

# 氧化型脂蛋白(a)对鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响

张春妮, 庄一义, 吉维民<sup>1</sup>, 刘小转, 强红娟

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002; 1. 宝应县人民医院检验科)

[关键词] 脂蛋白; 巨噬细胞, 腹腔; 增殖; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨氧化型脂蛋白(a)对巨噬细胞增殖的影响, 采用细胞计数和 MTT 掺入观察比较天然型脂蛋白(a)、氧化型脂蛋白(a)和丙二醛修饰脂蛋白(a)对培养的鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响。结果发现, 氧化型脂蛋白(a)在蛋白浓度为 2.5~40 mg/L 时刺激巨噬细胞增殖, 蛋白浓度为 40 mg/L 时巨噬细胞数为对照组的 1.5 倍 ( $P < 0.05$ )。而天然型脂蛋白(a)和丙二醛修饰脂蛋白(a)对巨噬细胞增殖无影响。结果提示, 氧化型脂蛋白(a)可能通过促进巨噬细胞增殖加速动脉粥样硬化的发展。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

## The Effect of Oxidized Lipoprotein(a) on the Growth of Murine Peritoneal Macrophages

ZHANG Chun- Ni, ZHUANG Yi- Yi, JI Wei- Min, LIU Xiao- Zhuan, and QIANG Hong- Juan

(Department of Medical Laboratory Science, Nanjing General Hospital of People's Liberation Army, Nanjing 210002, China)

MeSH Lipoproteins; Macrophages, Peritoneal; Hyperplasia; Atherosclerosis

**ABSTRACT** **Aim** To examine the effect of oxidized lipoprotein(a) on the proliferation of macrophages. **Methods** Murine peritoneal macrophages were cultured in vitro with 2.5~40 mg/L native lipoprotein(a), oxidized lipoprotein(a) or MDA-modified lipoprotein(a), and cells proliferation was evaluated by cell counting and MTT assay. **Results** When macrophages were incubated with 40 mg/L oxidized lipoprotein(a), cell numbers were increased about 1.5-fold compared with control group, while the growth of these cells was not stimulated by native lipoprotein(a) or MDA-modified lipoprotein(a). **Conclusion** Oxidized lipoprotein(a) might enhance the progression of atherosclerosis by promoting macrophages proliferation.

巨噬细胞源性泡沫细胞在动脉粥样斑块呈增殖现象, 提示巨噬细胞源性泡沫细胞增殖在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展中起重要作用<sup>[1, 2]</sup>。国外研究发现, 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可以刺激巨噬细胞增殖<sup>[3]</sup>。已知血浆脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]浓度增高是 As 性心脑血管疾病的独立危险因素<sup>[4]</sup>。本文比较了天然型脂蛋白(a)[n-Lp(a)]、氧化型脂蛋白(a)[ox-Lp(a)]以及丙二醛修饰脂蛋白(a)[MDA-Lp(a)]对鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响, 旨在探讨脂蛋白(a)致 As 发生发展的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ICR 雄性小鼠(属远交群, 合格证号: 苏动质字 97001), 体重 25~30 g, 由南京军区南京总医院医

学实验动物中心提供。RPMI1640 为 Gibco 公司产品。MTT 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 脂蛋白分离

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)[ $d = (1.019 \sim 1.063) \times 10^3 \text{ g/L}$ ]系用密度梯度超速离心从人新鲜血浆中提纯。经 pH 7.4, 0.01 mol/L PBS 透析后, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存待用。蛋白含量按 Lowry 法<sup>[5]</sup>测定。参照文献[6], 人血浆脂蛋白(a)从富含脂蛋白(a)的人新鲜血浆经超速离心 [ $d = (1.060 \sim 1.10) \times 10^3 \text{ g/L}$ ] 和 Sepharose 6B 层析法提取。

### 1.3 脂蛋白氧化修饰

脂蛋白经 pH 7.4, 0.01 mol/L PBS 充分透析, 去除 EDTA-Na<sub>2</sub>, 蛋白浓度为 0.5 g/L, 加入 30  $\mu\text{mol/L}$  CuSO<sub>4</sub>, 37℃孵育 20 h 后, 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub> 透析终止反应, 除去多余的 Cu<sup>2+</sup>, 获得 ox-LDL 和 ox-Lp(a)。0.9 g/L 脂蛋白(a)与 45 mmol/L 丙二醛 37℃温育 24 h, 用 PBS 充分透析去除多余的丙二醛, 得到 MDA-Lp(a)。脂蛋白的氧化修饰程度采

[基金项目] 军队医药卫生科研基金资助(项目编号 98H005)

[作者简介] 张春妮, 女, 1963 年 1 月出生, 山东人, 生物化学专业硕士研究生, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, 已发表论文 20 余篇。

用琼脂糖凝胶电泳和硫代巴比妥酸值鉴定。

#### 1.4 鼠腹腔巨噬细胞培养

用 8 mL 冷 PBS 收集小鼠腹腔巨噬细胞, 离心, 弃上清, 加入适量含 5% 小牛血清、0.1 g/L 链霉素和  $1 \times 10^5$  单位/L 青霉素的 RPMI 1640 培养基。调整细胞浓度, 每孔 1 mL 细胞悬浮液接种于 24 孔培养板 ( $6 \times 10^7$  cell/L) 或每孔 0.1 mL 接种于 96 孔培养板 ( $4 \times 10^8$  cell/L), 置 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 2 h, 用 1640 培养基洗 3 次, 以洗去未贴壁细胞。

#### 1.5 细胞计数

在 24 孔培养板中分别加入 n- Lp(a)、ox- Lp(a)、MDA- Lp(a) 和 ox- LDL, 终浓度为 5 mg/L, 对照组不加脂蛋白。培养 6 天后, 去培养基, 参照文献[3], 贴壁(存活)细胞用 1% Triton x- 100(kg/L) 消化细胞, 苯酚蓝黑染, 细胞核计数。

#### 1.6 形态学观察

培养方法同细胞计数实验。培养 6 天后, PBS 洗 3 次, 用 10% 多聚甲醛固定 4 h, 再用猩红染色, 倒置显微镜观察。

#### 1.7 MTT 掺入实验

在 96 孔培养板中分别加入不同浓度(2.5、5.0、10、20、40 mg/L) 的脂蛋白, 对照组不加脂蛋白。培养 6 天, 加 MTT 5 g/L (10  $\mu\text{L}$ /孔), 继续孵育 4 h, 加二甲基亚砜, 震荡 10 min, 酶标仪波长 490 nm 读 A 值。

#### 1.8 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 部分数据比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

#### 2.1 脂蛋白氧化修饰程度鉴定

脂蛋白的硫代巴比妥酸值见表 1 (Table 1)。脂

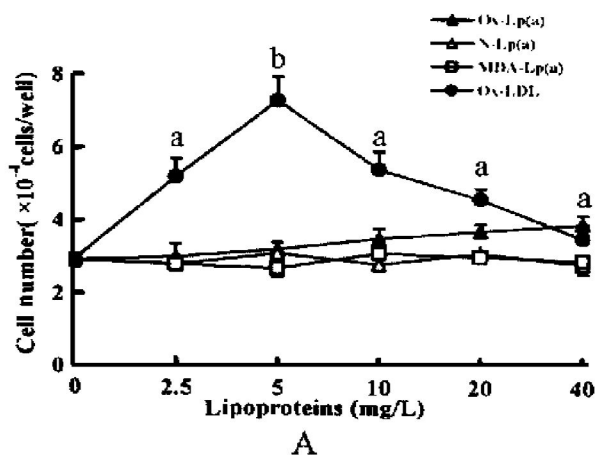


图2 脂蛋白(a)对巨噬细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of lipoprotein(a) on macrophages proliferation ( $n = 6$ ). A: cell counting assay; B: MTT assay. a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.005$ , compared with control.

蛋白琼脂糖凝胶电泳显示, ox- LDL 的电泳迁移率明显大于 LDL。ox- Lp(a) 与 MDA- Lp(a) 的电泳迁移率明显大于 n- Lp(a), 其中 MDA- Lp(a) 的迁移率最大 (图 1, Figure 1)。

表1 脂蛋白的硫代巴比妥酸值

Table1 TBARS values of lipoproteins ( $\mu\text{mol/g}$ )

Groups	TBARS
N- LDL	0.73
Ox- LDL	35.4
N- Lp(a)	0.76
Ox- Lp(a)	22.5
MDA- Lp(a)	26.3

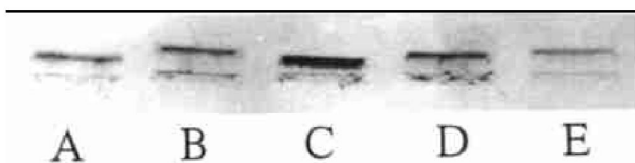
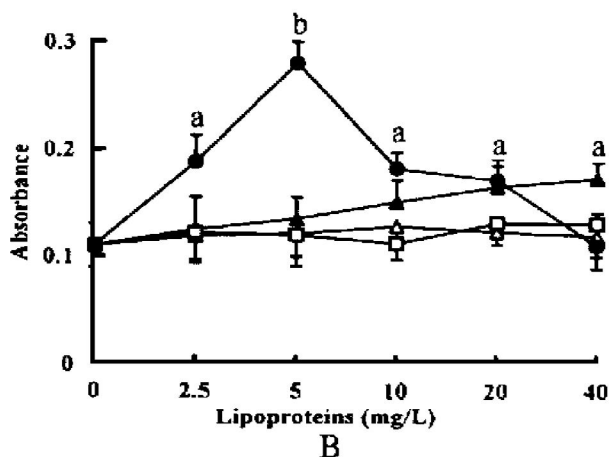


图1 脂蛋白琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis. A: n- LDL; B: ox- LDL; C: n- Lp(a); D: ox- Lp(a); E: MDA- Lp(a).

#### 2.2 脂蛋白对巨噬细胞增殖的影响比较

细胞计数实验显示, 蛋白浓度为 40 mg/L 时, ox- Lp(a) 组细胞数为对照组的 1.5 倍; 蛋白浓度在 2.5~40 mg/L 时, n- Lp(a) 和 MDA- Lp(a) 无显著促细胞增殖效应。ox- LDL 显著刺激巨噬细胞增殖, 浓度为 5 mg/L 时细胞数达到最高峰。MTT 实验结果与细胞计数实验结果一致, ox- Lp(a) 浓度为 40 mg/L 时, ox- Lp(a) 组  $\text{OD}_{490}$  ( $0.173 \pm 0.034$ ) 与对照组 ( $0.114 \pm 0.023$ ) 相比显著增高, 但其促细胞增殖能力低于 ox- LDL。ox- LDL 在较低浓度下 (2.5 mg/L) 即显著刺激细胞增殖 (图 2, Figure 2)。



### 3 讨论

近年来发现,在兔及人的动脉粥样病灶处不仅血管平滑肌细胞增殖,而且巨噬细胞也呈增殖现象。早期斑块的泡沫细胞来自于巨噬细胞,提示巨噬细胞增殖对动脉粥样硬化发生发展的重要性<sup>[2,7]</sup>。已发现多种生长因子、细胞因子等能促进巨噬细胞增殖。近年来又证实,脂蛋白对巨噬细胞生长有一定影响,体内致 As 脂蛋白 ox- LDL 可显著刺激巨噬细胞增殖<sup>[3]</sup>。我们以前的实验不仅证实了 ox- LDL 的细胞刺激效应,同时也发现氧化型极低密度脂蛋白(oxidized very low density lipoprotein, ox- VLDL)和氧化型高密度脂蛋白(oxidized high density lipoprotein, ox- HDL)与 ox- LDL 相似,具较强的促巨噬细胞增殖能力。本研究探讨体内另一个重要的致 As 危险因素脂蛋白(a)对鼠腹腔巨噬细胞生长的影响。结果发现,ox- Lp(a)不仅诱导巨噬细胞胆固醇蓄积转巨噬细胞为泡沫细胞,而且促巨噬细胞增殖。而 n- Lp(a)和 MDA- Lp(a)对巨噬细胞生长无影响。

已知血浆脂蛋白(a)浓度增高是 As 性心脑血管疾病的独立危险因素,但其机制目前仍不完全清楚。由于脂蛋白(a)含有多种不饱和脂肪酸,在机体抗氧化能力降低、抗氧化剂减少时,脂蛋白(a)与 LDL 一样也可发生氧化修饰<sup>[8]</sup>。脂蛋白(a)氧化修饰后,可被巨噬细胞清道夫受体(macrophage scavenger receptor, MSR)吞噬致细胞内胆固醇酯蓄积及泡沫细胞形成<sup>[9]</sup>。此外,ox- Lp(a)比 n- Lp(a)能更有效地与纤溶酶原竞争特有的细胞表面纤溶酶原受体,促进血栓形成。Sakai 等<sup>[3,10]</sup>研究发现,ox- LDL 分子中高含量的溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, lysoPC)在 ox- LDL 促巨噬细胞增殖中起关键作用,lysoPC 主要通过 MSR 途径摄取。由于脂蛋白(a)在化学组成上与 ox- LDL 相似,因此脂蛋白(a)氧化修饰后也发生类似 ox- LDL 的变化,lysoPC 含量显著升高。因此我们推测,lysoPC 有可能通过 MSR 途径,在 ox- Lp(a)促巨噬细胞增殖中起一定作用。与 ox- LDL 相比,ox- Lp(a)刺激细胞生长能力较弱,这可能是由于两者 lysoPC 含量不同及脂蛋白(a)含有独特的载脂蛋白(a)所致,还需进一步研究以明确 ox- Lp(a)促巨噬细胞增殖的关键因素和介导途径。Sato 等<sup>[11]</sup>报道 n- Lp(a)可以诱导大鼠腹

腔巨噬细胞增殖,而在本实验中我们没有发现 n- Lp(a)对小鼠腹腔巨噬细胞有增殖效应,两种结果的差异可能是两种实验所用动物细胞、实验条件等不同所致。

总之,本研究揭示 ox- Lp(a)与 ox- LDL 一样,可以促进巨噬细胞增殖。

### 参考文献

- [1] Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, et al. Cell proliferation in human coronary arteries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4600- 4604
- [2] Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat- fed rabbits [J]. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 680- 687
- [3] Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, et al. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 31430- 31436
- [4] Scanu AM, Lawn RM, Berg K. Lipoprotein(a) and atherosclerosis [J]. *Ann Intern Med*, 1991, **115**: 209- 218
- [5] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265- 275
- [6] 张春妮, 庄一义, 汪俊军, 等. 修饰的脂蛋白(a)在动脉粥样硬化中的作用. *南京大学学报*, 1995, **31**: 149- 153
- [7] Spagnoli LG, Orlandi A, Scaneusano G. Foam cells of rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype [J]. *Atherosclerosis*, 1991, **88**: 87- 92
- [8] Naruszewicz M, Selinger E, Davignon J. Oxidative modification of lipoprotein of lipoprotein(a) and the effect of  $\beta$ - carotene [J]. *Metabolism*, 1992, **41**: 215- 224
- [9] Jurgens G, Ashy A, Esterbauer H. Detection of new epitopes formed upon oxidation of low density lipoprotein, lipoprotein(a) and very low density lipoprotein. Use of an antiserum against 4- hydroxynonenal- modified low density lipoproteins [J]. *Biochem J*, 1990, **265**: 605- 608
- [10] Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, et al. The scavenger receptor served a route for internalization of lysophosphatidylcholine in oxidized low density lipoprotein- induced macrophage proliferation [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 27346- 27352
- [11] Sato Y, Kobori S, Sakai Masakazu, et al. Lipoprotein(a) induces cell growth in rat peritoneal macrophages through inhibition of transforming growth factor-  $\beta$  activation [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **125**: 15- 26

(此文 2000- 03- 07 收到, 2000- 07- 22 修回)

(此文编辑 文玉珊)