

天然及氧化型极低密度脂蛋白诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α

瞿智玲, 邓仲端, 倪娟

(华中科技大学同济医学院病理学教研室, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 脂蛋白; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α ; 内皮, 血管; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨天然及氧化型极低密度脂蛋白能否诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 使内皮细胞分别暴露于上述脂蛋白后, 用原位杂交、逆转录聚合酶链反应及免疫细胞化学法分别检测各组细胞的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 和蛋白的表达。原位杂交发现, 培养的内皮细胞能表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA, 两脂蛋白组内皮细胞的积分吸光度值明显高于对照组 ($P < 0.01$)。逆转录聚合酶链反应发现, 两脂蛋白组内皮细胞的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的积分吸光度值分别为对照组的 15.4 倍和 14.2 倍。免疫细胞化学发现, 两脂蛋白组内皮细胞胞浆的巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达(棕色颗粒)的积分吸光度值显著高于对照组, 方差分析表明, 组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。结果提示, 天然及氧化型极低密度脂蛋白均可诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达高水平的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 和蛋白, 通过促进单核细胞迁入内膜在动脉粥样硬化发生中起重要作用。

[中图分类号] Q513.5

[文献标识码] A

Native and Oxidized Lipoproteins Induce the Expression of Macrophage Inflammatory Protein 1 α in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

QU Zhi-Ling, DENG Zhong-Duan, and NI Juan

(Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Lipoproteins; Macrophage Inflammatory Protein 1 α ; Endothelium, Vascular; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To understand whether native very low density lipoprotein (rVLDL) and oxidized very low density lipoprotein (ox-VLDL) induce the cultured human umbilical endothelial cells (EC) to express macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α). **Methods** The EC were cultured in serum-free medium containing 80 mg/L of rVLDL and ox-VLDL respectively, while the control group without lipoproteins. After 24 h incubation, the EC grown on the cover-slips were fixed and in situ hybridized with the Digoxigenin labeled MIP-1 α cDNA probe. The MIP-1 α mRNA expressed by the cells of every group was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as well. The MIP-1 α protein expressed by the cells was detected by immunocytochemistry. **Results** Densitometry scan showed that the cultured EC could express MIP-1 α mRNA, and the integral absorbance (A) values of the cells exposed to lipoproteins in situ hybridized with the probe mentioned above were significantly higher than that of the control group. Analysis of variance demonstrated that there was significant difference among groups ($P < 0.01$). RT-PCR also showed that the A values of the MIP-1 α mRNA expressed by the cells in rVLDL and ox-VLDL group were 15.4- and 14.2-fold as much as that of the control group. Immunocytochemistry showed that the A values of the MIP-1 α protein expression in the cells (brown granular substance) in rVLDL and ox-VLDL group were significant higher than that of the control group. Analysis of variance showed a significant difference among groups ($P < 0.05$). **Conclusion** rVLDL and ox-VLDL were able to induce MIP-1 α mRNA and protein expression in human umbilical vein endothelial cells at a high level, and may play an important role in atherogenesis through enhancing recruitment of monocytes to the intima.

外周血单核细胞粘附于内皮, 并迁入内皮下间隙, 是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的早期变化。巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein 1 α , MIP-1 α)是CC型趋化因子, 对血液单核细胞和T

淋巴细胞具有强的趋化活性。近年研究表明, 血管内皮细胞(endothelial cell, EC)在某些有害因素, 诸如氧化脂蛋白、内毒素、脂质过氧化损伤及高同型半胱氨酸血症等的作用下, 可引起EC的功能障碍, 产生和分泌某些趋化因子、粘附分子增加^[1], 与As早期单核细胞的迁入有关。目前我国人群的膳食仍以碳水化合物为主, 高脂血症亦以甘油三酯升高为多见。本文旨在观察氧化型极低密度脂蛋白(oxidized very low density lipoprotein, ox-VLDL)是否能促进EC的

[收稿日期] 2001-06-18 [修回日期] 2001-11-08

[基金项目] 国家自然科学基金(39730220)资助。

[作者简介] 瞿智玲, 女, 1970年5月出生, 河南人, 主管技师。邓仲端, 男, 1927年10月出生, 广西南宁人, 病理学教授, 博士研究生导师, 多年从事动脉粥样硬化发病机制的研究。倪娟, 女, 1968年8月出生, 湖北人, 技师。

MIP-1 α 的表达, 为阐明 ox-VLDL 在 As 发生中的作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 血浆脂蛋白的制备

按王淳本等^[2]的方法进行, 将新鲜正常人血浆经超速离心法分离得天然极低密度脂蛋白 (native very low density lipoprotein, nr-VLDL), 加入 CuCl₂ 使之氧化修饰成为 ox-VLDL。用硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 值对其氧化程度进行鉴定^[3,4]。经 PBS 透析后, 4℃ 避光保存备用。用 Lowry 法^[12] 进行蛋白定量检测。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞株 V304, 由武汉大学中国典型物保藏中心提供。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco 公司) 培养, 0.1% 胰蛋白酶消化传代。EC 在倒置显微镜下呈铺路石状排列, (1) 因子相关抗原间接免疫荧光法阳性。将传代生长呈汇合状态的 EC 随机分为三组: 对照组为无血清培养基 (DME/F12, Gibco 公司); ④nr-VLDL 组为含 80 mg/L nr-VLDL 的无血清培养基; ④ox-VLDL 组为含 80 mg/L ox-VLDL 的无血清培养基。24 h 后, 按不同检测方法分别收集和保存样本。

1.3 原位分子杂交

将各组细胞片用 4% 多聚甲醛固定, 逐级乙醇脱水, -70℃ 保存备用。参照地高辛随机引物标记检测试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司) 说明书进行探针标记及杂交。实验分组见前。各组脂蛋白终浓度均为 80 mg/L。42℃ 杂交 16~20 h, 显色, 常规脱水, 透明, 封片。

1.4 逆转录聚合酶链反应

用一步法提取 EC 总 RNA, 每组取总 RNA 1~5 μ g, 逆转录合成 cDNA, 取该产物 2 μ L 进行 PCR 循环: 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 末次延伸为 72℃ 10 min。MIP-1 α 的引物序列为: 正链 5' CTGCCCTTGCTGTCTCTCTG3', 负链 5' CTGCCGGCITCGCITGGTAA3', PCR 扩增产物长度为 197 bp。GAPDH 的引物序列为: 正链 5' GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT3', 负链 5' GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT3', PCR 扩增产物长度为 235 bp (美国 Gibco BRL 公司)。反应完毕, 取反应产物 10 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色显示, 紫外线拍照, 继用 SQ9636 型扫描系统扫描, TJTY 图像分析系统检测各组目的基因及其 GAPDH 基因

的积分吸光度 (absorbance, A) 值。

1.5 免疫细胞化学

培养于盖玻片上的各组 EC 加 nr-VLDL 及 ox-VLDL 后, 用乙醇和丙酮 (1:1) 混合液固定。用羊抗人 MIP-1 α 单克隆抗体 (Sigma 公司) 和免疫细胞化学检测试剂盒 (博士公司) 进行免疫染色。测定分析同原位分子杂交。

2 结果

2.1 巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达

原位分子杂交结果显示, 培养的 EC 能表达 MIP-1 α mRNA, 为胞浆及核表达, 呈蓝色颗粒。图像分析显示, nr-VLDL 组和 ox-VLDL 组 EC 的相对积分 A 值明显高于对照组, 且 ox-VLDL 组高于 nr-VLDL 组 (表 1, Table 1), 方差分析显示, 组间差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。RT-PCR 结果与原位分子杂交结果基本一致 (图 1 和表 2, Figure 1 and Table 2)。nr-VLDL 组、ox-VLDL 组电泳条带的积分 A 值分别为对照组的 15.4 倍和 14.2 倍。

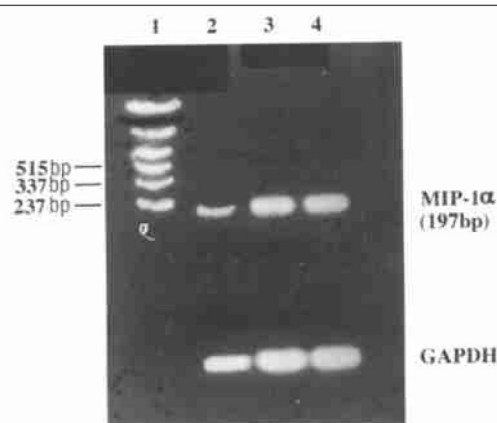


图 1. 天然及氧化型极低密度脂蛋白诱导的内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达。

Figure 1. MIP-1 α mRNA expression by EC induced by nr-VLDL and ox-VLDL. 1: Markers; 2: Control; 3: nr-VLDL group; 4: ox-VLDL group.

表 1. 内皮细胞的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达。

Table 1. Expression of MIP-1 α mRNA by endothelial cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	A values
Control	0.05 $\pm$ 0.0069
nr-VLDL	0.0548 $\pm$ 0.0051 ^a
ox-VLDL	0.077 $\pm$ 0.006 ^{ab}

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with nr-VLDL group.

表 2. 内皮细胞的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 电泳条带的积分吸光度值.

Table 2. The integral absorbance values of the electrophoretic bands of MIP-1 α mRNA expressed by EC.

Groups	A values
Control	0.06332
rr-VLDL	0.973
ox-VLDL	0.8977

2.2 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达

免疫细胞化学结果显示, EC 均表达 MIP-1 α 蛋白, 表现为胞浆内棕色颗粒。图像分析显示, rr-VLDL 组和 ox-VLDL 组 EC 的相对积分 A 值均高于对照组, 且 ox-VLDL 组高于 rr-VLDL 组(表 3, Table 3), 方差分析显示, 组间差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 3. 内皮细胞的巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达.

Table 3. Expression of MIP-1 α protein by EC ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$).

Groups	A values
Control	0.034 $\pm$ 0.005
rr-VLDL	0.038 $\pm$ 0.0055 ^a
ox-VLDL	0.057 $\pm$ 0.0075 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with rr-VLDL group.

3 讨论

动脉粥样硬化(As)发病机制的炎症观点越来越受重视。在 As 病变形成过程中, 血液单核细胞迁入内膜受许多因素的影响, 其中, 趋化因子起着关键作用。趋化因子分四类, CC 型趋化因子为最大的趋化因子亚家族, 其分子结构中最前面的 2 个保守的半胱氨酸相邻, 属于此型的有单核细胞趋化蛋白(MCP)、MIP、RANTES 等, 主要对单核细胞及 T 淋巴细胞有趋化活性。此外, 尚有 CXC、C 及 CX3C 型趋化因子^[6]。

众所周知, 渗入内膜的脂蛋白(LDL 及 VLDL)可被动脉壁细胞、氧自由基等氧化修饰而成 ox-LDL 和

ox-VLDL。迁入内膜的血液单核细胞分化转变成成为巨噬细胞, 后者通过清道夫受体摄取这些氧化型脂蛋白而后形成泡沫细胞。因此, 血浆脂蛋白在泡沫细胞形成过程中起重要作用^[5]。

我们曾证明, 氧化修饰的 VLDL 及 LDL 能刺激单核巨噬细胞^[7,8]、平滑肌细胞^[9]及内皮细胞^[10]表达高水平的 MCP-1 mRNA 和蛋白。同时, 我们用斑点杂交法初步证明, ox-LDL 和 ox-VLDL 可诱导 EC 表达高水平的 MIP-1 α ^[11]。本文进一步用 RT-PCR 和原位分子杂交证明, 培养的 EC 可表达 MIP-1 α mRNA, rr-VLDL 和 ox-VLDL 均促进其表达高水平的 MIP-1 α mRNA; 免疫细胞化学也表明, rr-VLDL 和 ox-VLDL 可促进 EC 表达高水平的 MIP-1 α 蛋白, 与过去的实验结果一致。通过我们的实验可以得出, ox-VLDL 和 ox-LDL 可诱导培养的 EC 表达高水平的 MIP-1 α mRNA 和蛋白, 从而在动脉内膜的单核细胞的募集中起重要的作用。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—An inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白. *同济医科大学学报*, 1995, **24** (3): 169-171
- [3] Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*, 1989, **34** (12): 2433-438
- [4] 李建武, 吴中立. 硫代巴比妥酸荧光法测定血清及组织脂质过氧化物. *第二军医大学学报*, 1987, **8** (5): 371-373
- [5] Reape TJ, Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **147** (1): 213-225
- [6] Rollins BJ. Chemokines. *Blood*, 1997, **90** (3): 909-928
- [7] Wang GP, Deng ZD, Ni J, et al. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein 1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis*, 1997, **133** (1): 31-36
- [8] 王国平, 邓仲端, 瞿智玲. 氧化修饰的低密度和极低密度脂蛋白对巨噬细胞单核细胞趋化蛋白表达的影响. *中华医学杂志*, 1997, **77** (3): 212-215
- [9] 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. *Chinese Med J*, 1996, **109** (3): 206-209
- [10] 夏春枝, 邓仲端. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (4): 291-294
- [11] 夏春枝, 邓仲端. 天然及氧化型低密度和极低密度脂蛋白诱导培养的内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 和血管粘附分子 1. *同济医科大学学报*, 2000, **29** (5): 380-382
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **192**: 265-275

(此文编辑 文玉珊)