

# CD36 介导氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡

杨向东, 李红霞<sup>1</sup>, 王 抒<sup>1</sup>, 黎 健<sup>1</sup>, 李全忠, 杨和平, 杨永宗

( 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 1. 卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

[主题词] CD36; 清道夫受体; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 泡沫细胞; 凋亡

[摘 要] 为探讨清道夫受体 CD36 在氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞泡沫化和凋亡中的作用, 用氧化型低密度脂蛋白温育 U937 细胞, 观察 U937 细胞泡沫化过程中 CD36 的表达时序和泡沫细胞的凋亡; 用 CD36 单克隆抗体阻断 U937 细胞的吞噬作用, 观察 U937 细胞吞噬蓄积胆固醇和细胞凋亡的改变。细胞胆固醇以修饰的酶荧光法测定; 用流式细胞术检测异硫氰酸荧光素- 抗 CD36 单克隆抗体特异标记的 CD36 和细胞的凋亡情况; 用逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 的表达。结果发现, 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与 U937 细胞温育 24 h 可增加细胞内总胆固醇, 48 h 时可形成典型的泡沫细胞; CD36 表达呈现时序性改变, 6 h 即可检出 CD36 表达增高, 24 h 达到最高值, 48 h 表达略有降低, CD36 mRNA 的转录与 CD36 的表达一致。用 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与 U937 细胞温育 24 h 可见 U937 细胞出现凋亡, 48 h 后凋亡峰最明显, 预先用 CD36 单克隆抗体阻断可使氧化型低密度脂蛋白致 U937 细胞凋亡明显减少。实验结果提示, CD36 介导 U937 细胞吞噬蓄积氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞, 并最终出现凋亡; 内吞蓄积的氧化型低密度脂蛋白对 CD36 无负反馈调节。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

## Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Foam Cell Formation and Apoptosis in U937 Cell Mediated by CD36, One Kind of Scavenger Receptor BI

YANG Xiang- Dong, LI Hong- Xia<sup>1</sup>, WANG Shu<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, LI Quan- Zhong, YANG He- Ping, and YANG Yong- Zong  
(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001; 1. Department of Biochemistry, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing 100730, China)

**MeSH** CD36; Scavenger Receptor BI; Lipoprotein, LDL, Oxidized; Foam Cell; Apoptosis

**ABSTRACT** **Aim** To explore the role of CD36 in foam cell formation and apoptosis and the time course of expression of CD36 gene and protein in macrophages foamy process induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

**Methods and Results** Human myeloid leukemia U937 cells were incubated with ox-LDL (80 mg/L) for time course(6 h, 12 h, 24 h or 48 h) treatment. Total cholesterol in U937 cells increased from 143.5 to 419.2 mg/g protein. Flow cytometric analysis results revealed that CD36 protein expression increased from 6 h to 48 h induced by ox-LDL and was highest at 24 h. RT-PCR results showed that CD36 mRNA level increased with time order. The apoptotic cells were determined by flow cytometry and DNA fragmentation assay. Ox-LDL(200 mg/L) could induce U937 cell apoptosis after 24 h and increase after 48 h. Apoptosis were reduced by pre- incubation U937 cell with CD36 monoclonal antibody. **Conclusions** U937 cell could bind and internalize ox-LDL and formation in foam cell mediated by CD36. Later, apoptosis of U937 cell after incubated with ox-LDL also mediated by CD36. Accumulation of cholesteryl esters in U937 cells has no negative feedback control on CD36 gene and protein expression.

CD36 是细胞表面糖蛋白, 广泛存在于单核/巨噬细胞、血小板、微血管内皮细胞、脂肪细胞、红细胞前体和某些肿瘤细胞系等多种细胞, 可与多种配体如血小板、细胞外基质凝血酶敏感蛋白(TSP)、iv型和Ⅲ型胶原、疟原虫感染的红细胞、聚阴离子磷脂、长链脂肪酸、氧化和乙酰化修饰的低密度脂蛋白等结合。研究发现 CD36 氨基酸顺序和清道夫受体 B

(SR-BI) 有 30% 的同源性, 是一种多功能的清道夫受体<sup>[1]</sup>。文献[2]报道, 转染 CD36 的 293 细胞对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 具有很高的特异性亲和力, 且能介导 293 细胞对 ox-LDL 的内吞和降解, 单核细胞吞噬脂质约一半是由 CD36 介导。U937 细胞为人髓系白血病单核细胞株, 主要表达 LDL 受体与 CD36, 我们用 ox-LDL 与 U937 孵育 48 h, 促使 U937 细胞内总胆固醇及胆固醇酯明显增加, 胆固醇酯占总胆固醇的 60% 以上,

形成泡沫细胞<sup>[3]</sup>。本实验观察 CD36 在 U937 细胞经 ox-LDL 刺激泡沫化过程中的表达情况, CD36 单克隆抗体对 ox-LDL 诱导 U937 脂质蓄积和细胞凋亡的拮抗作用, 探讨 CD36 在 U937 细胞泡沫化和凋亡中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人髓系白血病细胞 U937 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。Trizol Reagent 购自 GIBCO, Reverse transcription system 和 PCR core system 购自 Promega, CD36 和 GAPDH 引物由赛百盛公司合成, 异硫氰酸荧光素-抗 CD36 和抗 CD36 单克隆抗体购自美国 Phamingen 公司, 总胆固醇酶法测定试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆 LDL ( $d = 1.03 \sim 1.05$ ) 采用超速离心法分离, 经琼脂糖电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫电泳, 均显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含  $10 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  的 PBS 溶液 (pH 7.2) 中,  $37^\circ\text{C}$  温育 24 h。氧化后的 LDL 置含  $200 \mu\text{mol/L}$  EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 过滤除菌后  $4^\circ\text{C}$  保存。LDL 中的脂过氧化物 (lipoperoxide, LPO) 在氧化过程中增加, 颜色也由淡黄变为乳白, LPO 由  $1.8 \mu\text{mol/g}$  增至  $15.8 \mu\text{mol/g}$ 。

### 1.3 实验分组

为观察 CD36 在 ox-LDL 致 U937 泡沫化和凋亡中的作用, 采用抗 CD36 单克隆抗体封闭受体 ( $2.5 \text{ mg/L}$ )<sup>[2]</sup>。实验分为 2 组: ox-LDL 处理组 (ox-LDL treated group) 和 anti-CD36 拮抗组 (anti-CD36+ ox-LDL treated group)。于 0 h、24 h、48 h 收集细胞, 参照文献[4] 抽提细胞内胆固醇, 酶法测定总胆固醇, 用 Lorry 氏法测蛋白, 以  $1 \text{ mg}$  蛋白定量细胞总胆固醇。参照文献[5] 处理细胞, 采用流式分析方法观察细胞周期变化。

### 1.4 流式细胞术检测 CD36 的表达

依次于 0 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 各收集细胞  $1 \times 10^6$  个,  $800 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$  离心,  $4^\circ\text{C}$  PBS 洗一次。用 4% 多聚甲醛  $1 \text{ mL}$  室温固定 40 min。用含 5% 人血清 PBS  $1 \text{ mL}$  重悬, 冰上孵育 10 min,  $800 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$  离心去上清, 加入  $200 \mu\text{L}$  含 0.5% BSA 和饱和剂量的 FITC-anti-CD36 ( $2.5 \times 10^{10}/\text{L}$ ) 的 PBS, 避光冰上放置 30 min, 加入  $200 \mu\text{L}$  1% 多聚甲醛。用流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 10 000 个细胞。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 水平

提取各时点细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。以 GAPDH 为内对照, 进行半定量逆转录聚合酶链反应, GAPDH sense ( $5'$ -TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTT), antisense ( $5'$ -CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC), 983 bp; CD36 sense ( $5'$ -GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT), antisense ( $5'$ -TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG), 389 bp。PCR 产物用含  $0.5 \text{ mg/L}$  溴化乙啶的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞内总胆固醇的测定

U937 细胞能通过 CD36 受体介导途径吞噬 ox-LDL 并在细胞内蓄积, 随温育时间延长, 细胞内胆固醇蓄积增多。使用抗 CD36 单克隆抗体阻断, 可显著减少细胞内胆固醇蓄积。

表 1 氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞和抗 CD36 单克隆抗体阻断后细胞内胆固醇含量

Table 1 Accumulation of total cholesterol (TC) in U937 cells exposed to ox-LDL/ anti-CD36+ ox-LDL ( $\bar{x} \pm s$ , mg/g)

| Groups             | 0 h            | 24 h                | 48 h                 |
|--------------------|----------------|---------------------|----------------------|
| Ox-LDL             | $143.5 \pm 12$ | $282.6 \pm 10^a$    | $419.2 \pm 15^{ac}$  |
| Anti-CD36 + ox-LDL | $137.6 \pm 11$ | $190.5 \pm 10^{ab}$ | $266.7 \pm 14^{abc}$ |

a:  $P < 0.05$ , compared with 0 h group; b:  $P < 0.05$ , compared with ox-LDL group; c:  $P < 0.05$ , compared with ox-LDL/ anti-CD36+ ox-LDL (24 h)。

### 2.2 U937 细胞 CD36 表达的免疫荧光摄影

应用结合 FITC-antiCD36 单克隆抗体的细胞悬液涂片, 荧光显微镜观察摄影。从图 1 (Figure 1) 可见对照组 U937 细胞膜表面结合的 FITC-antiCD36 单克隆抗体很少, ox-LDL 作用 6 h 后即可见细胞膜表面有绿色荧光带, 作用 24 h 后, 阳性细胞增多, 体积增大, 荧光增强 (箭头所指细胞为阳性细胞)。

### 2.3 流式细胞仪检测 CD36 的表达

从图 2 (Figure 2) 可以看到, 结合 FITC-antiCD36 单克隆抗体的各时间点 U937 细胞经流式细胞仪分析, ox-LDL 作用 6 h 后即可见 CD36 的表达增高, 24 h 时 CD36 的表达最高, 48 h 时 CD36 的表达较 24 h 略有降低, 但仍比对照组高。细胞内蓄积的 ox-LDL 对 CD36 的表达无负反馈调节。

### 2.4 U937 泡沫化过程中 CD36 mRNA 的表达

如上所述, ox-LDL 可以促进 CD36 受体的表达, 但此种增高是直接来源于 CD36 的胞浆至胞膜的移

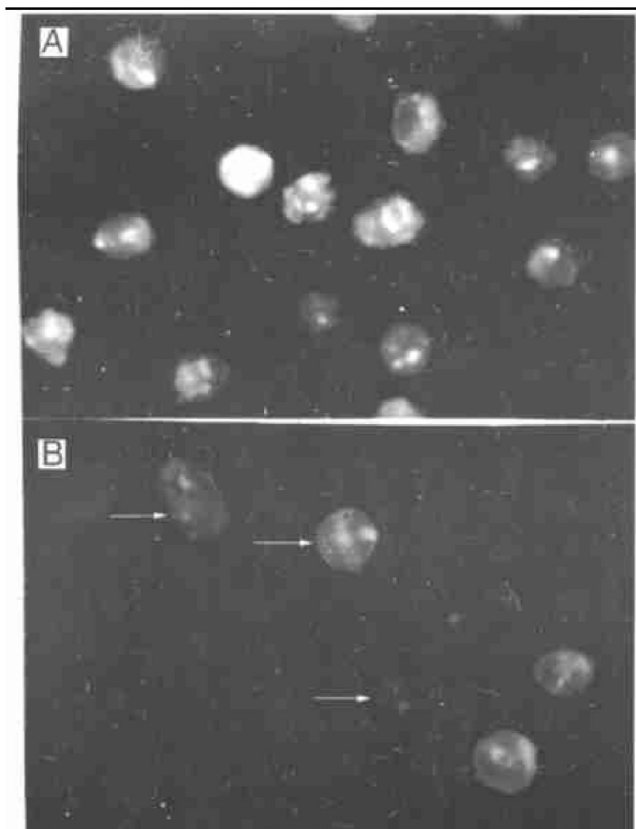


图1 FITC-抗 CD36 标记氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞的荧光显微摄影 ( $\times 400$ )

**Figure 1 Expression of CD36 in U937 cells.** U937 cells were incubated with 80 mg/L ox-LDL, and 24 h later fixed with paraformaldehyde and immunostained with the anti CD36 antibody. A: control group, B: ox-LDL treated for 24 h ( $\times 400$ , arrow head indicate)

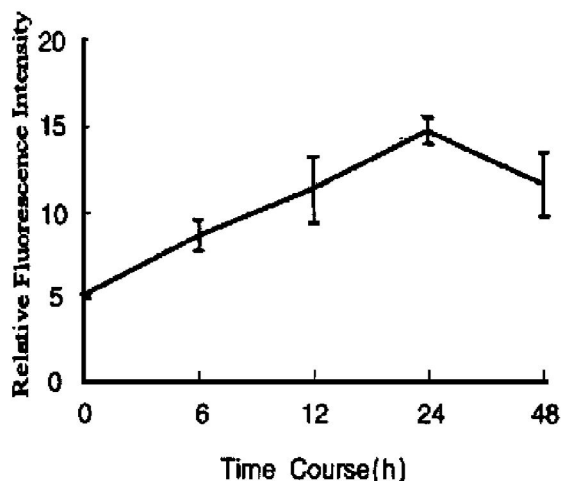


图2 流式细胞术检测氧化型低密度脂蛋白处理 U937 细胞的 CD36 的表达

**Figure 2 Expression of CD36 protein on U937 cells incubated with 80 mg/L ox-LDL** (10 000 cells/sample,  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ ).

U937 cells were treated with 80 mg/L ox-LDL for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h or 48 h to increase total cholesterol (TC) accumulation. FITC-anti-CD36 Mab labeling CD36 protein expression on U937 cell membrane were detected by Flow cytometric analysis. a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , compared with control

位, 还有无诱导转录水平的升高? 为此我们提取各时间点的细胞总 RNA, 逆转录后以 GAPDH 为内对照进行逆转录聚合酶链反应。结果如图 3 (Figure 3) 所示, 80 mg/L ox-LDL 处理细胞后可见 CD36 mRNA 水平 6 h 后即增高, 且呈时序性增高, 24 h 时达最高, 48 h 较 24 h 无明显差别。ox-LDL 促进 U937 细胞 CD36 的表达增高存在转录水平的增强。

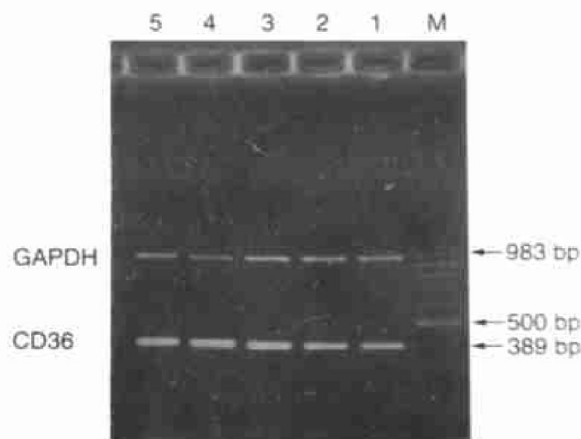


图3 逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 的表达

**Figure 3 Expression of CD36 mRNA on U937 cells induced by ox-LDL** Results of RT-PCR showed CD36 mRNA level increasing with time course. lane 1: control, lane 2: incubation in 6 h, lane 3: incubation in 12 h, lane 4: incubation in 24 h, lane 5: incubation in 48 h

## 2.5 细胞周期分析

正常培养的 U937 细胞, 经流式细胞仪检测, 细胞凋亡率为 0.5%, 200 mg/L ox-LDL 作用 24 h 后, 凋亡率为 9.2%, G2/M 期细胞数减少, G1 期前出现亚 G1 峰, 即凋亡峰 (AP), ox-LDL 作用 48 h 时细胞凋亡率增加为 28.2%, AP 峰更加明显。预先用 CD36 单克隆抗体处理 U937 细胞, 可见 ox-LDL 致 U937 凋亡作用明显减少, 24 h 为 5.5%, 48 h 为 18.6%。

## 3 讨论

清道夫受体包括 A 类 (SR-AI, SR-AII) 和 B 类 (SR-BI, CD36, LIMP2, CLA-1), CD36 作为新型清道夫受体, 其功能有介导细胞粘附、细胞分化、细胞信号传递, 参与长链脂肪酸的转运等。Han 等<sup>[6]</sup>报道, 分别用 25 mg/L LDL、50 mg/L AcLDL 或 50 mg/L ox-LDL 均可促进小鼠巨噬细胞 J774 表达 CD36 mRNA 和 CD36 蛋白成倍增加, 以 ox-LDL 作用最为明显, CD36 的表达不被 J774 内吞的 ox-LDL 负反馈抑制。CD36 可与 ox-LDL 高亲和力结合, 且不被 AcLDL 和

LDL 竞争抑制。Nozaki 等<sup>[7]</sup>发现 CD36 缺乏患者的单核细胞与 ox-LDL 的最大结合比正常人的单核细胞低 40%, 抗 CD36 抗体 OKM-5 能使正常人的单核细胞对 ox-LDL 的摄取减少 53%, 但对 CD36 缺乏单核细胞无影响。他们还发现与 ox-LDL 孵育 24 h 后, CD36 缺乏的单核细胞内胆固醇酯堆积比正常单核细胞少 40%。在已知的表达于巨噬细胞的 ox-LDL 受体中, CD36 较 SR-A 和 FcγRII-B2 受体出现早, CD36 在正常动脉壁中的巨噬细胞表达很低, 而在斑块中心的泡沫细胞则高表达, 说明 CD36 可能在 As 斑块形成早期巨噬细胞泡沫化过程中起重要作用, CD36 的表达降低可以延缓 As 病变的形成<sup>[8]</sup>。

实验结果表明, 在诱导 U937 泡沫化过程中, CD36 的表达呈现时序性改变, ox-LDL 孵育 6 h 后即可检出 CD36 的表达增高, 24 h 时达到最高, 随后略有降低, 48 h 仍较对照组有显著增高。逆转录聚合酶链反应实验结果显示 CD36 mRNA 的转录与蛋白表达一致, 而 ox-LDL 经 U937 吞噬后, 胞内总胆固醇 24 h 后有增高, 48 h 后增高显著。说明 ox-LDL 可促进 U937 细胞 CD36 基因转录和蛋白合成, CD36 的表达增高后有利于 U937 对脂质的吞噬积聚。流式检测 48 h CD36 表达较 24 h 略有降低, 可能原因是 CD36 介导 U937 吞噬 ox-LDL 从胞膜向胞浆移位, 我们使用的单克隆抗体荧光标记物异硫氰酸荧光素不能透过细胞膜, 不能标记胞浆内的 CD36; 亦可能是细胞泡沫化程度加重, 脂质过氧化物增多使得细胞老化, CD36 转录、表达能力降低。内吞的 ox-LDL 在泡沫细胞形成早期不对 CD36 的表达产生负反馈调节与文献<sup>[6]</sup>报道相符。预先用抗 CD36 的单克隆抗体与 U937 细胞结合, 能够减少 U937 细胞对 ox-LDL 的吞噬作用, 并部分抑制 ox-LDL 的致 U937 细胞凋亡作用。

文献<sup>[7, 9, 10]</sup>报道, INF $\gamma$  和 N-3 不饱和脂肪酸二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)以及 HMG-CoA 还原酶抑制剂洛伐他汀均可显著降低单

核细胞 CD36 的表达, 但机制尚不明确。进一步研究 CD36 基因表达和调控, CD36 蛋白结构和功能, 对于研究新型调血脂药物, 防治动脉粥样硬化所引起的心脑血管疾病将具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, et al. Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine [J]. *Blood*, 1992, **80** (5): 1 105- 115
- [2] Endemann G, Stanton LW, Madden KS, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268** (16): 11 811- 816
- [3] 李全忠, 杨永宗, 易光辉, 等. 泡沫细胞模型的建立 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (2): 152- 154
- [4] Kawano T, Hakamata H, Ohta T, et al. Inhibitory effects of HepG2 cell-derived apolipoprotein AI-containing lipoproteins in cholesteryl ester accumulation in macrophages [J]. *Biochemistry*, 1997, **36**: 9 816- 825
- [5] 杨向东, 杨永宗, 黎健. 氧化修饰低密度脂蛋白诱导 U937 细胞凋亡及其机制探讨 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (2): 197- 200
- [6] Han JH, Hajjar DP, Maria Febbraio M, et al. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36 [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (84): 21 654- 659
- [7] Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, et al. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 1 859- 865
- [8] Nozaki S, Yamashita S, Nakagawa T. CD36 is expressed in atherosclerotic lesion and expression is upregulated by oxidized LDL [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **134** (1, 2): 235- 241
- [9] Pietsch A, Weber C, Goretzki M, et al. N-3 but not N-6 fatty acids reduce the expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 1995, **13** (3): 211- 216
- [10] Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, **52**: 433- 439

(此文 2000- 04- 10 收到, 2000- 12- 10 修回)

(此文编辑 胡必利 朱雯霞)