

## 抗磷脂抗体对巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白及 CD36 表达的影响

白玲, 马爱群, 雷新军, 吴格如, 白晓君

(西安交通大学附属第一医院心血管内科, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 抗磷脂抗体; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; CD36 抗原; U937 细胞

[摘要] 为了探讨抗磷脂抗体对巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白的影响及其主要清道夫受体 CD36 抗原表达的调节, 将培养的 U937 细胞与氧化型低密度脂蛋白(80 mg/L)和抗磷脂抗体(100 mg/L)孵育, 用酶荧光法观察人类单核细胞株 U937 内脂质的变化、逆转录-聚合酶链反应和流式细胞术观察 CD36 抗原 mRNA 和蛋白水平表达的改变。结果发现氧化型低密度脂蛋白存在时细胞内胆固醇和胆固醇酯含量分别为  $243 \pm 9$  mg/g 细胞和  $289 \pm 12$  mg/g 细胞, 流式细胞仪测 CD36 抗原为 25%, 凝胶电泳分析 CD36 mRNA/ $\beta$ -action mRNA 为 1.05; 在加入抗磷脂抗体后, 胞浆内胆固醇和胆固醇酯明显增加, 分别为  $276 \pm 10$  mg/g 细胞和  $478 \pm 13$  mg/g 细胞, 流式细胞仪测 CD36 抗原为 37%, 凝胶电泳分析 CD36 mRNA/ $\beta$ -action mRNA 为 1.90; 两组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。以上提示抗磷脂抗体有促进 U937 细胞摄取氧化型低密度脂蛋白的作用, 这一过程是通过在转录及蛋白水平上调 CD36 抗原表达而实现的。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

### Effect of Antiphospholipid Antibody on Uptaking of Oxidized Low Density Lipoprotein and Expression of CD36 in U937 Cells

BAI Ling, MA Ai-qun, LEI Xin-jun, WU Ge-ru, and BAI Xiao-jun

(Cardiovascular Department of the First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi 710061, China)

[MeSH] Antiphospholipid Antibody; Lipoprotein, LDL, Oxidized; Antigen, CD36; U937 Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether antiphospholipid antibody increases the uptaking of oxidized low density lipoprotein and up regulates the expression of CD36 in U937 cells. **Methods** The cultured U937 cells were incubated with oxidized low density lipoprotein of 80 mg/L and antiphospholipid antibody of 100 mg/L for 48 hours in vitro. Then the contents of cholesterol and cholesterol ester were detected by enzyme-fluorescence. The expression of CD36 on U937 was quantified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometry respectively. **Results** In the present of oxidized low density lipoprotein, the uptaking of cholesterol and CD36 expression increased significantly after by U937 cells incubated with antiphospholipid antibody. **Conclusion** Antiphospholipid antibody may accelerate atherosclerosis by up regulating CD36 expression.

抗磷脂抗体(antiphospholipid antibody, APA)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)新的危险因素<sup>[1,2]</sup>。由于APA所作用靶物质——带负电荷磷脂在体内分布广泛,因此APA致动脉粥样硬化的机制是多方面的。在动脉粥样硬化的早期,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)通过清道夫受体被巨噬细胞吞噬并向泡沫细胞转化是As形成的关键环节。有报道表明ox-LDL被自身抗体抗ox-LDL抗体包被后更易于被巨噬细胞吞噬<sup>[3]</sup>,而ox-LDL因存在APA作用的抗原而能被APA结

合,但尚未见APA对单核巨噬细胞摄取ox-LDL的研究。本研究旨在观察ox-LDL诱导骨髓系单核细胞株U937泡沫化过程中,APA对U937摄取ox-LDL的影响及CD36抗原表达的调节作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

骨髓系白血病单核细胞U937购自中国科学院上海细胞生物学研究所。胎牛血清和RPMI1640购自Gibco,胆固醇测定酶为Sigma公司产品,FITC-抗CD36单抗为法国Immunotech公司产品,抗CD36单抗购自美国Neumark公司。逆转录系统和PCR core system gouzi购自大连宝生物,CD36抗原和 $\beta$ -肌动蛋白引物由宝生物合成。其余试剂为国产分析纯。

#### 1.2 抗心磷脂抗体的亲和纯化、定性及蛋白定量

[收稿日期] 2002-07-26 [修回日期] 2002-11-18

[基金项目] 卫生部科学研究基金(98-1-234)资助

[作者简介] 白玲,女,1971年出生,陕西省绥德县人,主治医师,博士研究生,研究方向为泡沫细胞形成的分子机制。马爱群,男,1957年出生,教授,博士研究生导师,主要从事冠心病和心力衰竭防治研究。

抗磷脂抗体以酶联免疫法测定抗心磷脂抗体 (anticardiolipin antibody, ACA) 表示, 选取 6 例 ACA 阳性冠心病者, 各留取 10 mL 枸橼酸抗凝血, 用 Harris 等<sup>[4]</sup> 方法制备 ACA 亲和纯化液。对提纯 ACA 用考马斯亮蓝 G-250 进行定量及酶联免疫法进行定性。ACA 制备液用考马斯亮蓝 G-250 定量测定蛋白浓度为 0.35 g/L, 酶联免疫定性实验表现出对心磷脂高度结合活性, 抗体滴度 > 1:100。

### 1.3 低密度脂蛋白的制备、氧化修饰和鉴定

常规分离新鲜健康人空腹血清, 序列超速离心分离 LDL ( $d = 1.019 \sim 1.063$  kg/L), 经琼脂糖电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳均显示单一蛋白带, Lowry 法测蛋白浓度。将 LDL 置于 10  $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 溶液 (pH 7.2) 中, 37  $^{\circ}$ C 透析 24 h, 换 200  $\mu$ mol/L EDTA 的 PBS 终止反应, 过滤除菌后 4  $^{\circ}$ C 保存。LDL 氧化程度用硫代巴比妥酸反应物质值 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 表示, 新鲜的 LDL TBARS 为 1.5  $\mu$ mol/g, CuSO<sub>4</sub> 处理的 LDL TBARS 为 22.3  $\mu$ mol/g, 证明 LDL 已被氧化。

### 1.4 实验分组

U937 为悬浮细胞, 用 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 细胞密度为 10<sup>9</sup> 个/L, 每 2 天换液一次。实验分为 3 组: ox-LDL 处理组 (ox-LDL 为 80 mg/L); ox-LDL 与 ACA 处理组 (简称 ACA 组, ox-LDL 为 80 mg/L、ACA 为 100 mg/L); ox-LDL、ACA 与 anti-CD36 单抗处理组 (简称 anti-CD36 组, ox-LDL 为 80 mg/L、ACA 为 100 mg/L、anti-CD36 单抗为 2.5 mg/L), 均于处理 48 h 后收集细胞。

### 1.5 细胞内胆固醇及胆固醇酯的测定

收集的细胞用 PBS 清洗 3 次, 0.7 mL 的已烷: 异丙醇 (V/V = 3:2) 抽提细胞脂质 2 次, 于 N<sub>2</sub> 气流下吹干, 细胞内游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量测定参照修饰的酶荧光法进行, 测定荧光强度的激发波长为 320 nm, 发射波长为 407 nm, 胆固醇酯 (cholesterol ester, CE) 为 TC 与 FC 之差, 细胞蛋白用 Lowry 法测定。

### 1.6 流式细胞术检测 CD36 抗原的表达

收集 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个细胞用 PBS 清洗, 加入 FITC-anti-CD36 单抗 20  $\mu$ L, 避光 4  $^{\circ}$ C 放置 30 min。加 1 mL PBS 1 000 r/min 离心 5 min 去上清, 加 1 mL 10% 多聚甲醛的 PBS 固定, 用流式细胞仪检测荧光值, 每管计数 10 000 个细胞, 每管重复 3 次。

### 1.7 逆转录-聚合酶链反应检测 CD36 抗原 mRNA 水平

用异硫氰酸胍/酚/氯仿一步法提取总 RNA, 进行逆转录。CD36 抗原的引物为正义链: 5'-GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT-3' (737~756), 反义链: 5'-TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG-3' (1125~1106), 扩增产物 389 bp;  $\beta$ -action (内参物) 的引物为正义链: 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' (144~163), 反义链: 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3' (683~660), 扩增产物 540 bp。用凝胶分析系统测定每条带上 CD36 抗原与  $\beta$ -action 的吸光度, 以二者的比值表示 CD36 抗原基因表达水平。

### 1.8 统计分析

数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以  $t$  检验分析各处理组间的差异, 以  $P < 0.05$  为统计学上有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞内胆固醇和胆固醇酯的含量

氧化型低密度脂蛋白组、ACA 组和 anti-CD36 组细胞内胆固醇和胆固醇酯的含量见表 1 (Table 1)。ox-LDL 组胆固醇酯与总胆固醇之比小于 60%; 而加入 ACA 后促使 ox-LDL 被摄取, 该组细胞内胆固醇酯与总胆固醇之比大于 60%。在 anti-CD36 单抗存在时 ACA 促 ox-LDL 摄取的作用被减弱。

表 1. 各组细胞内胆固醇和胆固醇酯的含量 (mg/g,  $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1. Comparison of cholesterol and cholesterol ester among three groups.

Groups	n	FC	CE	TC	CE/TC (%)
ox-LDL	6	243 $\pm$ 9	289 $\pm$ 12	532 $\pm$ 15	48.18
ACA	6	276 $\pm$ 10	478 $\pm$ 13	754 $\pm$ 15	58.18 <sup>a</sup>
anti-CD36	6	230 $\pm$ 10	67 $\pm$ 10	297 $\pm$ 11	31.48 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with ox-LDL group; b:  $P < 0.01$ , compared with ACA group.

### 2.2 CD36 和 CD36 抗原 mRNA 的表达

正常 U937 细胞 CD36 抗原表达较低, 仅为 3.7%; ox-LDL 处理后 CD36 蛋白表达水平增加至 25.8%; 而在有 ACA 存在时 CD36 抗原表达进一步升高至 33.7%。

以 CD36 抗原/ $\beta$ -action 的吸光度比值表示 CD36 抗原基因表达水平, 可见正常状态下 U937 细胞基本不表达 CD36 抗原。ox-LDL 处理组 CD36 抗原基因表达的相对值为 0.94, ACA 处理组抗原基因表达的相对值为 1.91, 二者相比有显著性差异 (图 1, Figure 1)。

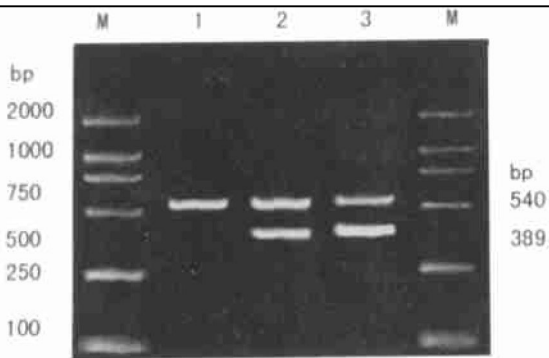


图 1. 逆转录-聚合酶链反应扩增 CD36 抗原的琼脂糖蛋白电泳.

Figure 1. The agarose gel electrophoresis for RT-PCR product of CD36 gene. M: Mark; 1: control group; 2: ox-LDL group; 3: ACA group.

### 3 讨论

抗磷脂抗体阳性的动物模型证实在没有其他危险因素存在下, 仅抗磷脂抗体就可明显增加动脉壁脂质条纹的发展<sup>[1]</sup>, 大量的临床研究也发现抗磷脂抗体的出现伴随着高发的心脑血管事件, 因此有人主张将抗磷脂抗体作为动脉粥样硬化新的危险因素<sup>[5]</sup>。由于抗磷脂抗体的靶抗原——带负电荷的磷脂在体内分布广泛, 使得抗磷脂抗体致动脉粥样硬化的机制复杂不清。巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白并向泡沫细胞转变是动脉粥样硬化形成的关键环节, 影响氧化型低密度脂蛋白被摄取的因素就可能为影响动脉粥样硬化发展的关键环节。

本研究结果表明: 氧化型低密度脂蛋白存在条件下明显促进单核细胞株 U937 细胞向泡沫细胞分化, 并摄取大量脂质, 但胆固醇酯与细胞内总胆固醇之比小于 60%。而在加入抗心磷脂抗体后, 细胞内脂质进一步增加, 尤以胆固醇酯为主, 且胆固醇酯与细胞内总胆固醇之比大于 60%, 生物化学指标上细胞已达到泡沫化程度。说明抗心磷脂抗体可促进巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取, 加速泡沫细胞的形成。既往研究发现抗心磷脂抗体不能与 LDL 结合但可与氧化型低密度脂蛋白结合, 可能由于 LDL 被氧化后结构发生改变使带负电荷磷脂暴露。Ox-LDL 与自身抗体抗氧化型低密度脂蛋白抗体结合可促使氧化型低密度脂蛋白被巨噬细胞吞噬, 我

们的研究说明抗心磷脂抗体与氧化型低密度脂蛋白有交叉反应, 被抗心磷脂抗体结合同样可加速氧化型低密度脂蛋白被巨噬细胞吞噬, 从而促进 As 的发展。

CD36 抗原是氧化型低密度脂蛋白的最主要受体, 且不被内吞的氧化型低密度脂蛋白负反馈抑制<sup>[6,7]</sup>。在已知表达于巨噬细胞的氧化型低密度脂蛋白受体中, CD36 抗原较 SR-A 和 FcγR ⊕ B2 受体出现早, CD36 抗原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 抗原可能在 As 斑块形成早期巨噬细胞向泡沫细胞转化过程中起重要作用, CD36 抗原表达的降低/增高可以延缓/促进 As 病变的形成。本研究结果表明: 在氧化型低密度脂蛋白诱导 U937 细胞向泡沫细胞分化过程中, 加入抗心磷脂抗体后 CD36 抗原的表达较未加时明显升高, 且 CD36 抗原是在 mRNA 和蛋白水平上同时升高, 说明抗心磷脂抗体可促进 U937 细胞 CD36 抗原转录及蛋白水平的合成。同时加入 anti-CD36 单抗后这一作用能被抑制, 更加证明抗心磷脂抗体正是通过使 CD36 抗原表达上调而使氧化型低密度脂蛋白在巨噬细胞中进一步沉积。抗心磷脂抗体的这一病理机制对 As 的发展有重要的促进作用, 也可能是抗心磷脂抗体加速动脉壁脂质条纹形成的重要机制。

### [参考文献]

- [1] Spronk PE, Overbosch EH, Schut NK. Severe atherosclerotic changes, including aortic occlusion, associated with hyperhomocysteinaemia and antiphospholipid antibodies. *Ann Rheum Dis*, 2001, **60** (7): 699-701
- [2] George J, Haratz D, Shoenfeld Y. Accelerated atheroma, antiphospholipid antibodies, and antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, **27** (3): 603-610
- [3] Koike T. Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. *Ann Med*, 2000, **32** (Suppl 1): 27-31
- [4] Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, et al. Affinity purified anti-cardiolipin and anti-DNA antibodies. *J Clin Lab Immunol*, 1985, **17**: 155-162
- [5] Glueck CJ, Lang JE, Tracy T, et al. Evidence that anticardiolipin antibodies are independent risk factors for atherosclerotic vascular disease. *Am J Cardiol*, 1999, **83** (10): 1490-494
- [6] Han J, Hajjar DP, Tauras JM, et al. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J Lipid Res*, 1999, **40** (5): 830-838
- [7] Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expression on lipid laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (5): 1333-339

(此文编辑 朱雯霞)