的脂滴也随之明显增多(Table 1)。

Table 1. Lipid content in SMC

Group	cholesterol content ( $\bar{x} \pm s$ , $n=6$ )	oil-red stain
control(1% BSA)	$58.5 \pm 4.6$	—~+
OLDL(50 mg)	$81.2 \pm 6.8^b$	+~++
OLDL+MCM	$101.2 \pm 11^{ab}$	+~+++
OLDL+PMA(90 $\mu\text{g/L}$ )	$89.3 \pm 4.6^b$	+~++

\* Unit: mg/g cell protein. a:  $P < 0.01$ , compared with OLDL group; b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

### 2.2 平滑肌细胞清道夫受体活性检测

2.2.1 ELISA 法测定的 OLDL 标准曲线如 Figure 1 所示。从曲线看,OLDL 包被酶标板的浓度在 1 mg/L 以内,其光密度值与其浓度成正比,范围在 0~0.65 之间。本实验所得光密度值均落在此区间内。

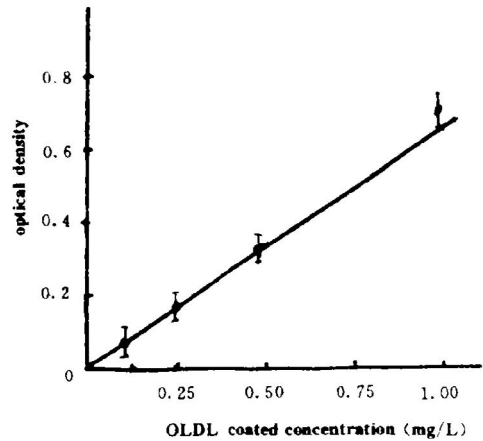


Figure 1. OLDL standard curve ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

2.2.2 细胞 ELISA 法测定的平滑肌细胞的清道夫受体活性如 Figure 2 所示。用每克细胞蛋白的光密度值表示 SMC 结合和摄入的 OLDL,以反映清道夫受体的活性。当培养液中

LDL 在 0~40 mg/L 浓度范围内增加时, SMC 结合和摄入量渐趋饱和, 符合受体的一般特性。

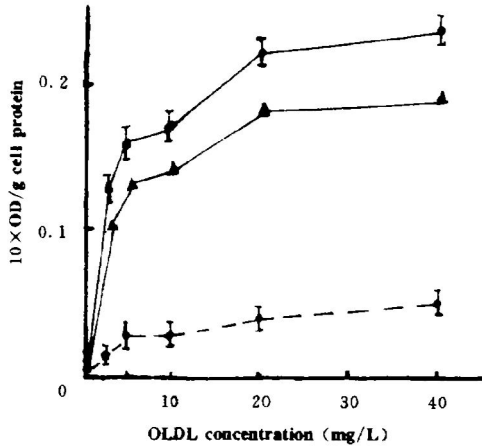


Figure 2. SMC scavenger receptor activities detected by cell ELISA method ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ). Note:  $\bullet$ — $\bullet$  total binding and uptake;  $\circ$ — $\circ$  non-specific binding and uptake;  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$  specific binding and uptake

2.2.3 各种条件对平滑肌细胞清道夫受体活性的影响 在此实验中,受体的活性为单点测定,即测定 LDL 浓度为 40 mg/L 时清道夫受体的结合和摄入量。结果如 Table 2 所示。MCM 可使受体活性从  $0.198 \pm 0.017$  增高至  $0.223 \pm 0.020$  (每克细胞蛋白的光密度值)。

Table 2. Factor effect on the expression of SMC scavenger receptor ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Group	10 OD/g cell protein
control(40 mg/L)	$0.198 \pm 0.017$
MCM	$0.223 \pm 0.020$ *
PMA(90 mg/L)	$0.208 \pm 0.019$

\*:  $P < 0.05$ , compared with control group.

### 2.3 载脂巨噬细胞崩解产物对平滑肌细胞胆固醇含量的影响

小鼠腹腔巨噬细胞以 50 mg/L LDL 培养 24 h 后,细胞内含大量脂质(油红 O 染色“卅”),并大量脱落悬浮于培养基内。收集脱落

之载脂巨噬细胞,反复冻融,加入 SMC 培养基中孵育 24 h,SMC 胞内胆固醇含量达  $119.44 \pm 8.75$  mg/g 细胞蛋白,较对照组(1% BSA-MEM 培养)的  $79.83 \pm 6.47$  mg/g 细胞蛋白有明显提高( $n=6$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

现已公认,在 As 早期巨噬细胞通过清道夫受体途径摄取 LDL 而形成泡沫细胞,而在中晚期 SMC 源性泡沫细胞增多,但对其成因研究得较少,意见也不一致。研究者多认为在一般情况下,SMC 不表达清道夫受体活性。本文所示 LDL(50 mg/L)能使 10~15 代 SMC 的细胞内胆固醇和中性脂质含量有所增加,而巨噬细胞条件培养液能促进这一过程。对于 As 病变来说,SMC 摄取并积聚脂质转变成泡沫细胞的机制至今尚未完全阐明,我们用细胞 ELISA 法测定了 SMC 在 24 h 内 LDL 的结合和摄入量以示清道夫受体活性,结果表明,巨噬细胞条件培养液能增加 SMC 清道夫受体活性;而载脂巨噬细胞的崩解产物也能促进 SMC 内胆固醇聚积,这提示巨噬细胞能分泌某种因子刺激 SMC 清道夫受体的表达,载脂巨噬细胞的崩解产物(含其分泌产物和脂质)则更有可能产生类似的效应。可以设想在 As 早期由于巨噬细胞源性泡沫细胞的聚集增多,其分泌产物或崩解产物在肌源性泡沫细胞的形成过程中将产生一定作用。巨噬细胞与 SMC 之间的相互作用,可能是 As 病变发展的一个重要机制。

在一些报道中提到用 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)提高 SMC 清道夫受体活性,但我们的实验未能证实。

### 参考文献

- 1 邱近明,徐东波,孙保存,等. 前列腺素 E<sub>2</sub> 对氧化修饰和巨噬细胞清道夫受体活性的影响. 中华病理学杂志, 1995, 24(3): 165~167.
- 2 Chung BH, Wilkinsen T, Geer JC, et al. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins. J Lipid Res, 1980, 21: 284~291.
- 3 Luoma J, Hiltunen T, Sarkioja T, et al. Expression of

- macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 2 014~21.
- 4 Herry F, Oneil J. Lesion-derived LDL and oxidized LDL share a lability for aggregation, leading to enhanced macrophage degradation. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 1 209~222.
- 5 Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, et al. Decrease in reactive amino group during oxidation or endothelial cell modification of LDL. *Arteriosclerosis*, 1987, **7**: 135~143.
- 6 Aviram M. Low-density lipoprotein and scavenger receptor activities are modulated by secretory products derived from cells of the arterial wall. *Metabolism*, 1989, **38**: 445~449.
- 7 Ball RY, Stowers EC, Burton JH, et al. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 45~54.
- 8 Wolfballer G, Glick JM, Minor LK, et al. Development of the smooth muscle foam cell, uptake of macrophage lipid inclusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7 760~764.
- 9 Rommeswinkel M, Sever NJ, Koster M, et al. Repression of the macrophage scavenger receptor on macrophage-smooth muscle cell heterokaryons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 601~611.
- (1996-09-15 收到, 1996-11-25 修回)