

巨噬细胞修饰低密度脂蛋白对细胞受体活性的影响及前列腺素 E₂ 的作用

刘术娟 邱近明 孙保存 赵秀兰
(天津医科大学病理学教研室, 天津 300070)

Influence of Cell-modified Low Density Lipoprotein on Cellular Receptors and Effect of Prostaglandin E₂

LIU Shu-Juan, QIU Jin-Ming, SUN Bao-Cun and ZHAO Xiu-Lan
(Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the influence of cell-modified low density lipoprotein (cm-LDL) on scavenger receptors and low density lipoprotein receptors (LDLR), meanwhile the effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) was studied.

Methods The receptor activity was detected by means of immunocytochemistry and bitin avidin-enzyme linked immunosorbent assay (BA-ELISA), using cultured murine peritoneal macrophages and murine skin fibroblasts as models.

Results 1. The scavenger receptor activity on macrophages increased in cm-LDL group, showing heavy brown granules in the membrane and cytoplasm of enlarged cells, while in PGE₂ group, most cells were mildly stained and in control group stained weakly. 2. The binding amount of LDL to LDLR on fibroblasts showed that it markedly decreased in cm-LDL group (54 ± 13 μg/g cell protein) compared with which in control group (144 ± 8 μg/g cell protein), *P* < 0.01; and significantly enhanced in PGE₂ group (100 ± 11 μg/g cell protein), versus which in cm-LDL group, *P* < 0.05.

Conclusion The findings suggested that cm-LDL stimulated scavenger receptor and inhibited LDLR,

PGE₂ (20 mg/L) markedly inhibited scavenger receptor activity and protected the LDLR against the injury of oxidized LDL.

KEY WORDS Low density lipoprotein, receptor; Cell modification; Scavenger receptor; Prostaglandin E₂

摘要 为研究低密度脂蛋白经细胞修饰后对细胞受体的影响及前列腺素 E₂ 的作用, 利用免疫细胞化学和生物亲和素-酶联免疫吸附法分别检测小鼠腹腔巨噬细胞清道夫受体、小鼠皮肤纤维母细胞低密度脂蛋白受体的结合活性, 结果发现修饰组的巨噬细胞胞浆及胞膜有强阳性黄褐色颗粒, 而药物组仅中度着色; 修饰组低密度脂蛋白与其受体结合量 (54 ± 13 μg/g 细胞蛋白) 较对照组 (144 ± 8 μg/g 细胞蛋白) 显著下降 (*P* < 0.01); 药物组受体结合量 (100 ± 11 μg/g 细胞蛋白) 较修饰组明显提高 (*P* < 0.05)。表明细胞修饰低密度脂蛋白能够刺激清道夫受体活性, 抑制低密度脂蛋白受体活性; 前列腺素 E₂ (20 mg/L) 可对抗细胞修饰低密度脂蛋白对此二种受体的作用。

关键词 低密度脂蛋白, 受体; 细胞修饰; 清道夫受体; 前列腺素 E₂

大量研究表明, 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 发生氧化修饰后, 因其理化及生物性质的改变而在多方面具有潜在致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性能^[1]。氧化型 LDL 的主要致 As 机理与其受体活性变化密切相关, LDL 中载脂蛋白 B 的氧化及断裂使 LDL 受体 (LDL receptor, LDLR) 对 LDL 识别下降而使其被清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 无反馈地识别和摄取, 导致泡沫细胞形成和早期 As 病变。但有关细胞修饰

LDL (cell modified LDL, cm-LDL) 对受体活性的影响研究较少。本文从 SR 和 LDLR 两方面研究 cm-LDL 的致 As 作用机理, 并进一步探讨前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 的作用。

1 材料和方法

1.1 小鼠腹腔巨噬细胞的收集和培养

健康昆明小鼠, 按鄂征的方法^[2]吸取腹腔液收集巨噬细胞。用 DMEM 和 F₁₂ (GIBCO) 培养液调细胞浓度为 $2.5 \times 10^9/L$, 37℃ 恒温培养箱培养。

1.2 低密度脂蛋白的制备及修饰

取新鲜人血浆, 不连续密度梯度超速离心法分离 LDL^[3]。所得 LDL ($d=1.048 \sim 1.050 \text{ kg/L}$) 经琼脂糖凝胶电泳显单一一条带。收集 LDL, 于 0.01 mol/L, pH7.4 的 PBS (含 1 mmol/L EDTA) 中, 4℃ 闭光充分透析 48 h, 超滤后保存于 4℃。LDL 蛋白含量测定采用二辛可宁酸蛋白含量测定试剂盒 (本校内分泌研究所提供)。

以培养 18 h 巨噬细胞与不含 EDTA 的 LDL (100 mg/L) 在 Ham's F₁₀ 培养基中孵育, 同时设无细胞对照组, 24 h 后测定培养上清液中硫代巴比妥酸反应物质含量, 以丙二醛表示, 使用南京建成生物工程研究所的丙二醛测定试剂盒。与细胞孵育后 LDL 中丙二醛含量为 58.72 μmol/g LDL, 是无细胞对照组的 2.74 倍, 确定巨噬细胞已对 LDL 发生氧化修饰。

1.3 巨噬细胞清道夫受体免疫细胞化学

实验分三组: 天然 LDL (natural LDL, n-LDL) 组、细胞修饰 LDL (cm-LDL) 组和 cm-LDL 中加入 PGE₂ (20 mg/L) 的给药 (PGE₂-LDL) 组。盖片培养 12 h 的巨噬细胞以 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)-DMEM 诱导 48 h, 以 4% BSA-DMEM, 4℃ 封闭 2 h。分别加入 n-LDL、cm-LDL、PGE₂-LDL 各 50 mg/L, 4℃ 作用 2.5 h。以 1% 多聚甲醛室温固定 10 min。1.5% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 37℃ 10 min。依次加入兔抗人载脂蛋白 B 抗体 (1:100), 生物素化免疫球蛋白 G (IgG) (1:100), 亲和素-辣根过氧化物酶 (avidin-horseradish peroxidase, avidin-HRP; 1:100), 37℃, 各 2 h。以底物 0.05% 联苯二胺-0.01% H₂O₂ 显色, 各步骤间以 0.01 mol/L PBS 多次洗涤。常规染核及封片。同时设阴性对照, 不加兔抗人载脂蛋白 B 抗体, 以 PBS 替代。

1.4 纤维母细胞低密度脂蛋白受体活性检测

1.4.1 生物素标记低密度脂蛋白的制备^[4] 2 mg LDL 用 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH8.6, 含 0.01% Na₂EDTA) 溶液稀释至 1.0 ml, 迅速加入 1 g/L 活化生物素的二甲基亚砜溶液 150 μl, 摇匀后室温反应 1 h。充分透析后加等量 60% 甘油-PBS, 超滤保存, 生物素化-LDL 蛋白含量测定采用二辛可宁酸试剂盒。

1.4.2 生物素化低密度脂蛋白的点膜实验 已标记的生物素-LDL 以 PBS 对倍稀释后点于醋酸纤维素膜上, 烤膜 (37℃ 30 min) 后加入 avidin-HRP (1:500) 室温作用 1 h, 以 0.05% 联苯二胺-0.01% H₂O₂ 显色。同时设阴性对照 (只加初始的生物素-LDL), 阳性对照 (只加 avidin-HRP) 重复上述过程。

1.4.3 生物素化低密度脂蛋白标准曲线的制定

不同浓度生物素-LDL 包被 24 孔酶标条, 4℃ 过夜。封闭后加入 avidin-HRP (1:500), 以底物 1 mmol/L 四甲苯胺 1.2 mmol/L H₂O₂ 显色, 1 mmol/L H₂SO₄ 终止反应。490 nm 测吸光度值。

1.4.4 小鼠皮肤纤维母细胞的培养 新生昆明小鼠, 取躯干部皮肤及皮下结缔组织, 采用组织块贴块法原代培养。第 2~3 代细胞用于实验。

1.4.5 生物素化低密度脂蛋白结合纤维母细胞低密度脂蛋白受体的浓度曲线^[5]

纤维母细胞以 5×10^4 /孔接种于 96 孔培养板, 细胞生长融合后以 1% BSA-DMEM 诱导 48 h, 1% 多聚甲醛固定 10 min, 4% BSA-0.05% 吐温封闭 2 h, 加入不同浓度的生物素-LDL, 2 h, avidin-HRP (1:500), 30 min, 以 1 mmol/L 四甲苯胺-1.2 mmol/L H₂O₂ 显色, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 测吸光度值, 各反应温度均为 37℃, 各步骤间以 0.1 mol/L PBS 多次洗涤, 为检测非特异结合量, 以 20 倍于生物素-LDL 的未标记 LDL 预先封闭 LDLR, 再加入生物素-LDL, 重复上述过程。

1.4.6 低密度脂蛋白受体活性检测 生长成单层的纤维母细胞, 1% BSA 诱导后分三组: 正常对照组, cm-LDL 组及 cm-LDL 中加入 PGE₂ (20 mg/L) 的 PGE₂-LDL 组。cm-LDL 用量为 50 mg/L, 与细胞作用 24 h, 1% 多聚甲醛固定。以后步骤同 1.4.5。生物素-LDL 用量为 50 mg/L。细胞蛋白含量测定采用二辛可宁酸测定试剂盒。上述步骤测得的是结合在细胞表面生物素-LDL 的总量。LDLR 特异性结合量 (即 LDLR 活性) = 总结合量 - 非特异性结合量 (加入 29 倍未标记 LDL 时所测得的值)。通过标准曲线换算成绝对值 (μg/g)。

2 结果

2.1 巨噬细胞清道夫受体免疫细胞化学

细胞修饰低密度脂蛋白的巨噬细胞胞浆及胞膜显示强阳性黄褐色颗粒,细胞体积增

大,伪足伸出,PGE₂-LDL组多呈中度着色,细胞多圆形,体积较小;n-LDL组仅个别细胞呈较弱着色。阴性对照组无着色(图1, Figure 1)

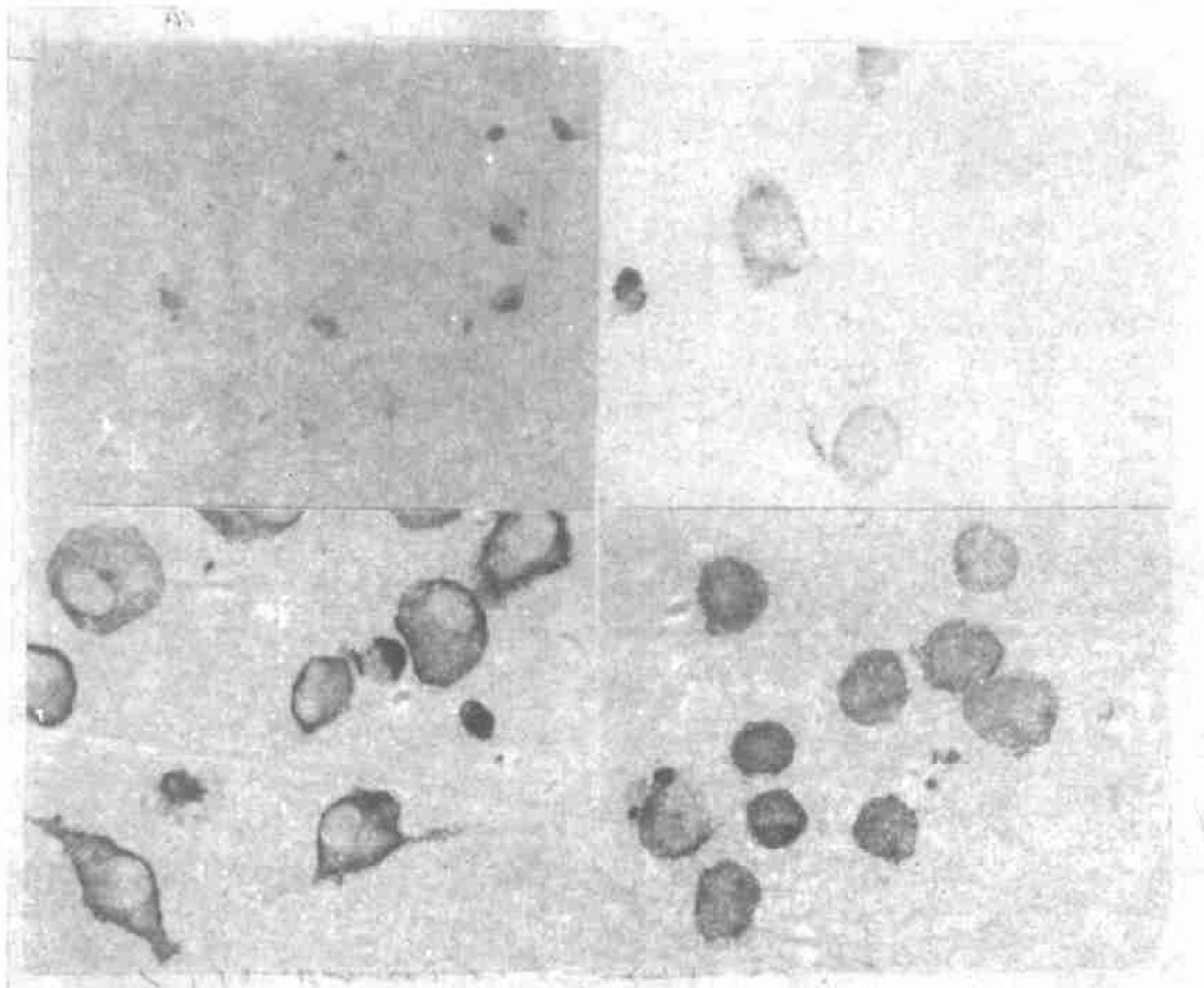


Figure 1. Immunocytochemistry of macrophage scavenger receptors. a. Negative control group; no positive reaction products were shown ($\times 100$). b. Natural LDL (n-LDL) group; weak positive products were shown ($\times 400$). c. Cell modified LDL (cm-LDL) group; Heavy brown immunostaining was observed in the cytoplasm and the membrane of macrophages ($\times 400$). d. cm-LDL plus prostaglandin E₂ (PGE₂-LDL) group; Macrophages were mildly immunostained ($\times 400$).

2.2 生物素低密度脂蛋白点膜实验

实验点按生物素-LDL由高到低(50、25、12.5、6.25、3.12、1.56 ng)梯度,其颜色由深到浅呈梯度排列。阳性对照组黄褐色,阴性对照组未着色。表明生物素已成功标记到LDL分子上(见图2, Figure 2)。

2.3 生物素低密度脂蛋白结合纤维母细胞低密度脂蛋白受体的浓度曲线

浓度曲线见图3 (Figure 3)。由曲线可见,随着生物素-LDL浓度升高,其与LDLR结合

量也增加,当生物素-LDL浓度达25 mg/L以上时,与受体结合达饱和。因此实验中生物素-LDL的用量选为50 mg/L。

2.4 低密度脂蛋白受体活性检测

低密度脂蛋白受体活性检测结果见附表(Table)。由附表可见,与正常对照组相比,cm-LDL组受体活性显著下降($P < 0.05$),而PGE₂-LDL组受体活性与cm-LDL组相比明显升高($P < 0.05$),表明PGE₂可对抗cm-LDL对细胞的损伤,保护LDLR。

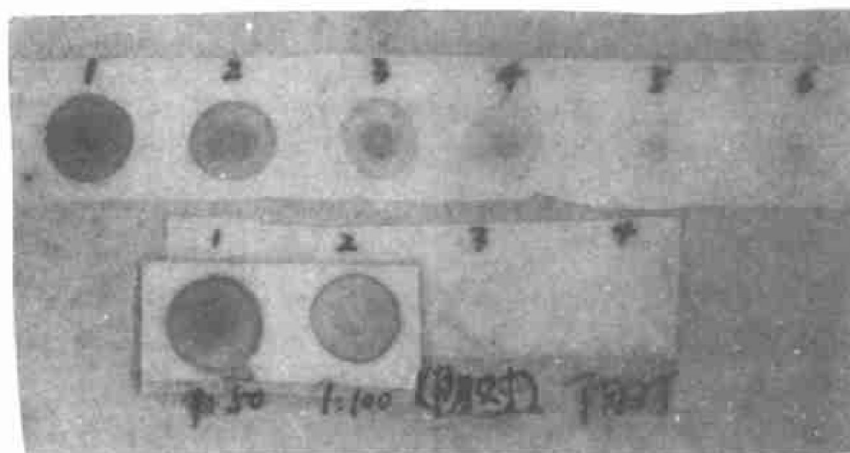


Figure 2: Dot blot of biotin-LDL on acetic cellulose paper. Line 1: with the diluted of biotin-LDL, the positive reaction becoming weaker accordingly. Line 2: 1 and 2 represent positive control; 3 and 4, represent negative control.

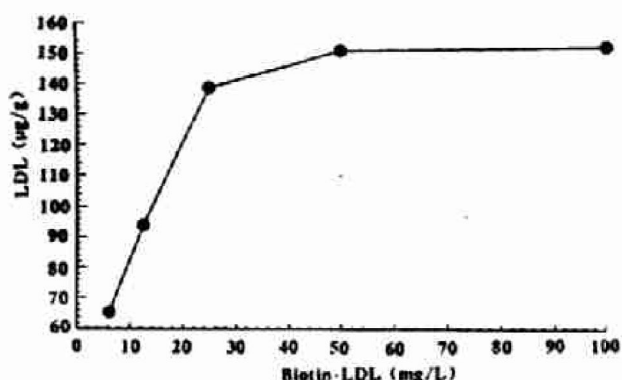


Figure 3. Specific binding curve of biotin-LDL to fibroblasts.

Table. Change of the binding amount of LDL to its receptor after addition of cell-modified LDL and PGE₂.

Groups	n	$\bar{x} \pm s$ (µg/g cell protein)
Contol	8	144 ± 8
PGE ₂ -LDL	7	100 ± 11 ^a
cm-LDL	7	54 ± 13 ^b

a: $P < 0.05$, PGE₂-LDL compared with cm-LDL group;

b: $P < 0.01$, cm-LDL compared with control group.

3 讨论

泡沫细胞的出现是 As 的早期改变。As 病变中的泡沫细胞主要来源于血液单核巨噬细胞。在多种因素作用下,血液单核细胞向内皮下迁移,转化成巨噬细胞,巨噬细胞通过其表面的清道夫受体识别并摄取氧化型 LDL,对之降解^[6]。但这些摄入细胞的氧化脂质对细胞有毒性作用,可破坏细胞内的酶系统使细胞对其降解下降引起脂质堆积和泡沫细胞形成^[7~9]。本次实验利用体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞与 LDL 共同孵育,结果 LDL 发生氧化修饰得到 cm-LDL,通过免疫细胞化学方法进一步证明 cm-LDL 可以通过激活 SR 途径进入巨噬细胞。为巨噬细胞可以在体内氧化修饰 LDL,并能摄取和蓄积氧化脂质而形成泡沫细胞提供了证据。本研究中,天然 LDL 有微弱着色,可能是天然 LDL 发生微弱氧化,存在少量氧化型 LDL 所致,或因巨噬细胞存在少量 LDLR,结合天然 LDL 使免疫细胞化学反应呈弱阳性。

目前,cm-LDL 对细胞 LDLR 影响的研究较少,本实验试图从 LDLR 方法面探讨 cm-LDL 的致 As 作用。因 LDL 对其受体的识别区

域具有进化上的保守性,即同一受体可结合不同物种的 LDL^[10]。本实验以易于取材和培养的小鼠皮肤纤维母细胞为模型。结果显示 cm-LDL 明显抑制纤维细胞 LDLR 对 LDL 的结合活性。表明氧化修饰的 LDL 对纤维母细胞或其表面受体有损伤作用,使 LDL 与其受体结合下降。正常情况下,血浆中的 LDL 约 2/3 由 LDLR 介导清除,若 LDL 在体内发生修饰后抑制 LDLR 活性,则可能会引起 LDL 清除下降,导致 LDL 水平升高,这使之更易浸润于动脉壁内皮下间隙的微环境中,与细胞发生相互作用而发生氧化修饰。这些经修饰的 LDL 又进一步促进单核巨噬细胞的聚集及其对氧化脂质的大量摄取而形成泡沫细胞。过量的脂质蓄积可致泡沫细胞崩解,有害物释放,加重 As 病变。如此恶性循环,使 As 病变从早期脂纹发展到纤维斑块和不可逆的粥样形成。

前列腺素 E₂ 对实验性 As 具双相作用,小剂量(<1 mg/L)促进 As 发展,大剂量则抗 As^[11]。在血清学及细胞学水平的实验研究显示大剂量 PGE₂ 抑制 LDL 的化学修饰^[12]和细胞修饰(另文发表)。本实验在以往研究基础上进一步从受体水平揭示大剂量 PGE₂ 抑制 SR 活性和泡沫细胞形成,抑制 cm-LDL 对纤维母细胞及其 LDLR 的损伤,有抗 As 作用。

参考文献

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989, 320: 915~924.
- 鄂征. 巨噬细胞培养. 见: 鄂征(主编). 组织培养技术. 第二版,北京: 人民卫生出版社, 1988; 185~189.
- 郭刚, 田俊敏, 谢用虹. 低密度脂蛋白的分离提纯与鉴定. 天津医学院学报, 1991, 1: 16~19.
- Roach PD, Noel SP. Biotinylation of low density lipoproteins via free amino groups without loss of receptor binding activity. *J Lipid Res*, 1987, 28: 1 508~514.
- 朱伟民, 楼定安. BA-ELISA 法测定培养细胞的低密度脂蛋白受体活性. 生物化学与生物物理学报. 1992, 24(3): 259~264.
- Yla-Herttuala S, Rosrnfeld ME, Parthasarathy S, et al. Localisation of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6 959~963.
- Zhang H, Basra HSK, Steinberg UP. Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages. *J Lipid Res*, 1990, 31: 1 361~369.
- Mander EL, Dean RT, Stanley KK, et al. Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1 212: 80~92.
- Roma P, Bernini F, Fogliatto R, et al. Defective catabolism of oxidized LDL by J774 murine macrophages. *J Lipid Res*, 1992, 33: 819~829.
- Young SG, Witztum JL, Casal DO, et al. Conservation of the low density lipoprotein receptor-binding domain of apoprotein B. Demonstration by a new monoclonal antibody, MB47. *Arteriosclerosis*, 1986, 6(2): 178~188.
- Qiu JM, Li Hong, Huang FQ. Effects of prostaglandin E₂ on experimental atherosclerosis. *Chin Med J*, 1987, 100(9): 703~708.
- 邱近明, 徐东波, 孙保存, 等. 前列腺素 E₂ 对 LDL 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.

(1997-02-06 收到, 1997-05-28 修回)