

## 白细胞介素-1 $\beta$ 上行调节兔血管平滑肌细胞极低密度脂蛋白受体 mRNA 的表达

阮秋蓉 石桥敏幸<sup>①</sup> 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

### Interleukin-1 $\beta$ Upregulates Very Low Density Lipoprotein Receptor mRNA Expression in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells of Rabbit

RUAN Qiu-Rong, Toshiyuki ISHIBASHI<sup>①</sup>, DENG Zhong-Duan

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China. <sup>①</sup> Fukushima Medical College, Fukushima, Japan)

#### ABSTRACT

**Aim** To investigate the condition of very low density lipoprotein (VLDL) receptor mRNA expression by smooth muscle cells (SMC).

**Methods** Rabbit aortic SMC was cultured by digestion method. Total RNA from cultured SMC with or without interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was extracted by the acidguanidium thiocyanate-phenol-chloroform method, followed by mRNA isolation using an oligo (dT)-cellulose column. The expression of specific VLDL receptor mRNA in SMC was determined by Northern blot analysis.

**Results** The VLDL receptor mRNA in cultured rabbit aortic SMC can be detected by Northern blot analysis. After cultured SMC exposure to 1  $\mu$ g/L of IL-1 $\beta$  for 15 h, the level of specific VLDL receptor mRNA increased by two fold as much as unstimulated cells.

**Conclusion** Cultured rabbit aortic SMC was able to express VLDL receptor mRNA, and IL-1 $\beta$  could up-regulate the expression of VLDL receptor mRNA in

the cultured SMC. It suggested that SMC might take in lipoproteins through VLDL receptor, and so became foam cells. IL-1 $\beta$  might be concerned with pathogenesis of atherosclerosis by its effect on SMC VLDL receptor mRNA expression.

**KEY WORDS** Lipoprotein receptor; Smooth muscle cell; Interleukin-1  $\beta$ ; Atherosclerosis

**摘要** 为了研究血管平滑肌细胞是否表达极低密度脂蛋白受体 mRNA, 采用 Northern blot 分析法检测培养兔主动脉平滑肌细胞表达极低密度脂蛋白受体 mRNA 的情况。结果发现, 培养兔主动脉平滑肌细胞可以表达极低密度脂蛋白受体 mRNA; 而且, 细胞因子白细胞介素-1 $\beta$  能使表达增强约 2 倍。提示极低密度脂蛋白受体有可能参与动脉平滑肌细胞源性泡沫细胞; 白细胞介素-1 $\beta$  上行调节平滑肌细胞表达极低密度脂蛋白受体 mRNA 可能是其参与动脉粥样硬化斑块形成途径之一。

**关键词** 脂蛋白受体; 平滑肌细胞; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化斑块中脂质的主要来源是富含胆固醇的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)<sup>[1]</sup>, 进入内皮下间隙的 LDL 可被动脉内皮细胞、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 修饰转变成氧化型 LDL 和乙酰化 LDL 等, 从而通过巨噬细胞表面的清道夫受体和 CD36 被大量摄取成为巨噬细胞源性泡沫细胞<sup>[2,3]</sup>。泡沫细胞不仅来源于巨噬细胞, SMC 也是其来源之一。SMC 通过何种受体摄取脂质, 目前尚不清楚。最近研究资料表明极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 是动脉粥样硬化的独立危险因素。本研究采用

① 日本福岛县立医科大学, 福岛

Northern blot 分析法检测培养的兔主动脉 SMC 是否表达 VLDL 受体 mRNA, 为阐明 SMC 摄取脂蛋白转变成泡沫细胞的机制提供新的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 平滑肌细胞培养及 mRNA 的制备

采用酶消化法培养 SMC。在无菌条件下取出正常日本大耳白兔胸主动脉中膜内层, 切成小块, 37℃ 下依次用 3 mg/L 胶原酶 (Sigma 公司), 1 g/L 弹性蛋白酶 (Sigma 公司) 及 3 mg/L 胶原酶消化 1~2 h, 至组织块消失。1 000 r/min 离心 10 min 后, 用含 20% 胎牛血清的 M199 培养液 (Gibco 公司) 悬浮细胞并种于培养瓶, 置培养箱内培养。待第 3 至 6 代 SMC 生长融合后, 换成无血清 M199 培养液, 分别加或不加入白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 1  $\mu$ g/L ( $2 \times 10^4$  u/g, Otsuka 公司, 日本), 37℃ 继续培养 15 h。然后将 SMC 消化下来, 用异硫氰酸胍方法提取细胞总 RNA<sup>[1]</sup>, 用寡聚 T (Oligo-d(T)) 纤维素柱提取其 mRNA。

### 1.2 Northern blot 分析

将经乙二醛处理的 mRNA 样本每孔 5  $\mu$ g 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶上, 电泳 3 h 后, 用 20 $\times$  SSPE 溶液将凝胶中的 mRNA 转移到尼龙膜上 (Hybond N, Amersham, UK), 42℃ 预杂交 3 h (杂交液: 50% 甲酰胺, 5 $\times$  SSPE, 5 $\times$  Denhardt 溶液, 1% SDS, 200 mg/L 变性断裂的鲑鱼 DNA) 后, 换成含  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 标记 0.46 kb 兔 VLDL 受体 cDNA 探针的杂交液杂交 16 h, 58℃ 下, 分别用 2 $\times$  SSPE, 0.1% SDS 和 1 $\times$  SSPE, 0.1% SDS 洗膜 2 次和 1 次, 每次 5 min。置尼龙膜于暗盒中, -70℃ 使感光胶片显影 4~24 h。显影后的尼龙膜经煮沸的 0.5% SDS 水溶液处理后用于再杂交, 再杂交探针为 0.18 kb 兔 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) cDNA 片段, 用以监测各样本量的一致性。按各自显影图像用光密度仪扫描, 检测各杂交带的相对积分吸光度值, 用以衡量 mRNA 表达水平。

## 2 结果

图 1 (Figure 1) Northern blot 分析显示, 培养的兔胸主动脉 SMC 及经 IL-1 $\beta$  作用 15 h 后的 SMC 均可表达 VLDL 受体 mRNA。其杂交带相对积分吸光度分别为 3.38 和 6.86。经 IL-1 $\beta$  刺激后, SMC VLDL 受体 mRNA 表达水

平明显增强, 约为作用前的 2 倍 (图 2, Figure 2)。此实验重复三次, 所得结果基本一致。

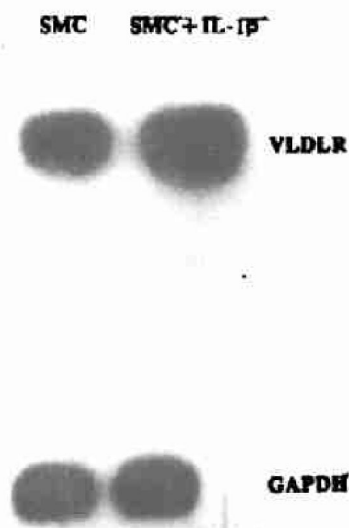


Figure 1. Expression of VLDL receptor mRNA by SMCs.

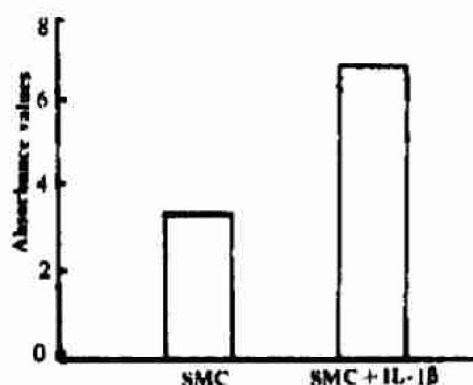


Figure 2. Densitometry scans of Northern blots of VLDL receptor mRNA.

## 3 讨论

关于动脉 SMC 摄取脂蛋白的机制尚不清楚。SMC 表面的 LDL 受体可特异结合摄取 LDL、 $\beta$  VLDL、乳糜微粒残粒和 VLDL 残粒。尽管 SMC 表面的 LDL 受体活性的向下调节不太灵敏, 但当细胞内游离胆固醇增多时仍可反馈抑制 LDL 受体的转录。事实上, 通过原位杂交也没有发现人的动脉粥样硬化病变中有

LDL 受体 mRNA 表达<sup>[5]</sup>。而且,巨噬细胞表面只表达少量的 LDL 受体,并形成下调,这提示 LDL 受体可能并不是动脉粥样硬化血管壁脂蛋白代谢的主要受体。由此推测,除了 LDL 受体外,可能存在其它脂蛋白受体参与 SMC 摄取脂蛋白。曾有报道,兔血管 SMC 表面也存在清道夫受体<sup>[6]</sup>,但其表达水平很低。而且,免疫组织化学研究显示,动脉粥样硬化病变中的 SMC 并不表达清道夫受体<sup>[7]</sup>,说明清道夫受体对于 SMC 摄取脂质并不十分重要。

极低密度脂蛋白受体于 1992 年由 Takahashi 等<sup>[8]</sup>发现,其分子结构与 LDL 受体非常相似,都属于 LDL 受体家族,但它们在组织中的分布完全不同。VLDL 受体主要分布于肌肉组织、心肌和脂肪组织。对 VLDL 受体是否存在于血管以及其病理生理作用如何所知甚少。本研究结果表明培养的兔主动脉 SMC 能表达 VLDL 受体 mRNA,而且其表达水平受 IL-1 $\beta$  刺激而明显增强。说明 SMC 表达 VLDL 受体 mRNA 可被调节。IL-1 $\beta$  是一种参与动脉粥样硬化斑块形成的细胞因子,可由动脉内皮细胞和 SMC 产生<sup>[9]</sup>。IL-1 $\beta$  能刺激血管内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1,它与 PDGF 或单核细胞源生长因子共同作用能促进血管 SMC 增殖,本研究证明 IL-1 $\beta$  还能刺激动脉 SMC 表达高水平的 VLDL 受体 mRNA。提示 VLDL 受体有可能参与动脉 SMC 摄取脂质而形成 SMC 源性泡沫细胞;IL-1 $\beta$  上行调节 SMC 表达 VLDL 受体 mRNA 可能是其参与动脉粥样硬化斑块形成的途径之一。

参考文献

1 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond

cholesterol: Modifications of low density-lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989, **320** (4): 915~924.

2 Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, et al. Expression of type I and bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: Lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(11): 4 931~935.

3 Endemann G, Atanton LW, Madden KS, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1993, **268**(16): 11 811~816.

4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156~159.

5 Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, et al. Gene expression in macrophage rich human atherosclerotic lesions: 15 lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific-lipid protein adducts. *J Clin Invest*, 1991, **87**(4): 1 146~152.

6 Pitas RE. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1990, **265**(21): 12 722~727.

7 Luoma J, Hiltunen T, Sarkioja T, et al. Expression of alpha 2 macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1991, **93**(5): 2 611~621.

8 Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, et al. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(19): 9 252~256.

9 Moyer CE, Sajuthi D, Tuili H, et al. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1991, **138**(4): 951~960.

(1998-02-28 收稿, 1998-08-25 修回, 编辑: 朱安霞)