

## 巨噬细胞集落刺激因子对小鼠腹腔巨噬细胞 清道夫受体途径和细胞内胆固醇酯积聚的影响

陈 兵<sup>①</sup> 范乐明 蔡海江 王 南 朱 宇

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

### The Effect of Macrophage Colony-Stimulating Factor on Scavenger Receptor passway of Mouse Peritoneal-Macrophage and Cellular Cholesteryl Ester Accumulation

CHEN Bing<sup>①</sup>, FAN Le-Ming, CAI Hai-Jiang, WANG Nan and ZHU Yu.

(The Atherosclerosis Research Centre of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ① Nanjing Gulou Hospital, Nanjing 210008, China)

#### ABSTRACT

**Aim** The search for the relation between macrophage colony-stimulating factor (MCSF), scavenger receptor (SR), oxidative modified low density lipoprotein (LDL) and atherosclerosis (As). We studied the effect of recombinant human MCSF (rhM-CSF) on the SR passway of mouse peritoneal macrophage (MPM) and the effect of rhMCSF on cellular cholesteryl ester (CE) accumulation caused by OLDL.

**Methods** Mouse peritoneal macrophages (MPM) were collected by routine method. LDL was isolated by density gradient ultracentrifugation, oxidized by  $\text{CuCl}_2$  and labeled either with 3,3-diiododecyl indocarbocyanine (DiI) or with  $^{125}\text{I}$ . The binding of DiI-OLDL and degradation of  $^{125}\text{I}$ -OLDL by MPM and the intracellular content of CE were measured according to the methods of Stephen, Goldstein and Heider respectively.

**Results** Recombinant human MCSF could increase

the number of SR on cultured MPMs and enhance the binding and degradation of OLDL with a dose-and time-dependent mode. The cellular CE accumulation caused by OLDL was also enhanced by addition of rhMCSF.

**Conclusions** MCSF may enhance the cellular binding and degradation of OLDL by increasing the number of SR on MPMs, hence increase the cellular CE content and promote the formation of foam cells in the vascular wall.

**KEY WORDS** Macrophage colony-stimulating factor; Scavenger receptor; Atherosclerosis.

**摘要** 为探索巨噬细胞集落刺激因子、清道夫受体、氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化的关系,观察了重组人巨噬细胞集落刺激因子对小鼠腹腔巨噬细胞清道夫受体途径的影响以及重组人巨噬细胞集落刺激因子对氧化型低密度脂蛋白所致细胞内胆固醇酯积聚的影响。结果发现重组人巨噬细胞集落刺激因子能增加培养的小鼠腹腔巨噬细胞表面的清道夫受体数目,使之对氧化型低密度脂蛋白的结合和降解呈现剂量和时间依赖性增加,并使细胞内胆固醇酯积聚增多。表明巨噬细胞集落刺激因子可通过增加清道夫受体数目使小鼠腹腔巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的结合和降解增多,从而增加细胞内胆固醇酯含量,促进动脉壁内泡沫细胞形成。

**关键词** 巨噬细胞集落刺激因子; 清道夫受体; 动脉粥样硬化

1979年,Goldstein等首先发现了巨噬细胞清道夫受体(scavenger receptor, SR),并描述了该受体具有不同于他们原先发现的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体的诸多特性,如能识别修饰的脂蛋白、不受细胞内

① 现在南京鼓楼医院内科, 南京 210008

胆固醇水平的调节、以及可导致细胞内胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)过量蓄积等。提示SR有可能是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)中泡沫细胞形成的重要因素。然而有关SR表达的调节机制尚未完全阐明。由于巨噬细胞SR活性只在单核细胞分化为成熟巨噬细胞后才表现出来,作为促进分化成熟的靶向性生长因子—单核细胞源性巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)尤其受到了重视。Ishibashi等<sup>[1]</sup>首先报道了重组人单核巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human MCSF, rhMCSF)能促进人单核巨噬细胞摄取和降解乙酰化LDL,从而导致胆固醇酯的细胞内蓄积。乙酰化LDL是最早被确认的SR的配基,但人体内并不存在。后来发现氧化型LDL(oxidized LDL, OLDL)也与SR有高度亲和性,且被证明在体内,尤其是动脉粥样硬化病灶中存在。显然,进一步深入研究MCSF能否使OLDL通过SR途径导致细胞内胆固醇酯蓄积,可能更具病理生理学意义。

我们观察了rhMCSF对小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophage, MPM)SR途径的影响, rhMCSF对OLDL所致细胞内CE积聚的影响,现予报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组人巨噬细胞集落刺激因子(rhMCSF)由南京大学生物化学系秦凌川教授提供,活性 $2 \times 10^6$  u/g。DiI(3,3'-dioctadecyl indocarbocyanine)为美国Molecular Probes公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠腹腔巨噬细胞培养** 取体重为20 g左右昆明种小鼠数只,按Edelson氏法收集和培养MPM。DMEM培养液中含15%小牛血清。待细胞伸展率达70%即可进行实验。

**1.2.2 OLDL制备** 先按序列超速离心法分离出天然LDL,再用 $\text{CuCl}_2$ 氧化<sup>[2]</sup>得到OLDL。

**1.2.3 DiI-OLDL制备** 参照Stephan氏<sup>[3]</sup>法。

**1.2.4  $^{125}\text{I}$ -OLDL制备** 按Goldstein等人的方法先制备出 $^{125}\text{I}$ -LDL,再用 $\text{CuCl}_2$ <sup>[2]</sup>将其氧化成 $^{125}\text{I}$ -

OLDL。比放射活性在60~250 cpm/ng LDL之间,游离碘 $<2\%$ 。

**1.2.5 琼脂糖凝胶电泳鉴定** 相对电泳迁移率以LDL为1,测得OLDL为3, DiI-OLDL为2.5,  $^{125}\text{I}$ -LDL为2.5。

**1.2.6 MPM受体结合DiI-OLDL实验** 将MPM孵育于含或不含rhMCSF 4.0 mg/L的培养液中,至第六天时,以PBS洗三次细胞,换含不同浓度的DiI-OLDL和0.5%牛血清白蛋白的DMEM液,测非特异性结合值的细胞培养液中需另加300 mg/L OLDL、4℃、2 h孵育。快速荧光分析法<sup>[3]</sup>测MPM特异性结合DiI-OLDL量。

**1.2.7 MPM降解 $^{125}\text{I}$ -OLDL实验** 参照Goldstein氏法。

**1.2.8 细胞内微量胆固醇酯测定** 按Heider等<sup>[4]</sup>改良法进行。细胞蛋白测定用Lowry法。

**1.3 统计方法**为两样本均数比较的 $t$ 检验。图表中实验数据均为两复管均值。

## 2 结果

### 2.1 DiI和DiI-氧化型低密度脂蛋白标准曲线及氧化型低密度脂蛋白的荧光标记率

DiI和DiI-氧化型低密度脂蛋白标准曲线见图1(Figure 1)和图2(Figure 2)。

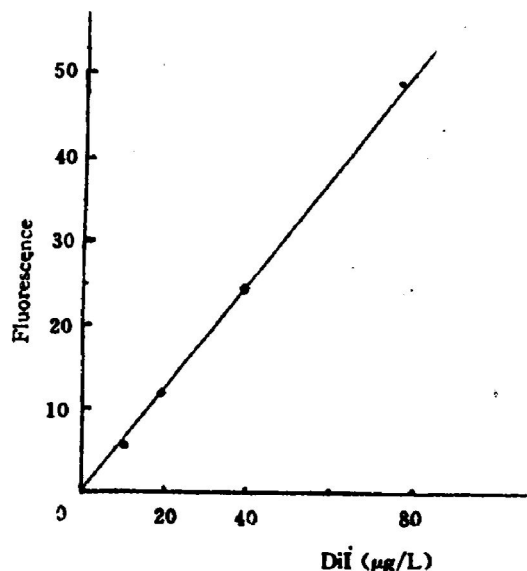


Figure 1. Standard curve of DiI.

从图1(Figure 1)和图2(Figure 2)可见, DiI在10~80 μg/L的范围内,其浓度与荧光

值呈直线关系; DiI-OLDL 在 100~800  $\mu\text{g/L}$  范围内, 浓度与荧光值呈直线关系。据此算出 OLDL 结合 DiI 的结合率为 41 mg/g。

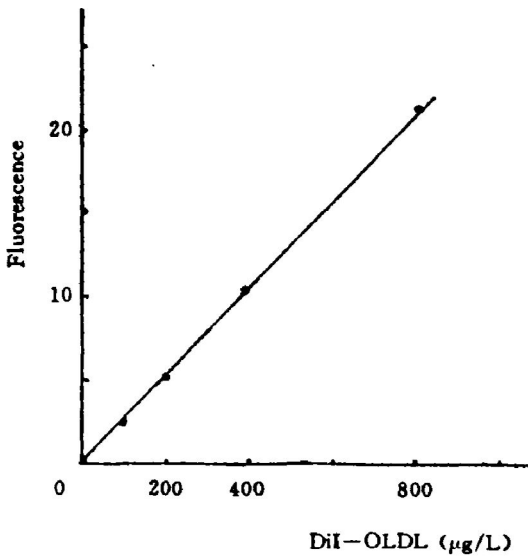


Figure 2. Standard curve of DiI-OLDL.

Scatchard 作图后得到两条直线; 对照组 Bmax 为 880  $\mu\text{g/g}$  蛋白, kd 为  $2.7 \times 10^{-9} \text{mol}$ , 而经 rhMCSF 预孵育后 MPM 结合 DiI-OLDL 的 Bmax 为 1.78 mg/g 蛋白, 增加了一倍, kd 为  $2.3 \times 10^{-9} \text{mol}$ , 无明显改变(图 4, Figure 4)。表明 MCSF 对清道夫受体与 DiI-OLDL 的亲合力影响不大, 主要通过增加 MPM 表面受体数目而促进对 OLDL 的摄取。

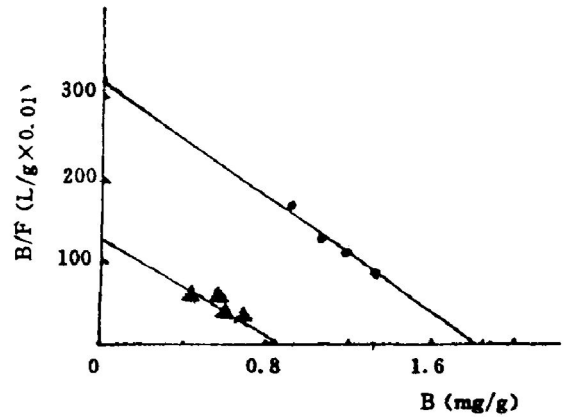


Figure 4. Scatchard analysis of bound of DiI-OLDL by MPMs.

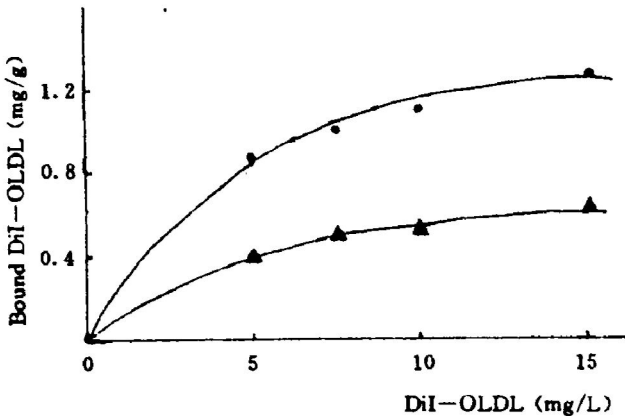


Figure 3. Effect of MCSF on the bound of DiI-OLDL of varying concentrations by MPMs.

MPMs were incubated with DMEM containing 15% FCS with (•) or without (Δ) 4.0 mg/L MCSF.

## 2.2 巨噬细胞集落刺激因子对小鼠腹腔巨噬细胞结合 DiI-氧化型低密度脂蛋白的影响

小鼠腹腔巨噬细胞(MPM)在 4℃ 时对 DiI-OLDL 的结合情况见图 3 (Figure 3)。加或不加 rhMCSF 时, MPM 结合 DiI-OLDL 各为一条配基饱和曲线。经线性回归处理, 即

## 2.3 巨噬细胞集落刺激因子浓度对小鼠腹腔巨噬细胞降解<sup>125</sup>I-氧化型低密度脂蛋白的影响

小鼠腹腔巨噬细胞与不同浓度 rhMCSF 共孵育 6 天后再检测其对<sup>125</sup>I-OLDL 的降解能力, 结果见图 5 (Figure 5)。rhMCSF 在 2.0~8.0 mg/L 即  $(2.0 \sim 8.0) \times 10^6 \text{ u/L}$  时, 作用明显, 最高可使细胞降解<sup>125</sup>I-OLDL 量是对照组的 2.2 倍 ( $P < 0.001$ )。经统计学处理, 在 rhMCSF 浓度为 1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 mg/L 时, 细胞降解 OLDL 量与对照组相比均具有统计学差异。

## 2.4 巨噬细胞集落刺激因子对氧化型低密度脂蛋白所致细胞内胆固醇酯积聚的影响

小鼠腹腔巨噬细胞先后与 rhMCSF 和 OLDL 预孵育不同时间后, 再检测细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC)、胆固醇酯(CE)、游离胆固醇(free cholesterol, FC)的变化。结果见附表(Table)。rhMCSF 作用 MPM 后,

Table. Effects of MCSF (rhMCSF, 4.0 mg/L) on cholesteryl ester accumulation in MPMs, in the presence of OLDL(50 mg/L)( $\bar{x}\pm s$ , mg/g).

Target	incubated with OLDL for 24 h			incubated with OLDL for 48 h		
	0 day <sup>①</sup>	3 days <sup>①</sup>	6 days <sup>①</sup>	0 day <sup>①</sup>	3 days <sup>①</sup>	6 days <sup>①</sup>
TC	27.9±5.4	38.9±0.5 <sup>a</sup>	44.1±1.6 <sup>a</sup>	29.6±0.3	42.9±2.8 <sup>a</sup>	58.8±4.1 <sup>a</sup>
FC	25.4±2.1	28.3±0.6	29.4±0.3	26.7±0.3	28.5±2.2	28.1±2.0
CE	2.49±0.23	10.55±0.12 <sup>b</sup>	14.7±1.9 <sup>b</sup>	2.82±0.50	14.4±0.7 <sup>b</sup>	30.7±2.2 <sup>b</sup>

①Time of incubated with rhMCSF. a,  $P<0.05$ , compared with 0 day; b,  $P<0.01$ , compared with 0 day.

TC、CE 均较对照组增加,尤以 CE 增加显著(4.2~10.9 倍),而 FC 无明显差异。此外,TC、CE 的增加与 MCSF 预孵育时间的延长和 OLDL 孵育时间的延长均有一定的时间相关性。表明 MCSF 可促进 MPM 胞内胆固醇及其酯的蓄积。

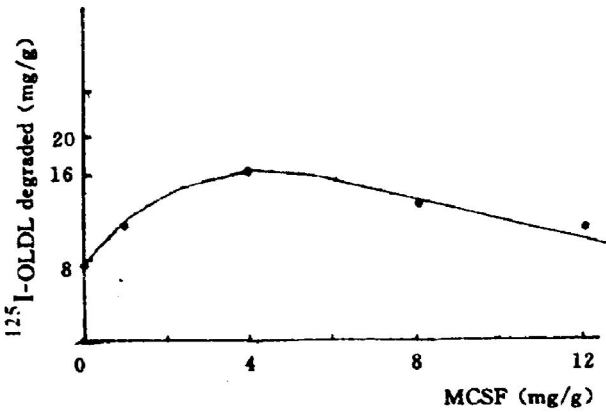


Figure 5. Dose-dependent effect of MCSF on the degradation of <sup>125</sup>I-OLDL by MPMs ( $P<0.001$ ).

3 讨论

巨噬细胞集落刺激因子是一种激素样生长因子,除可刺激单核细胞前体的增殖和分化外,还能激活成熟巨噬细胞。近年来研究表明,MCSF 的作用与动脉粥样硬化中泡沫细胞形成有关<sup>[1]</sup>。MCSF mRNA 及其蛋白在 As 病灶中所水平表达的事实也已在不同实验室中先后证实<sup>[5,6]</sup>。尽管还有许多其它因子调节巨噬细胞的功能,包括受体活性等,但由于 MCSF 的靶细胞就是单核巨噬细胞系,它对单核巨噬细胞功

能的影响不容忽视。

Ishibashi 等已证明 rhMCSF 能通过增加人单核巨噬细胞的 SR 数目而使该细胞摄取和降解乙酰化 LDL 的能力增强。本研究采用存在于体内的 LDL 为配基,证明 rhMCSF 可使 MPM 对 OLDL 的最大结合量 Bmax 增加一倍,37℃ 4 h 的降解值增加 1.2 倍,细胞内 TC 含量三天后增加 45%,6 天后增加 100%(其中 CE 分别增加 4 倍和 10 倍,而 FC 无明显变化)。提示 MCSF 可能在体内使单核巨噬细胞通过 SR 途径摄取和降解 OLDL 增多,导致细胞内胆固醇、主要是胆固醇酯蓄积,从而促进泡沫细胞的形成。

小鼠腹腔巨噬细胞对 OLDL 的 4℃ 结合实验,我们采用了国外新近发展的快速荧光分析法<sup>[3]</sup>。结果 Bmax、kd 值均与以往放射配基受体检测法有可比性<sup>[7]</sup>。此方法的优点是简便、快捷、无放射性污染,尤其适合于缺乏放射性防护设备的单位应用。缺点是无法测定受体对 OLDL 的降解情况。本文将快速荧光法与放射配基法结合,获得了 SR 途径中完整的动力学资料。

有关 MCSF 与 As 的关系目前还存在不同看法。Shiman 等<sup>[8]</sup>报道静脉注射 MCSF 可使 NZW 兔及 WHHL 兔体内主要含载脂蛋白 B100 的脂蛋白如极低密度脂蛋白、中等密度脂蛋白和 LDL 的血浆水平下降。将 MCSF 试用于家族性高胆固醇血症患者,又使 1/3 病人的血浆总胆固醇水平下降。MCSF 的这种降血脂作用与上述的致动脉粥样硬化作用显然是相反的,这也与其靶细胞单核巨噬细胞在对动脉粥

样硬化发生发展效应上的双重性相一致。尽管机体(主要是肝脾)的单核巨噬细胞系统功能增强能有助于清除过量脂蛋白,特别是修饰脂蛋白,可能减轻动脉壁内脂质积聚;但入侵动脉壁的单核巨噬细胞激活时由于同时启动了一系列生物学反应,可反过来导致脂质在局部积聚,促进 As 的发生发展。同样,在动脉内膜生成的过量 MCSF 可能是导致局部泡沫细胞形成的重要因素之一;而存在于血液循环中的 MCSF 则可通过促进肝脾单核巨噬细胞系统功能,特别是 SR 的表达而增强对过量脂蛋白、特别是修饰脂蛋白的清除能力。Inoue 等<sup>[9]</sup>选用遗传性 LDL 受体缺陷的 WHHL 兔研究 MCSF 的总体效应,证明可防止其 As 的进展。表明动脉壁外的 MCSF 与动脉壁内的 MCSF 的效应不同,设法提高动脉壁外 MCSF 水平有可能成为防治 As 的新途径。

#### 参考文献

- 1 Shun Ishibashi, Toshimori Inaba, Hitoshi Shimano, et al. Monocyte colony-stimulating factor enhance uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 14 109~117.
- 2 Uas P Steinbrecher, Sampath Parthasarathy, David S Leakde, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 1 883~887.
- 3 Zouhair F, Stephan, Edna Cahill Yurachek. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 325~330.
- 4 Johi G Heider, R Lance Boyett. The picomole determination of free and total cholesterol in the cells in culture. *J Lipid Res*, 1978, **19**: 514~518.
- 5 Steven K Clinton, Robert Underwood, Lori Hayes, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1992, **140**: 301~316.
- 6 Michael E Rosenfeld, Seppo Yla-Hertuala, Beth A Lipton, et al. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol*, 1992, **140**: 291~300.
- 7 宋武, 蔡海江. 巨噬细胞乙酰 LDL 受体的研究. *中国病理生理杂志*, 1988, **4**(2): 66~69.
- 8 Shimano H, Yamada N, Motoyoshi K, et al. Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony stimulating factor(M-CSF). *Ann NY Acad Sci*, 1990, **587**: 362~370.
- 9 Ikuo Inoue, Toshimori Inaba, Kazuo Motoyoshi, et al. Macrophage colony stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, 1992, **93**: 245~254.

(1997-01-07 收到)