

巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中载脂蛋白 E 基因表达的变化

张国兵¹, 陈灏珠², 江智文¹, 温沁竹¹, 顾青¹, 王丰¹, 田毓华¹

(1. 上海市第一人民医院心内科, 上海 200080; 2. 上海市中山医院心血管研究所, 上海 200032)

[主题词] THP-1 细胞; 泡沫细胞; 载脂蛋白 E; 基因表达

[摘要] 研究单核—巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中细胞载脂蛋白 E 表达的变化。以佛波醇酯(10^{-7} mol/L) 诱导人单核细胞性 THP-1 细胞分化为巨噬细胞(72 h), 再以氧化型低密度脂蛋白(50 mg/L) 刺激巨噬细胞形成泡沫细胞(48 h), 用逆转录—聚合酶链反应检测这一过程中载脂蛋白 E 在 mRNA 水平上的变化。结果显示, 单核细胞分化为巨噬细胞的同时伴随着载脂蛋白 E 表达的增加, 巨噬细胞吞噬脂质转化为泡沫细胞后载脂蛋白 E 的表达进一步增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 对血浆脂蛋白的转运、摄取和代谢有重要影响, 其在组织中巨噬细胞的表达受肿瘤坏死因子、 γ -干扰素和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 等因素的调节^[1]。巨噬细胞合成的载脂蛋白 E 通过自分泌或旁分泌的方式在组织局部脂质微环境的平衡过程中发挥着重要作用, 尤其对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病变内巨噬细胞源性泡沫细胞的形成有重要影响。本文以佛波醇酯(PMA) 和 ox-LDL 连续刺激人单核细胞性 THP-1 细胞, 观察单核—巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中载脂蛋白 E 表达的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

人单核细胞性 THP-1 细胞购自中科院细胞所; 佛波醇酯(PMA) 和低密度脂蛋白(LDL) 购自 Sigma 公司; Trizol RNA 抽提试剂盒和 M-MLV 逆转录酶购自 Gibco 公司; PCR 引物由上海皓嘉公司合成, 载脂蛋白 E (244 bp) A 链 5'-ACAGAATTCGCCCGCCCTGGTACAG-3', B 链 5'-TAAGCTTGGCAGCGCTGTCCAAGGA-3'; β -actin (304 bp) A 链 5'-TGGATGACGATATCGCTGCGCT-3', B 链 5'-GGTGCTCCTCAGGGGCCACACG-3'。

[作者简介] 张国兵, 男, 1971 年出生, 江苏常州人, 内科心血管专业博士, 主治医师, 从事动脉粥样硬化基础研究。陈灏珠, 男, 广东新会人, 博士生导师, 工程院院士, 从事冠心病的基础和临床研究。

1.2 细胞培养和分组

THP-1 细胞培养于含 10% 小牛血清、 1.0×10^5 u/L 青霉素和 100 g/L 链霉素的 RPMI1640 培养液中。按 6×10^5 /孔将细胞接种至 12 孔板。巨噬细胞组(加 PMA, 终浓度 10^{-7} mol/L) 12 孔; THP-1 细胞组(不加 PMA) 4 孔, 光镜观察。巨噬细胞形成后(72 h) 两组各取 4 孔抽提细胞总 RNA。将剩下 8 孔换无血清培养基(以 1% 的 Nutridoma-HU 代替 10% 小牛血清) 培养。1 天后再分为两组: 泡沫细胞组(加 ox-LDL 50 mg/L) 4 孔; 巨噬细胞组(继续无血清培养) 4 孔。油红 O 染色确定泡沫细胞形成后(48 h) 抽提细胞总 RNA。

1.3 逆转录—聚合酶链反应

细胞总 RNA 抽提参照产品说明书。微量分光光度计检测 RNA 样品纯度($OD_{260}: OD_{280} > 1.8$)。

逆转录(总体积 20 μ L): 总 RNA 1 μ g 加随机引物六聚体 20 pmol $\xrightarrow{70^\circ\text{C} \ 5 \text{ min}}$ 加入逆转录缓冲液、dNTPs、RNasin、DIT 和 M-MLV 200 u $\xrightarrow{25^\circ\text{C} \ 10 \text{ min}, 37^\circ\text{C} \ 60 \text{ min}, 95^\circ\text{C} \ 5 \text{ min}}$ 。

取逆转录产物 2.5 μ L, 加引物各 0.5 μ L、PCR 缓冲液 2.5 μ L、 MgCl_2 2 μ L、DMSO 1.25 μ L、dNTPs 各 0.2 mmol/L、Taq 酶 0.7 u, 去离子水配总体积至 25 μ L。95 $^\circ\text{C}$ 5 min 后循环 30 次: 95 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min、63 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min、72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 末次循环 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 7 min。以限制性片段长度多态性方法确定聚合酶链反应产物的特异性。

1.4 电泳

取聚合酶链反应产物 10 μ L, 2.5% 琼脂糖凝胶

电泳, 100 V 30 min; 凝胶扫描系统检测扩增产物的量, 以载脂蛋白 E 条带与 β -actin 条带灰度的比值为指标作半定量分析, 经计算机软件处理后显示 mRNA 的表达情况。

2 结果

2.1 泡沫细胞形成情况

光镜下见 THP-1 细胞呈球形, 悬浮生长并无限繁殖。加 PMA 后 72 h 见细胞全部贴壁生长, 并呈不规则形状, 失去增殖活性, 提示巨噬细胞形成。巨噬细胞与 ox-LDL 共同孵育 48 h 后可形成典型的泡沫细胞, 油红 O 染色后显示细胞内胆固醇含量明显增加。

2.2 巨噬细胞和泡沫细胞载脂蛋白 E 的表达

单核-巨噬细胞组巨噬细胞载脂蛋白 E mRNA 的表达(0.955 ± 0.052)明显高于 THP-1 细胞(0.563 ± 0.044) (图 1, $P < 0.05$)。巨噬-泡沫细胞组泡沫细胞载脂蛋白 E mRNA 的表达(0.934 ± 0.251)明显高于巨噬细胞(0.418 ± 0.012) (图 2, $P < 0.01$)。

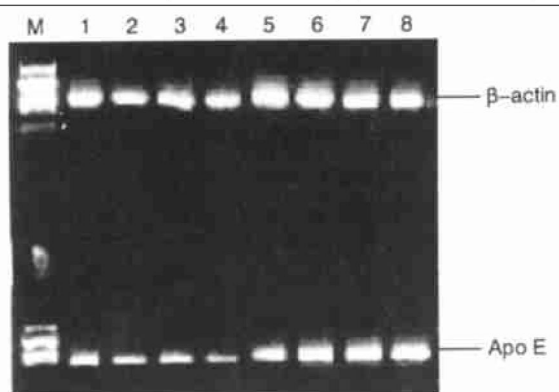


图 1. 巨噬细胞载脂蛋白 E 的表达结果。1~4 为 THP-1 细胞, 5~8 为巨噬细胞(10^{-7} mmol/L PMA 作用 3 天)

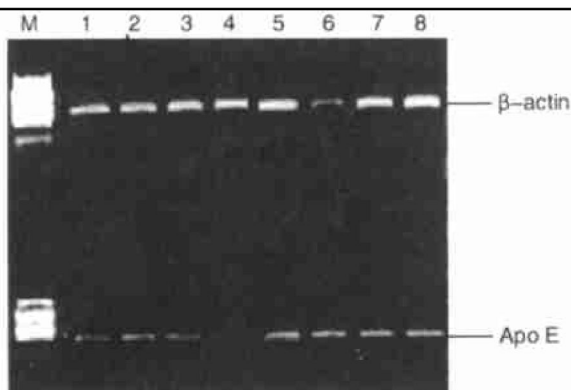


图 2. 泡沫细胞载脂蛋白 E 的表达结果。1~4 为巨噬细胞, 5~8 为泡沫细胞(50 mg/L ox-LDL 作用 2 天)

3 讨论

本文研究表明巨噬细胞表达载脂蛋白 E 的水平与细胞表型有关: 单核细胞分化为巨噬细胞时伴有载脂蛋白 E 表达的增加; 巨噬细胞负荷胆固醇变为泡沫细胞过程中伴随载脂蛋白 E 表达的增加, 与 Basheeruddin 等^[2]和 Banka 等^[3]研究结果类似。

研究显示动脉粥样硬化病变内载脂蛋白 E 增加主要来自于巨噬细胞源性泡沫细胞表达的增加。巨噬细胞新合成的载脂蛋白 E 作为胆固醇的载体可直接地或通过参与构成高密度脂蛋白间接地促进细胞内胆固醇的外流^[4], 这可能是载脂蛋白 E 实现局部抗动脉粥样硬化作用的主要机制。此外, 载脂蛋白 E 还能减少脂蛋白酯酶介导的 LDL 在内皮下基质的沉积、抑制内皮细胞增殖、改变某些细胞因子活性, 这些可能都参与了局部抗动脉粥样硬化作用。载脂蛋白 E 基因缺陷鼠动脉粥样硬化病变内出现大量典型泡沫细胞, 提示泡沫细胞的形成并不依赖于载脂蛋白 E 的存在, 相反缺失载脂蛋白 E 后动脉粥样硬化病变早发而且严重。转基因研究证实了载脂蛋白 E 的局部抗动脉粥样硬化作用。因此, ox-LDL 引起巨噬细胞表达载脂蛋白 E 增加可能主要是细胞内胆固醇积聚引起的继发性改变, 能够促进细胞内胆固醇外流, 在一定程度上减缓了泡沫细胞的形成, 从而发挥局部抗动脉粥样硬化作用。

参考文献

- [1] Duan HW, Li ZG, Mazzone T. Tumor necrosis factor- α modulates monocyte/macrophage apolipoprotein E gene expression [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 915-922
- [2] Basheeruddin K, Rechter C, Mazzone T. Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 1 219-224
- [3] Banka CL, Black AS, Dyer CA, et al. THP-1 cells form foam cells in response to coculture with lipoproteins but not platelets [J]. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 35-43
- [4] Zhang WY, Gaynor PM, Kruth HS, et al. Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 28 641-646

(此文 2001-03-19 收到, 2001-10-20 修回)

(此文编辑 朱雯霞)