

氧化型高密度脂蛋白对人单核细胞株 THP-1 细胞迁移及单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响

胡厚源, 陈运贞¹

(第三军医大学西南医院心内科, 重庆市 400038; 1. 重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[主题词] 脂蛋白, 高密度; 单核细胞; 迁移; 单核细胞趋化蛋白 1; 雌二醇

[摘要] 为研究氧化型高密度脂蛋白对单核细胞的趋化作用及单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响, 进一步探讨氧化型高密度脂蛋白的致动脉粥样硬化机制, 以一次性密度梯度超速离心法分离人血浆高密度脂蛋白, 硫酸铜介导法进行氧化修饰, 单核细胞为培养的人单核细胞株 THP-1 细胞, 趋化实验采用改良 Boyden 趋化室, 酶联免疫吸附检测法测定单核细胞趋化蛋白 1 的含量。结果显示, 氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞具有明显的趋化作用, 其蛋白质浓度在 50 和 100 mg/L 时进入膜内的细胞数分别是对照组的 2 倍 ($P < 0.05$) 和 3 倍 ($P < 0.01$); 雌二醇可部分抑制氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞的趋化作用。氧化型高密度脂蛋白可促进 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1 的释放, 氧化型高密度脂蛋白组单核细胞趋化蛋白 1 的水平, 约为对照组的 2 倍 ($P < 0.01$); 雌二醇可部分抑制氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1 释放的促进作用。以上提示, 氧化型高密度脂蛋白还可能通过促进循环血中单核细胞向血管内膜层迁移和聚集以及单核细胞趋化蛋白 1 的释放而促进动脉粥样硬化的发生, 雌二醇对其具有一定的保护作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Effects of Oxidized High Density Lipoprotein on Migration and Monocyte Chemoattractant Protein-1 of Human Monocytic THP-1 Cells

HU Hou-Yuan, and CHEN Yun-Zhen

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[MeSH] Lipoproteins, HDL; Monocytes; Cell Movement; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Estradiol

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of oxidized high density lipoprotein (ox-HDL) on the migration of THP-1 cells and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the conditioned medium. **Methods** Human plasma lipoproteins were separated by one-step ultracentrifugation with a simple density gradient, the in vitro oxidation of high density lipoprotein (HDL) was mediated by CuSO_4 . THP-1 cells (a human acute monocytic leukemia cell line) were cultured for the experiments. The migration of THP-1 cells stimulated by oxidized high density lipoprotein was assayed with reformed Boyden. **Results** The migrated cells in the membrane (in Boyden well) were 52.5 ± 6.5 in control group, 93.5 ± 10.1 in 50 mg protein/L oxidized high density lipoprotein group ($P < 0.05$), 148.5 ± 21.6 in 100 mg protein/L oxidized high density lipoprotein group ($P < 0.01$), 112.8 ± 19.9 in oxidized high density lipoprotein + E_2 (17β -estradiol) group ($P < 0.05$, compared with 100 mg protein/L oxidized high density lipoprotein group), and without significant changes in HDL groups. MCP-1 in the conditioned medium of THP-1 cells were as follows: 76.5 ± 11.6 ng/g protein in control group, 141.0 ± 19.5 ng/g protein in 100 mg protein/L oxidized high density lipoprotein group ($P < 0.01$), 117.5 ± 15.2 ng/g protein in oxidized high density lipoprotein + E_2 group ($P < 0.05$ compared with oxidized high density lipoprotein group), and without significant change in HDL group. **Conclusions** oxidized high density lipoprotein could stimulate the migration of THP-1 cells and the production of MCP-1. It suggested that oxidized high density lipoprotein may participate in the primary pathogenesis of atherosclerosis by promoting the migration of monocyte to the intima of artery and increasing MCP-1; 17β -estradiol may have protective effect.

近年研究表明, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 也易被氧化修饰而形成氧化型高密度脂蛋白 (oxidized high density lipoprotein, ox-HDL),

氧化型高密度脂蛋白不仅转运胆固醇的能力下降, 而且具有细胞毒性作用, 还可刺激内皮细胞释放内皮素-1, 并可被清道夫受体识别和摄取, 从而促进动脉粥样硬化的发生^[1-4]。本文研究了氧化型高密度脂蛋白对人单核细胞株 THP-1 细胞的趋化作用及单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 含量的影响, 以进一步探讨其致动脉粥样硬化作用。

[收稿日期] 2001-09-05 [修回日期] 2002-02-25

[作者简介] 胡厚源, 男, 1966 年出生, 湖北省荆州市人, 博士, 副主任医师、副教授、硕士研究生导师, 主要从事冠心病的临床和基础研究。陈运贞, 女, 1934 年出生, 上海市人, 主任医师、教授、博士研究生导师。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

THP-1 细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库提供。采用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养基 (含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、Hepes 10 mmol/L、青霉素和链霉素各 1.0×10^5 u/L), 于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。实验均采用复苏后传至第 5 代以上的细胞。

1.2 高密度脂蛋白的分离和氧化修饰

采用一次性密度梯度超速离心法分离人血浆高密度脂蛋白 (包括高密度脂蛋白 2 和高密度脂蛋白 3), 预染血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳鉴定其纯度^[5], 氧化修饰采用 Cu²⁺ 介导法^[1], 每 0.5 g 蛋白/L 的高密度脂蛋白与 10 μmol/L 的 CuSO₄ 于 37℃、5% CO₂ 潮湿孵箱中共同孵育 24 h, 然后以 20 倍体积的 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 透析 24 h 以上, 每 8 h 换液 1 次, 以去除 Cu²⁺ 和可溶性的过氧化产物。硫代巴比妥酸反应产物荧光检测法测定高密度脂蛋白氧化前后丙二醛的含量分别为 0.18 和 8.14 μmol/g 蛋白。

1.3 氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞趋化作用的检测^[6]

采用改良 Boyden 趋化室 (分为上室和下室) 和硝酸纤维素微孔滤膜 (孔径 8 μm, 直径 13 mm, 厚度 0.2 mm; Sigma 公司产品)。THP-1 细胞以无血清 RPMI 1640 培养基 (无酚红) 洗 2 次, 并调至浓度 2×10^6 /L, 作为加入上室的细胞悬液。下室按分组加入含下列成分的 RPMI 1640 培养基 (无酚红): 对照组, 加入等体积的 PBS; ④高密度脂蛋白组, 高密度脂蛋白的终浓度分别为 50 和 100 mg 蛋白/L; ④氧化型高密度脂蛋白组, 氧化型高密度脂蛋白的终浓度分别为 50 和 100 mg 蛋白/L; ④氧化型高密度脂蛋白+雌二醇组, 氧化型高密度脂蛋白 100 mg 蛋白/L, 上室细胞悬液中加入 10^{-7} mol/L 17-β-雌二醇 (17-β-estradiol, E₂)。每次实验每组设 2 个复份, 实验重复 5 次。

操作步骤: 将滤膜小心放于 Boyden 小室孔中的橡胶圈上, 拧紧螺旋盖, 从外侧孔向下室注入 0.5 mL 液体, 封闭小孔; 取 1×10^6 /L 的 THP-1 细胞悬液 0.35 mL 加入上室。置 5% CO₂ 潮湿孵箱中 37℃、2 h。取出滤膜, 甲醇固定, 苏木精染色, 盐酸酒精脱色, 蒸馏水漂洗, 各级乙醇脱水, 二甲苯透明。将滤膜置载玻片上, 放大 10×40 倍, 用显微镜细调节调

至焦距对准滤膜表面, 向下转动 10 μm, 开始计数膜内不同层次的细胞数。每膜随机观察 5 个视野, 计其总数, 单核细胞趋化反应 (monocyte chemotactic responsiveness, MCR) 结果以双份滤膜内细胞的平均数表示。

1.4 单核细胞趋化蛋白 1 含量的测定

THP-1 细胞以无血清 RPMI 1640 培养基 (无酚红) 洗 2 次, 调至 2×10^6 /L, 接种于 24 孔板 (1 mL/孔), 分为对照组 (加入等体积 PBS)、HDL、ox-HDL 组和 ox-HDL + E₂ 组。脂蛋白终浓度为 100 mg 蛋白/L; E₂ 为 10^{-7} mol/L。E₂ 较脂蛋白提前 1 h 加入, 脂蛋白加入后置于 37℃、5% CO₂ 潮湿孵箱中继续孵育 1 h。然后低速离心 10 min, 收集条件培养基, -70℃ 保存, 采用酶联免疫吸附实验试剂盒 (ANOGON 公司) 检测 MCP-1 的含量。收集到的细胞用 Lowry 法测定其蛋白含量。MCP-1 的含量以“ng/g 蛋白”表示。每次实验每组设 2 个复份, 实验重复 5 次。

1.5 统计学分析

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞的趋化作用及雌二醇的影响

氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞具有明显的趋化作用, 其浓度在 50 和 100 mg 蛋白/L 时进入膜内的细胞数分别是对照组的 2 倍 ($P < 0.05$) 和 3 倍 ($P < 0.01$), 而高密度脂蛋白对 THP-1 细胞无明显趋化作用; 雌二醇可部分抑制氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞的趋化作用 (表 1, Table 1)。

表 1. 氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞迁移及培养基中单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响。

Table 1. Effects of HDLs on migration of THP-1 cells and MCP-1 in the medium ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

Groups	MCR (cells)	MCP-1 (ng/g protein)
Control	52.5 ± 6.5	76.5 ± 11.6
HDL (50 mg/L)	49.0 ± 7.1	—
HDL (100 mg/L)	55.6 ± 6.8	72.0 ± 8.9
ox-HDL (50 mg/L)	93.5 ± 10.1 ^a	—
ox-HDL (100 mg/L)	148.5 ± 21.6 ^b	141.0 ± 19.5 ^b
ox-HDL (100 mg/L) + E ₂	112.8 ± 19.9 ^c	117.5 ± 15.2 ^c

MCR: monocyte chemotactic responsiveness. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group; c: $P < 0.05$, compared with ox-HDL group.

2.2 氧化型高密度脂蛋白对单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响

氧化型高密度脂蛋白可促进 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1 的释放, 氧化型高密度脂蛋白组单核细胞趋化蛋白 1 的水平约为对照组的两倍, 而高密度脂蛋白无此作用; 雌二醇可部分抑制氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1 释放的促进作用(表 1, Table 1)。

3 讨论

循环血中单核细胞粘附于血管内皮细胞表面, 进而向内皮下迁移和聚集是动脉粥样硬化发生中的一个关键环节。单核细胞趋化蛋白 1 则可使粘附于内皮上的单核细胞进入血管内膜, 并促进单核细胞表面清道夫受体的表达^[7], 进而摄取脂质, 演变为泡沫细胞。另外, 单核细胞趋化蛋白 1 还有可能通过促进血管平滑肌细胞的增殖而参与动脉粥样硬化的发生^[8]。

本研究进一步探讨了氧化型高密度脂蛋白对动脉粥样硬化发生中的重要细胞成分——单核细胞的趋化作用及其单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响。结果显示, 氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞具有明显的趋化作用, 其浓度在 50 和 100 mg 蛋白/L 时进入微孔滤膜内的细胞数分别是对照组的 2 和 3 倍, 而高密度脂蛋白对 THP-1 细胞无明显趋化作用。氧化型高密度脂蛋白还可促进 THP-1 细胞释放单核细胞趋化蛋白 1, 说明氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞的趋化作用可能与其促进 THP-1 细胞释放单核细胞趋化蛋白 1 有关, 但也可能和氧化型低密度脂蛋白一样具有直接的趋化活性^[9]。这提示, 当单核

细胞进入内膜后, 在氧化脂蛋白的刺激下可于短时间内释放大量的单核细胞趋化蛋白 1^[10], 又使更多的单核细胞进入到内膜层, 形成一种类似“瀑布效应”样具有放大作用的恶性循环。雌二醇可部分抑制氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1 释放的促进作用及其对 THP-1 细胞的趋化作用。本研究进一步提示, 氧化型高密度脂蛋白还可能通过促进循环血中单核细胞向血管内膜层迁移和聚集以及单核细胞趋化蛋白 1 的释放而促进动脉粥样硬化的发生, 而雌二醇具有一定的保护作用。

[参考文献]

- [1] Rifkin V, Khachadurian AK. Oxidation of high density lipoproteins: characterization and effects on cholesterol efflux from J774 macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1299** (1): 87-92
 - [2] Hurtado I, Fiol C, Gracia V, et al. In vitro oxidised HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages. *Atherosclerosis*, 1996, **125** (1): 39-45
 - [3] Martin NF, Squali HH, Walters LE, et al. Oxidized high density lipoproteins modulate endothelin secretion by adult bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Risk*, 1995, **2** (3): 263-267
 - [4] La Ville AE, Sola R, Balanya J, et al. In vitro oxidised HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role in vivo. *Atherosclerosis*, 1994, **105** (1): 179-189
 - [5] 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. *生物化学与生物物理学报*, 1989, **21** (2): 257-260
 - [6] 吕小迅, 张成武. 人体单核细胞趋化性微孔滤膜测定法的研究. *中国实验临床免疫学杂志*, 1990, **2** (4): 6-8
 - [7] 胡厚源, 陈运贞. 单核细胞趋化蛋白 1 对单核细胞表面淋巴细胞功能相关抗原-1、清道夫受体和载脂蛋白 E 表达的影响及雌二醇的干预作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 322-326
 - [8] Porreca E, Di Febbo C, Reale M, et al. Monocyte chemotactic protein -1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 1997, **34**(1): 8-12
 - [9] Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, et al. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol*, 1991, **4**(2 Suppl 1): II-16
 - [10] 王国平, 邓仲端, 瞿智玲. 氧化修饰的低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白对巨噬细胞单核趋化蛋白表达的影响. *中华医学杂志*, 1997, **77** (2): 212-215
- (此文编辑 朱雯霞)