

氧化型脂蛋白诱导血管平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白-1

于光耀^① 邓仲端 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

Oxidized Lipoproteins Induce Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Vascular Smooth Muscle Cells

YU Guang-Yao, DENG Zhong-Duan and QU Zhi-Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim To understand whether low density lipoproteins (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), especially oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and oxidized very low density lipoprotein (ox-VLDL) have effects on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA and protein in cultured calf aortic smooth muscle cells (SMCs).

Methods After a 24-hour exposure to LDL, ox-LDL, VLDL and ox-VLDL respectively, the total RNA in calf aortic SMCs was extracted by using the guanidinium isothiocyanate method. The MCP-1 mRNA expression in SMCs was examined by slot blot analysis using a γ -³²P-end-labeled 35 mer oligonucleotides probe of MCP-1. Meanwhile, MCP-1 protein content in the SMC conditioned media (SMC-CM) of each group was determined by sandwich ELISA.

Results Cultured calf aortic SMCs were able to express MCP-1 mRNA and protein, the level of MCP-1 mRNA in SMCs and the concentration of MCP-1 protein in SMC-CM were increased significantly after a 24 hour-exposure to ox-LDL and ox-VLDL, respectively, whereas the expression of MCP-1 mRNA and protein was only slightly increased when exposed to LDL

and VLDL.

Conclusion ox-LDL and ox-VLDL can induce a strong expression of MCP-1 in cultured SMCs.

KEY WORDS Lipoprotein; Muscle, smooth, vascular; Monocyte chemoattractant protein; Atherosclerosis

摘要 为了解脂蛋白对平滑肌细胞的单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 和蛋白表达的影响,在牛主动脉平滑肌细胞培养基中分别加入低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白,培养 24 h,用异硫氰酸胍法提取细胞的总 RNA,用 γ -³²P 末端标记的单核细胞趋化蛋白-1 的寡核苷酸探针进行狭缝杂交分析,检测平滑肌细胞的单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 的表达。同时用夹心酶联免疫吸附试验检测条件培养基中单核细胞趋化蛋白-1 的蛋白含量。结果发现,培养的牛主动脉平滑肌细胞能表达单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 及蛋白,氧化型低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白使其单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 的表达明显增强,同时也使其条件培养基中单核细胞趋化蛋白-1 的蛋白水平增加,而低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白仅使平滑肌细胞中单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 和蛋白的表达轻度增加。提示氧化型低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白能诱导平滑肌细胞表达高水平的单核细胞趋化蛋白-1。

关键词 脂蛋白; 肌,平滑,血管; 单核细胞趋化蛋白; 动脉粥样硬化

单核细胞迁入内皮下间隙,经活化而分化成巨噬细胞,摄取脂质形成泡沫细胞,构成动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的早期病变^[1]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是活性很强的单核细胞趋化因子,能特异性地趋化单核细胞,在体外可由包括平滑肌细胞(smooth

本文为国家自然科学基金资助项目(39470289)

^①现在中国科学院上海生物化学研究所

muscle cell, SMC)的多种细胞分泌^[1~3]。MCP-1在培养的SMC中的表达和分泌受多种因素包括脂蛋白和细胞因子等的调节^[1~4]。本研究探讨低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)和氧化型极低密度脂蛋白(oxidized very low density lipoprotein, ox-VLDL)能否诱导其表达高水平的MCP-1,以阐明氧化型脂蛋白,尤其是ox-VLDL在动脉粥样硬化发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 脂蛋白的分离和氧化

取健康人新鲜血,用超速梯度离心法分离出LDL和VLDL。加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuCl_2 20 $^\circ\text{C}$ 24 h,使其被氧化修饰^[5]。测定硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)值,以判定脂蛋白是否已被氧化修饰。LDL和VLDL的TBARS值为1.2~3.2 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白,氧化型LDL和氧化型VLDL的TBARS值为63.0~78.5 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白,表明LDL和VLDL已经氧化生成ox-LDL和ox-VLDL。

1.2 平滑肌细胞培养及条件培养基的收集

无菌条件下取新生小牛胸主动脉,剥净血管外膜结缔组织,纵行剪开动脉,将其平铺于硅胶板上并固定四角,剥下内膜及中膜的1/3,将其切成1~2 mm^2 的组织块,种植于培养瓶中,在5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养,所用培养基为含10%胎牛血清的M199培养基,每隔三天换液一次^[6],待SMC生长融合后进行传代培养。

取3~5代呈“峰与谷”样生长的SMC,随机分组,弃去原培养基,换成DME/F12无血清培养基,并在其中分别加入终浓度为25 mg/L 的LDL、VLDL、氧化型LDL和氧化型VLDL,培养24 h,收集各组的条件培养基(SMC-CM)。同时用异硫氰酸胍方法提取细胞总RNA^[7]。

1.3 狭缝杂交分析

杂交用探针为35 mer碱基组成的寡核苷酸^[8],它

与MCP-1 cDNA序列的257~291互补,探针序列为5'-CGGATGTTGGGTTTGCTTGTCAGGTG GTC-CATGG-3' (由西安医科大学免疫病理学研究室协助合成)。探针用 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 进行5'末端标记。用狭缝杂交点样器将总RNA样本点于硝酸纤维素膜上,80 $^\circ\text{C}$ 干烤2 h。57 $^\circ\text{C}$ 预杂交4 h,加入 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 标记的寡核苷酸探针57 $^\circ\text{C}$ 杂交过夜,杂交膜于57 $^\circ\text{C}$ 用清洗液漂洗4次。晾干后将杂交膜置于X光胶片盒中,-70 $^\circ\text{C}$ 曝光72 h,经显影、定影后用TJTY-300图像分析系统测定各狭缝的积分吸光度值。

1.4 夹心酶联免疫吸附试验

参照Evanoff等^[8]的方法进行。用MCP-1多克隆抗体(中国军事医学科学院叶棋浓博士提供)包被酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)酶标板各孔,4 $^\circ\text{C}$ 24 h。继用清洗缓冲液洗板孔3次,并用小牛血清阻断各孔,加入MCP-1标准品(Gibco) 100 μL (浓度从0.1 $\mu\text{g/L}$ 至10 $\mu\text{g/L}$)或SMC-CM 100 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 温育2 h。清洗板孔3次,每孔加MCP-1多克隆抗体100 μL 37 $^\circ\text{C}$ 温育2 h。清洗板孔3次,然后每孔加SPA-HRP 100 μL (1:100,武汉博士德公司),37 $^\circ\text{C}$ 温育2 h,清洗板孔3次。然后每孔加过氧化物酶底物100 μL (0.67 g/L 邻苯二胺;25 mmol/L 柠檬酸缓冲液,pH 5.0;20 nmol/L 过氧化氢),室温下显色5~10 min,每孔加入50 μL 2 mol/L H_2SO_4 以终止反应。在酶标仪上测量其颜色吸收率(波长490 nm),根据MCP-1浓度的标准曲线确定条件培养基中MCP-1的含量。

2 结果

2.1 Slot blot 分析

培养的平滑肌细胞暴露或不暴露于各种脂蛋白后其RNA与MCP-1探针杂交,放射自显影图像显示具有不同积分吸光度的狭缝(图1, Figure 1)。平滑肌细胞分别暴露于ox-LDL和ox-VLDL后,其MCP-1 mRNA表达的积分吸光度值分别为5.97和5.72,明显高于对照组(0.72),分别是对照组的8.2倍和7.9倍。LDL和VLDL组的积分吸光度值介于前两组和对照组之间,分别为1.07和0.90。

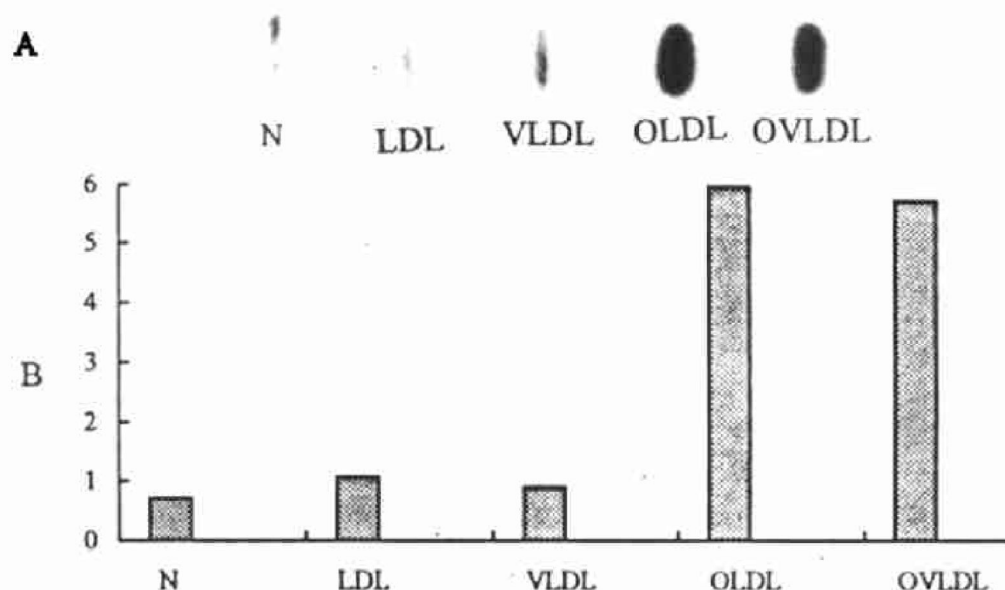


Figure 1. Expression of MCP-1 mRNA in smooth muscle cells induced by lipoproteins, the SMCs were incubated with 25 μg of LDL, VLDL, ox-LDL and ox-VLDL per mL for 24 hours at 37 $^{\circ}\text{C}$. (A) Total RNA was extracted and slot blot analysis was performed using a MCP-1 probe. (B) A densitometric scanning analysis of the autoradiographs. N: control group.

Table. Determination of MCP-1 protein in conditioned media (CM) ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$).

Groups	n	MCP-1
CM	12	0.620 ± 0.011
LDL-CM	12	0.690 ± 0.015^a
VLDL-CM	12	0.710 ± 0.016^a
ox-LDL-CM	12	1.310 ± 0.022^b
ox-VLDL-CM	12	1.450 ± 0.027^b

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.001$, compared with CM group.

2.2 单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量

各组 SMC-CM 中的 MCP-1 蛋白含量经夹心 ELISA 检测, 结果显示, SMC 分别暴露于 ox-LDL 和 ox-VLDL 后, 其条件培养基中的 MCP-1 蛋白含量 (分别为 $1.31 \pm 0.022 \mu\text{g/L}$ 和 $1.45 \pm 0.027 \mu\text{g/L}$) 明显高于对照组 ($0.62 \pm 0.011 \mu\text{g/L}$), 分别是对照组的 2.1 倍和 2.3 倍, 差异非常显著 ($P < 0.001$), 然而 LDL 组和

VLDL 组 MCP-1 蛋白含量无明显增加 ($P > 0.05$) (附表, Table)。

3 讨论

单核巨噬细胞源性泡沫细胞在内膜下聚集是动脉粥样硬化的早期病变。虽然单核细胞迁入内膜受多种趋化物质的影响, 但最主要的是单核细胞趋化蛋白-1。Cushing 等^[2]的研究证明, 培养的 SMC 能分泌 MCP-1, 且轻度修饰的 LDL (mm-LDL) 能促进其 MCP-1 的生成及其 mRNA 的表达, 同时还能直接趋化单核细胞。因此 mm-LDL 可以直接或间接地招引单核细胞迁入动脉内膜, 导致动脉粥样硬化早期病变的形成。随着动脉粥样硬化病变的进展, 中膜 SMC 受细胞因子等刺激, 发生表型转变和增殖并迁入内膜, 摄取脂质, 参与泡沫细胞的构成^[1]。这些 SMC 不仅可分泌细胞因子, 如

PDGF、MCP-1 等,还可合成细胞外基质等导致纤维斑块的形成,因此血管壁 SMC 在动脉粥样硬化的发病过程中具有非常重要的作用^[2]。

Nelken 等^[9]用原位杂交法检出动脉粥样硬化斑块中 SMC 有 MCP-1 mRNA 的表达。动物实验也证实,在食饵性猴高胆固醇血症动脉粥样硬化模型中,动脉壁 MCP-1 mRNA 表达水平增高,免疫组织化学和原位杂交法证明,动脉中膜 SMC 和增厚的内膜 SMC 及单核细胞均表达 MCP-1 蛋白和 mRNA。SMC 通过合成 MCP-1 而招引血液单核细胞迁入血管壁,从而在动脉粥样硬化发展的各个时期发挥着重要作用^[10]。

不仅 mm-LDL 和一些细胞因子(如血小板衍生生长因子)能刺激 SMC MCP-1 的表达^[2,4],脂蛋白尤其是 ox-VLDL 也能使兔主动脉 SMC MCP-1 表达增强^[3],但培养的牛主动脉 SMC MCP-1 的表达及其影响因素尚不清楚。本文结果表明培养的牛主动脉 SMC 能表达 MCP-1, ox-LDL 可使其 MCP-1 的表达增强。同时, VLDL 及 ox-VLDL 亦使牛主动脉 SMC 的 MCP-1 的 mRNA 表达增强,并以后者的作用更显著。我们推测脂蛋白,尤其是氧化型脂蛋白(ox-LDL 和 ox-VLDL)在动脉粥样硬化的发生、发展中起着重要作用。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- 2 Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cell and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(13): 5 134~138.
- 3 Ruan QR, Deng ZD, Song JX. Very low density lipoprotein and oxidized very low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein 1 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Chin Med J Engl*, 1996, **109**(3): 206~209.
- 4 Poon M, Hus WC, Bogdanov VY, et al. Secretion of monocyte chemotactic activity by cultured rat aortic smooth muscle cells in response to PDGF is due predominantly to the induction of JE/MCP-1. *Am J Pathol*, 1996, **149**(1): 307~317.
- 5 Zawadzki Z, Milne RW, Marcel YL, et al. Cu²⁺ mediated oxidation of dialyzed plasma: effects on low and high density lipoprotein and cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*, 1991, **32**(2): 243~250.
- 6 邓仲端. 平滑肌细胞培养及其在动脉粥样硬化研究中的意义. 见: 陈钦材(主编). 病理学进展. 北京: 人民卫生出版社, 1987, 182~201.
- 7 Chomczynski P, Sacchi NI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156~159.
- 8 Evanoff HL, Burdick MD, Moore SA, et al. A sensitive ELISA for the detection of human monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1). *Immunol Invest*, 1992, **21**(1): 39~45.
- 9 Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*, 1991, **88**(4): 1 121~127.
- 10 Yu-X, Dluz S, Graves DT, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein-1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, **89**(15): 6 953~957.

(此文 1998-08-29 收到, 1998-11-25 修回)

(此文编辑: 朱雯霞)