

[文章编号] 1007-3949(2004)12-01-0019-04

•实验研究•

# 氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡

王庸晋, 魏 武, 王治平, 公惠平

(长治医学院心血管研究所, 山西省长治市 046000)

[关键词] 病理生理学: 氧化型极低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡; 琼脂糖凝胶电泳: 极低密度脂蛋白, 氧化型; 巨噬细胞; 细胞凋亡; 小鼠

[摘要] 探讨氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的作用。应用低温超速离心法分离健康人血浆极低密度脂蛋白, 用  $\text{CuCl}_2$  氧化得到氧化型极低密度脂蛋白。琼脂糖凝胶电泳观察巨噬细胞凋亡 DNA 断裂“梯状”图谱; 流式细胞仪和二苯胺法分别测定凋亡巨噬细胞百分率和 DNA 片断百分率; 光镜观察凋亡巨噬细胞形态变化。结果发现: 氧化型极低密度脂蛋白能诱导巨噬细胞发生凋亡及 DNA 断裂; ④抗氧化剂二甲基硫脲能部分抑制氧化型极低密度脂蛋白诱导的 DNA 断裂; ④核转录因子核因子  $\text{KB}$  抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐可完全抑制氧化型极低密度脂蛋白诱导的 DNA 断裂。提示氧化型极低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡可能是动脉粥样硬化形成机制之一; 氧化型极低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡的作用可能与自由基和激活核因子  $\text{KB}$  有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Research of Apoptotic Celiac Macrophages of the Mouse Induced by Oxidized Very Low Density Lipoprotein

WANG Yong-Jin, WEI Wu, WANG Zhi-Ping, and GONG Hui-Ping

(Institute of Cardiovascular Diseases, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

[KEY WORDS] Very Low Density Lipoprotein, Oxidization; Macrophages; Cell Apoptosis; Rats; Agarose Gel Electrophoresis; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of apoptotic celiac macrophages of the mouse induced by oxidized very low density lipoprotein (ox-VLDL). **Methods** Human blood plasma low density lipoprotein (LDL) was oxidized by  $\text{CuCl}_2$  in order to obtain ox-VLDL. DNA gel electrophoresis was used to observe the DNA ladder pattern of apoptotic macrophages. Flow cytometry and diphenylamine method were used to determine apoptotic macrophage percentage and DNA fragmentation percentage.

The morphological changes of apoptotic macrophages were detected by microscope. **Results** ox-VLDL could induce macrophages apoptosis. ④Dimethylol thiourea, an antioxidative agent, could inhibit in part DNA breakage induced by ox-VLDL. ④Pyrrolidine dithio carbamate, an inhibitor of the activity of nuclear factor- $\text{KB}$ , could inhibit completely DNA breakage induced by ox-VLDL.

**Conclusion** Macrophages apoptosis induced by ox-VLDL may lead to one of mechanisms of atherosclerosis, and is in relation to free radicals and NF- $\text{KB}$  activation.

动脉粥样硬化( atherosclerosis, As) 性血管疾病是危害人类健康的重要疾病, 其发病机理迄今仍未完全阐明。在 As 发生过程中, 巨噬细胞源性泡沫细胞是构成粥样斑块内的重要成份<sup>[1]</sup>。巨噬细胞源性泡沫细胞最终趋于死亡, 其死亡机制迄今不十分清楚。已有研究发现 As 斑块内存在氧化型低密度脂蛋白( oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 和氧化型极低密度脂蛋白( oxidized very low density lipoprotein, ox-VLDL)<sup>[2-5]</sup>。ox-VLDL 具有多种细胞毒作用。文献[6]报道, ox-VLDL 能诱导巨噬细胞凋亡, 这就

解释了 ox-VLDL 的细胞毒作用机制。我国居民多以碳水化合物饮食为主, 血脂升高多以 VLDL 为主, 与欧美人有明显区别, 所以 VLDL 在 As 发生过程中的作用不能忽视。已有报道, ox-VLDL 有多种致 As 作用, 如细胞毒性作用, 促进白细胞与内皮细胞粘附作用<sup>[3]</sup>。故我们推测 ox-VLDL 与 ox-LDL 相似, 诱导巨噬细胞凋亡是使泡沫细胞趋于死亡的机理之一。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

昆明小鼠由长治医学院实验动物室提供, RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品, 脂过氧化物测定药盒为南京建成生物工程研究所产品, 蛋白酶 K(PK) 为 Merck 公司产品, 核糖核酸酶 A、NP-40、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐( pyrrolidine dithio carbamate, PDTC)、

[收稿日期] 2003-05-14 [修回日期] 2003-10-29

[基金项目] 山西省自然科学基金(19991089)资助

[作者简介] 王庸晋, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 现从事心血管病方面的研究。魏武, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 现从事血液病研究。王治平, 硕士, 副主任医师, 现从事心血管病研究。

二甲基硫脲(dimethylol thiourea, DMTU)均为Sigma公司产品,琼脂糖为Promega公司产品,十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)为Life Tech公司产品,其他试剂均为进口或国产分析纯。

## 1.2 小鼠腹腔巨噬细胞制备和培养

收集昆明小鼠(体重 $20.0 \pm 1.0$  g)腹腔巨噬细胞,加入含10%小牛血清的RPMI 1640培养基,以 $2 \times 10^6$ 个细胞/瓶的浓度置于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱培养,8 h后开始试验。实验分6组:对照组(PBS); $\text{ox-VLDL}$ 组; $\text{PDTC}$ 组; $\text{PDTC} + \text{ox-VLDL}$ 组; $\text{DMTU}$ 组; $\text{DMTU} + \text{ox-VLDL}$ 组。

## 1.3 氧化型极低密度脂蛋白制备

抽取禁食12 h的健康人新鲜血液,加入0.12 mol/L乙二胺四乙酸抗凝,离心得到血浆。参考文献[7]方法,分离得到VLDL,然后将VLDL放入含0.2 mol/L乙二胺四乙酸的磷酸缓冲液中透析36 h,所得VLDL经琼脂糖凝胶电泳证明为单一区带。用福林酚法测定其蛋白含量,贮存于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱备用。试验前将VLDL溶液用不含乙二胺四乙酸的磷酸缓冲液充分透析。加入 $\text{CuCl}_2$ (终浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ ), $37^\circ\text{C}$ 温育18 h以氧化VLDL。再以磷酸缓冲液透析除去 $\text{CuCl}_2$ 。测定硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reacting substances, TBARS)值以判定VLDL氧化程度; $\text{ox-VLDL}$ 的TBARS值为8 mol/g蛋白质,明显高于VLDL(2.2 mol/g蛋白质)。

## 1.4 光镜观察细胞形态学变化

经不同因素处理后的巨噬细胞,用HE染色后,光镜下观察其形态学变化。

## 1.5 琼脂糖凝胶电泳测定DNA片断

将收集的巨噬细胞离心后弃上清,加入细胞裂解液、10% SDS和蛋白酶K(终浓度100  $\mu\text{mol/L}$ )。 $37^\circ\text{C}$ 消化过夜,再加10 mol/L乙酸铵和无水乙醇, -

$20^\circ\text{C}$ 沉淀过夜。用TE溶解DNA,核糖核酸酶A(100  $\mu\text{mol/L}$ )  $56^\circ\text{C}$ 消化4 h,取20  $\mu\text{L}$  DNA样品,以1.2%琼脂糖凝胶电泳4 h,溴乙胺染色后紫外透射照相。

## 1.6 二苯胺法测定DNA片断百分率

制备的巨噬细胞悬液离心弃上清,加细胞裂解液后离心,分离出上清(片断DNA)和沉淀(完整DNA),分别加入等体积25%三氯乙酸沉淀过夜。离心弃上清后再加入三氯乙酸溶解沉淀, $90^\circ\text{C}$ 加热10 min,冷却5 min,再加入新配置的1.5%二苯胺溶液,混匀后 $30^\circ\text{C}$ 过夜。取反应后样品加入96孔板,用酶标仪测定A570 nm值,计算DNA片断百分率(上清A值与上清A值和沉淀A值之和的比)。

## 1.7 流式细胞仪检测凋亡细胞百分率

制备的巨噬细胞悬液用70%冷乙醇固定,细胞DNA荧光素染色,流式细胞仪(FACS-420型)分析。测定前以鸡血红细胞作为标记品调整仪器的CV值在3%以内。测量数据图形送入HP-300 Consort 30计算机,应用相应的程序软件进行资料处理。每个样品分析 $10^4$ 个细胞,计算凋亡细胞百分率。

## 1.8 统计方法

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间差异用 $t$ 检验,多个样本均数的两两比较用方差分析 $q$ 检验。以 $P < 0.05$ 示有统计学显著性差异。

# 2 结果

## 2.1 氧化型极低密度脂蛋白诱导的小鼠腹腔巨噬细胞凋亡形态学变化

光镜形态学观察结果发现,200 mg/L  $\text{ox-VLDL}$ 孵育巨噬细胞24 h可诱导巨噬细胞发生典型凋亡细胞形态学变化。细胞体积明显缩小,胞浆浓染,细胞核浓缩并移向细胞膜周边(图1, Figure 1)。

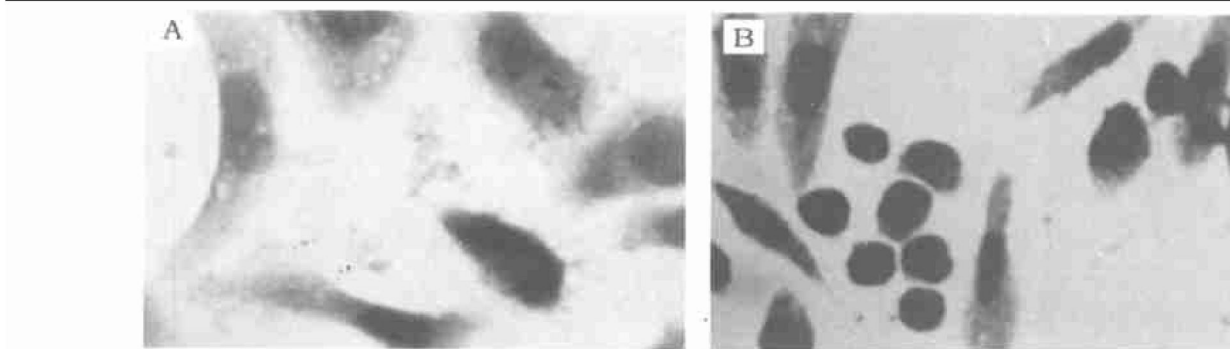


图1. 氧化型极低密度脂蛋白诱导的小鼠腹腔巨噬细胞凋亡形态学变化 A为对照组; B为氧化型极低密度脂蛋白组,光学显微镜观察,细胞体积明显缩小,胞浆浓染,细胞核浓缩并移向细胞膜周边。

Figure 1. Morphological changes of celiac macrophages of the mouse elicited by  $\text{ox-VLDL}$  ( $\times 100$ )

## 2.2 氧化型极低密度脂蛋白诱导的小鼠腹腔巨噬细胞凋亡 DNA 变化

2.2.1 DNA 凝胶电泳 200 mg/L ox-VLDL 孵育腹腔巨噬细胞后,可诱导典型的 DNA“梯状”图谱,此作用具有时间依赖性。孵育时间短于 6 h 未见有 DNA 断裂。VLDL 孵育腹腔巨噬细胞 24 h 不能诱导 DNA 断裂(图 2, Figure 2)。

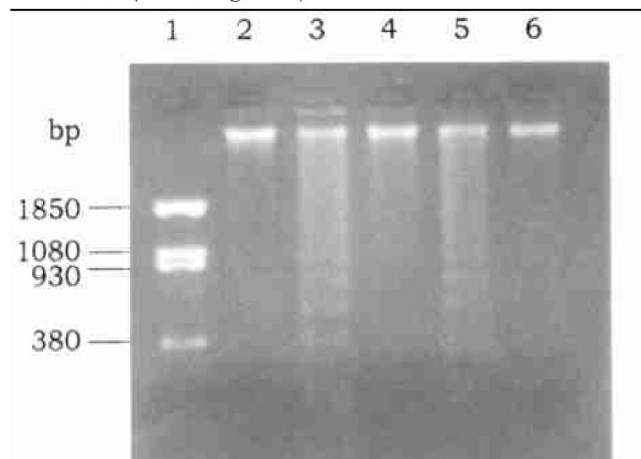


图 2. 氧化型极低密度脂蛋白不同作用时间对小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响 1 为分子质量标准品; 2 为 6 h; 3 为 12 h; 4 为 VLDL; 5 为 24 h; 6 为 PBS。

Figure 2. Time-dependent effects of ox-VLDL on DNA fragmentation of apoptotic celiac macrophages of the mouse ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.2.2 DNA 片断百分率和凋亡细胞百分率的变化

以不同浓度 ox-VLDL(50, 100, 200 mg 蛋白质/L) 孵育腹腔巨噬细胞 24 h 后, DNA 片断百分率和凋亡细胞百分率随 ox-VLDL 浓度增高逐渐增加, 呈剂量依赖关系(表 1, Table 1)。

表 1. 不同剂量 ox-VLDL 对小鼠腹腔巨噬细胞 DNA 片断和细胞凋亡百分率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Dose-dependent effects of ox-VLDL on the percentage of DNA fragmentation and apoptotic celiac macrophages of the mouse induced by ox-VLDL

分 组	DNA 片断	凋亡的巨噬细胞
对照组	7.14% $\pm$ 1.79%	5.19% $\pm$ 0.75%
50 mg/L ox-VLDL	8.57% $\pm$ 3.23%	5.21% $\pm$ 0.75%
100 mg/L ox-VLDL	18.58% $\pm$ 3.21% <sup>a</sup>	16.67% $\pm$ 1.50% <sup>a</sup>
200 mg/L ox-VLDL	37.16% $\pm$ 8.57% <sup>a</sup>	34.82% $\pm$ 11.11% <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较

## 2.3 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)和二甲基硫脲(DMTU)对氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响

核因子  $\kappa$ B 抑制剂 PDTC(50 mol/L)与 ox-VLDL

(200 mg/L)共同孵育腹腔巨噬细胞 24 h 能取消其诱导的 DNA 断裂。抗氧化剂 DMTU(0.05 mg/L)与 ox-VLDL 共同孵育腹腔巨噬细胞,可部分抑制 ox-VLDL 诱导的 DNA 片断百分率( $P < 0.01$ )(表 2, Table 2)。DNA 凝胶电泳分析结果见图 3(Figure 3)。

表 2. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)和二甲基硫脲(DMTU)对氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡片断百分率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Effects of PDTC and DMTU on ox-VLDL-induced the percentage of DNA fragmentation in celiac macrophages of the mouse

分 组	DNA 片断
对照组	4.68% $\pm$ 1.45%
ox-VLDL 组	19.68% $\pm$ 3.63%
PDTC 组	5.00% $\pm$ 2.10%
PDTC+ ox-VLDL 组	5.81% $\pm$ 1.78% <sup>a</sup>
DMTU 组	6.13% $\pm$ 3.23%
DMTU+ ox-VLDL 组	11.61% $\pm$ 4.68% <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

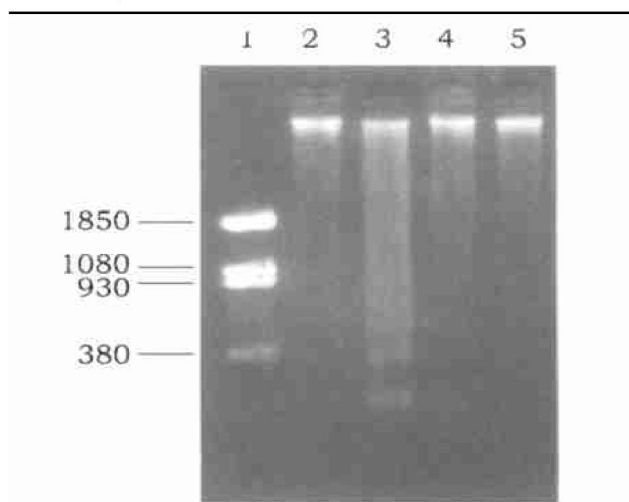


图 3. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐和二甲硫脲抑制氧化型极低密度脂蛋白诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的 DNA 凝胶电泳分析 1: 为分子质量标准品; 2 为 PBS; 3 为 ox-VLDL; 4 为 PDTC; 5 为 DMTU。

Figure 3. The effects of PDTC and DMTU on ox-VLDL-induced DNA fragmentation of apoptotic celiac macrophages of the mouse

## 3 讨论

本文采用超速离心法提取分离健康人 VLDL, 并以  $\text{CuCl}_2$  氧化 VLDL 获得 ox-VLDL, 观察了 ox-VLDL 诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的作用。结果表明 ox-VLDL 可诱导巨噬细胞凋亡, 这种作用能被抗氧化剂

DMTU 部分抑制及核因子  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa\text{B}$ ) 抑制剂 PDTC 所取消。在 As 发展过程中伴有血浆脂质过氧化反应增强, 血浆某些脂蛋白发生氧化修饰转为氧化型的脂蛋白<sup>[8]</sup>, 已有研究证实, 在 As 斑块内存在 ox-LDL 和 ox-VLDL<sup>[3]</sup>。As 发生时首先见这些脂蛋白沉积于内皮下间隙, 随之趋化单核细胞进入该区域, 分化为巨噬细胞, 继而摄取大量脂质成为泡沫细胞, 这些泡沫细胞最终趋于死亡, 是构成 As 的粥样物质的重要来源。已有文献报道, 某些细胞的死亡与氧化型的脂蛋白(包括氧化型高密度脂蛋白、ox-LDL 和 ox-VLDL) 有关<sup>[10]</sup>, 但其确切机制还不十分清楚。由于我国居民多以糖类饮食为主, 血脂升高多以 VLDL 为主, VLDL 能刺激小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达增强<sup>[11]</sup>, 因此, ox-VLDL 在 As 形成过程中的作用不可忽视。

近几年研究发现, 细胞死亡主要通过两种形式, 其一是细胞坏死, 其二是细胞凋亡, 后者是一种主动的、由基因调控的不同于细胞坏死的死亡形式, 具有特殊的细胞形态学改变和细胞核 DNA 断裂的特征“梯形”变化<sup>[12]</sup>。本文结果表明, ox-VLDL 孵育小鼠腹腔巨噬细胞可诱导巨噬细胞发生典型细胞凋亡形态学变化, 表现为细胞体积缩小, 胞浆浓染, 细胞核浓缩移向细胞周边, 琼脂糖 DNA 凝胶电泳结果也显示有典型的“梯状”图谱, 在 180~200 bp 范围有 DNA 断裂带。这种作用具有时间和剂量依赖性关系, 表明 ox-VLDL 可诱导巨噬细胞凋亡。

目前研究发现自由基与细胞凋亡有关, 它可以直接损伤 DNA, 从而激活多聚转移酶而诱导细胞凋亡; 或间接通过核因子  $\kappa\text{B}$  使细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本实验所用抗氧化剂 DMTU 能部分抑制 ox-VLDL 诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡, 表明 ox-VLDL 可能通过刺激细胞产生自由基损伤 DNA。另一方面 ox-VLDL 本身已形成的过氧化脂质可能直接损伤 DNA。

近年来研究发现, 核因子  $\kappa\text{B}$  是细胞氧化还原调控的核转录因子之一, 是多种信号转导的汇聚点, 可被很多外界刺激所活化。它在某些因素诱导的细胞

凋亡中起重要作用。PDTC 为一种金属螯合剂, 是公认的核因子  $\kappa\text{B}$  特异性抗氧化抑制剂, 对许多刺激剂(肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 等) 诱导 Jurkat T 细胞、Hela 细胞、702/3 细胞等多种细胞的核因子  $\kappa\text{B}$  激活都有抑制作用<sup>[14]</sup>。本研究发现核因子  $\kappa\text{B}$  抑制剂 PDTC 能完全取消 ox-VLDL 引起的小鼠腹腔巨噬细胞凋亡, 表明 ox-VLDL 可通过激活核因子  $\kappa\text{B}$  而诱导巨噬细胞凋亡。由于 PDTC 兼有一定抗氧化作用, 故推测 ox-VLDL 的作用可能是其刺激细胞氧化应激反应增强, 激活 NF- $\kappa\text{B}$  而诱导巨噬细胞凋亡。

#### [参考文献]

- [1] Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchinson MJ. Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal anti-bodies. *J Pathol*, 1985, **146**: 197-204
- [2] Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 5134-138
- [3] Morel DW, Chisolm GM. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res*, 1989, **30**: 1827-834
- [4] 田庆印. 氧化修饰脂蛋白与动脉粥样硬化. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**: 149-153
- [5] 赖祥洪, 冯宗欣, 王式平, 王淳本. 氧化极低密度脂蛋白的致粥样硬化作用增强. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**: 176
- [6] Niu XL, Zhang XW, Guo ZG. Ox-VLDL induce apoptosis in macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, **17**: 467-470
- [7] Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res*, 1980, **21**: 284-291
- [8] Galle J, Luckhoff A, Busse R, Bassenge E. Ox-LDL potentiate vasoconstrictions to various agonists by direct interaction with vascular smooth muscle. *Circ Res*, 1990, **166**: 1287-293
- [9] 王建波, 王淳本, 刘志国, 田俊, 屈伸. Dil 标记脂蛋白改良法的建立. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 65-68
- [10] Hessler JR, Robertson AL Jr, Chisolm GM. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis*, 1979, **32**: 213-229
- [11] 陈培利, 冯友梅, 从容, 王淳本, 宗义强, 邓耀祖. 极低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7**: 95-98
- [12] Gold R, Schmred M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*, 1994, **71**: 219-225
- [13] Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappa B, and human disease. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 3-6
- [14] Li N, Karin M. Is NF- $\kappa\text{B}$  the sensor of oxidative stress? *FASEB J*, 1999, **13**: 1137-143

(此文编辑 曾学清, 胡必利)