

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0165-04

• 实验研究 •

## 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 介导氧化型低密度脂蛋白促进血管平滑肌细胞表达白细胞介素 6

魏钧伯, 魏盟<sup>1</sup>, 蔡绳, 张英民<sup>2</sup>

(复旦大学附属中山医院心内科, 上海市 200032; 1. 上海市第六人民医院心内科, 上海市 200233;

2. Biomolecular Science Center, University of Central Florida, Orlando 32816-2360)

[关键词] 分子生物学; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 介导白细胞介素 6 表达; 聚合酶链反应; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 白细胞介素 6

[摘要] 观察氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞白细胞介素 6 表达的影响及血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在其中的作用。人脐带动脉平滑肌细胞体外原代培养, 传至 4~5 代。氧化型低密度脂蛋白干预, 观察不同时间点白细胞介素 6 mRNA 表达, 及不同浓度氧化型低密度脂蛋白对白细胞介素 6 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的影响。并观察血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 抑制剂多聚肌酐酸对白细胞介素 6 mRNA 表达的影响。结果发现, (1) 氧化型低密度脂蛋白作用后, 白细胞介素 6 mRNA 表达显著升高, 作用 6 h 出现峰值。随着氧化型低密度脂蛋白浓度升高, 白细胞介素 6 mRNA 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达均明显升高, 后两者呈正相关( $r = 0.943, P < 0.01$ )。 (2) 多聚肌酐酸抑制血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 后, 白细胞介素 6 mRNA 表达明显下降。以上表明氧化型低密度脂蛋白明显促进血管平滑肌细胞白细胞介素 6 的表达, 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在此过程中起重要介导作用。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

### Oxidized Low Density Lipoprotein Enhances Interleukin-6 Expression of Vascular Smooth Muscle Cell via Lectin-like Low Density Lipoprotein Receptor-1

WEI Jun-Bo, WEI Meng<sup>1</sup>, CAI Nai-Sheng, and ZHANG Ying-Min<sup>2</sup>

(Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032; 1. Department of Cardiology, the Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200233, China; 2. Biomolecular Science Center, University of Central Florida, Orlando 32816-2360, American)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Oxidized Low Density Lipoprotein; Interleukin-6; Lectin-like Low Density Lipoprotein Receptor-1; Vascular Smooth Muscle Cell; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** Atherosclerosis is a kind of chronic inflammation. The purpose of this study is to observe, in the inflammation course, how oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) impact interleukin-6 (IL-6) expression of vascular smooth muscle cell (VSMC) and how lectin-like low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) act as. **Methods** Smooth muscle cell from human umbilical artery was cultured in vitro. Took 4-5th generation for use. Grouping according to different ox-LDL concentrations and reaction times. Then, detection the quantity of VSMC IL-6 mRNA and LOX-1 mRNA with RT-PCR. Further more, observe how one inhibitor of LOX-1 named as polyinosinic acid influence the production of VSMC IL-6 mRNA. **Results** 1. The quantity of VSMC IL-6 mRNA increased highly after cultured with ox-LDL ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). The peak value was found at about 6th hour. The expression of IL-6 mRNA and LOX-1 mRNA were increased with ox-LDL concentration ascending ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). There is a positive relationship between IL-6 mRNA and LOX-1 mRNA ( $r = 0.943, P < 0.001$ ). 2. IL-6 mRNA was reduced when LOX-1 was inhibited by polyinosinic acid ( $P < 0.01$  or  $P < 0.001$ ). **Conclusions** ox-LDL can induce increased expression of VSMC LOX-1 mRNA. LOX-1 plays a vital rule in this process.

目前, 许多证据表明动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程<sup>[1]</sup>, 由内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞等多种细胞及白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-

6)、内皮细胞粘附分子、巨噬细胞趋化蛋白 1、肿瘤坏死因子、基质金属蛋白酶等多种炎症介质参与<sup>[2,3]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在动脉粥样硬化病理生理过程中起了关键作用<sup>[4]</sup>。血管壁细胞上有多种受体可供 ox-LDL 结合, 如清道夫受体 A、清道夫受体 B 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 等, 其中 LOX-1 是近年来发现的新型受体, 是一种 50 kDa 大小的 C 型膜

[收稿日期] 2003-09-08 [修回日期] 2004-02-01

[作者简介] 魏钧伯, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化炎症机理, 联系电话 021-64439602, E-mail 为 jbwci2001@yahoo.com.cn。魏盟, 主任医师, 教授, 科主任, 在心脏病介入诊断及治疗方面成果显著, 联系电话 021-64369181-8338, E-mail 为 Mrweei@sina.com, 本文通讯作者。蔡绳, 主任医师, 教授, 在心律失常、高血压病和冠心病方面成果显著, 联系电话 021-64041990。

蛋白,可与多种配体结合,包括修饰的脂蛋白(ox-LDL、乙酰化低密度脂蛋白等)、多聚阴离子化合物(多聚肌酐酸、爱兰苔胶)、阴离子磷脂和一些细菌、凋亡的细胞等结合。LOX-1最早发现于血管内皮细胞,后来发现血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)、巨噬细胞、血小板、纤维细胞也有表达。较多研究表明LOX-1在内皮细胞结合、内吞、降解ox-LDL, ox-LDL致内皮细胞功能失调、凋亡等过程中起主要作用<sup>[5,6]</sup>。既往研究多集中于LOX-1对于内皮细胞的作用,但关于LOX-1在粥样斑块主要细胞成份巨噬细胞、VSMC及其形成的泡沫细胞中的作用研究还较少。为此,我们拟观察动脉粥样病变形成过程中ox-LDL对VSMC表达炎症因子的作用,并观察LOX-1是否在其中发挥介导作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 平滑肌细胞原代培养

取新鲜脐带,分离脐动脉,去除外膜及内膜,剪碎中膜平滑肌,种植于75 mL培养瓶中,用含10%胎牛血清的M199贴壁法培养,传至4~5代用于实验。以抗 $\alpha$ 肌动蛋白抗体进行免疫组织化学鉴定,扫描电镜及透射电镜进行形态学鉴定,证实为血管平滑肌细胞(VSMC)。

细胞用于实验前以含0.1% FBS的M199培养24 h,然后分组实验。第一组实验用20 mg/L ox-LDL作用1、6、12和24 h,观察IL-6 mRNA的表达。第二组实验用不同浓度ox-LDL(1、10和100 mg/L)作用24 h,观察平滑肌细胞IL-6和LOX-1 mRNA表达。第三组实验用20 mg/L ox-LDL + 250 mg/L多聚肌酐酸(Sigma公司),培养24 h,观察IL-6 mRNA表达。所有实验都用含0.1%胎牛血清的M199作为空白对照。

### 1.2 氧化型低密度脂蛋白制备

低密度脂蛋白购自Bioscience公司,用CuCl<sub>2</sub>溶液37℃氧化18 h,使之成为ox-LDL。加入乙二胺四乙酸(EDTA)终止反应。二喹啉甲酸法(试剂盒购自上海申能博彩)测定ox-LDL浓度。

### 1.3 总RNA提取及逆转录

弃干净培养瓶中的培养液,每瓶细胞加入1 mL RNA提取液,然后依次用氯仿、异丙醇萃取,得到的RNA沉淀物用分光光度计测260 nm和280 nm吸光值,计算RNA浓度。按如下体系进行逆转录:RNA 2  $\mu$ g,寡核苷酸引物(上海生物工程公司)1  $\mu$ L, RNasin(上海生物工程公司)1  $\mu$ L, 5' 缓冲液6  $\mu$ L, dNTP

(上海生物工程公司)2  $\mu$ L、AMV 逆转录酶(Promega公司)40 u,用去RNA酶三蒸水补足至25  $\mu$ L, 42℃ 1 h, 70℃ 15 min。得到的cDNA保存于-20℃。

### 1.4 聚合酶链反应

寡核苷酸引物序列参照文献,经NCBI网站BLAST程序鉴定后,由上海生物工程公司合成,内参照为 $\beta$ -actin,各引物序列分别为IL-6(96 bp)正义链5'-TGACAAACAAATTCGGTACATCCT-3',反义链5'-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCAG-3'; LOX-1(193 bp)正义链5'-TTACTCTCCATGGTGGTGGCC-3',反义链5'-AGCTTCTTCTGCTTGTGCC-3';  $\beta$ -actin(991 bp)正义链5'-TGGGCATGGGTGAGAAGGAT-3',反义链5'-AAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'。

聚合酶链反应体系为cDNA模板2  $\mu$ L、dNTP 1  $\mu$ L, 10' 缓冲液5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L,寡核苷酸引物20 pmol/L, Taq酶(上海生物工程公司)1  $\mu$ L, 灭菌三蒸水补足至50  $\mu$ L混匀。94℃预变性300 s,然后94℃变性30 s  $\rightarrow$  55℃退火60 s  $\rightarrow$  72℃延伸90 s, 30个循环,最后延伸600 s。PCR产物在1.7%琼脂糖凝胶上电泳,扫描仪拍照,Toptal软件分析电泳条带灰度值。计算各灰度值对相应 $\beta$ -actin灰度值的比值,比值之间进行统计分析。

### 1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异比较采用t检验,Prism 3.0软件进行统计分析,差异显著水平以 $P < 0.05$ 为标准。

## 2 结果

### 2.1 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间对平滑肌细胞白细胞介素6 mRNA表达的影响

用20 mg/L ox-LDL处理不同时间的VSMC IL-6 mRNA表达的相对值见表1(Table 1),与ox-LDL(20 mg/L)作用前比较,各时间段IL-6 mRNA表达明显升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ ),6 h出现峰值。6 h与1 h相比,升高36.8% ( $P = 0.0148$ ),但6 h、12 h与24 h之间,IL-6 mRNA表达变化未发现统计学意义。说明ox-LDL可持续促进VSMC表达IL-6。

### 2.2 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞白细胞介素6及血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1 mRNA表达的影响

用不同浓度的ox-LDL处理VSMC 24 h, IL-6和LOX-1 mRNA的表达见表2(Table 2)和图1(Figure 1)。与对照组比较,不同浓度的ox-LDL均使IL-6和LOX-1 mRNA表达显著升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.$

001)。对于 IL-6 mRNA, 100 mg/L 与 10 mg/L 组比较, 升高 53.8% ( $P = 0.0123$ ), 但是 10 mg/L 与 1 mg/L 组相比, 未发现具统计学意义的差异。提示低浓度 ( $\leq 10$  mg/L) 范围内 ox-LDL 对 VSMC IL-6 mRNA 表达的影响不大, 但高浓度 ox-LDL 具有较强促进作用。对于 LOX-1 mRNA, 100 mg/L 与 10 mg/L 组比较, 升高 85.2% ( $P = 0.0053$ ), 10 mg/L 与 1 mg/L 组比较, 升高 69.3% ( $P = 0.032$ ), 提示 ox-LDL 浓度升高, LOX-1 mRNA 随之升高。各浓度组 IL-6 mRNA 和 LOX-1 mRNA 进行相关分析, 发现两者呈正相关 ( $n = 12, r = 0.943, P < 0.001$ )。提示 ox-LDL 作用下, IL-6 mRNA 表达升高与 ox-LDL 诱导 LOX-1 表达有关(图 2, Figure 2)。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间血管平滑肌细胞白细胞介素 6 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. VSMC IL-6 mRNA expression after co cultured with 20mg/L ox-LDL for different time

时间分组	n	IL-6 mRNA
对照组	3	0.145 ± 0.013
1 h	3	0.273 ± 0.015 <sup>a</sup>
6 h	3	0.373 ± 0.020 <sup>b</sup>
12 h	3	0.350 ± 0.017 <sup>b</sup>
24 h	3	0.335 ± 0.018 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

表 2. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞表达白细胞介素 6 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The expression of VSMC IL-6 and LOX-1 mRNA after co cultured with different concentrations of ox-LDL

浓度分组	n	IL-6 mRNA	LOX-1 mRNA
对照组	3	0.120 ± 0.013	0.013 ± 0.002
1 mg/L 组	3	0.248 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.062 ± 0.009 <sup>a</sup>
10 mg/L 组	3	0.287 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.105 ± 0.010 <sup>b</sup>
100 mg/L 组	3	0.442 ± 0.025 <sup>b</sup>	0.194 ± 0.013 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 2.3 多聚肌酐影响白细胞介素 6 mRNA 表达

加入 LOX-1 抑制剂多聚肌酐 (250 mg/L) 作用 24 h 后, IL-6 mRNA 的表达见表 3 (Table 3)。与单纯 ox-LDL (20 mg/L) 组相比, IL-6 mRNA 表达下降 52.9% ( $P < 0.001$ )。ox-LDL+ 多聚肌酐组与对照组比较, 未见明显差异 ( $P > 0.05$ )。提示多聚肌酐几乎完全抑制了 ox-LDL 对 VSMC IL-6 mRNA 表达的促进作用。

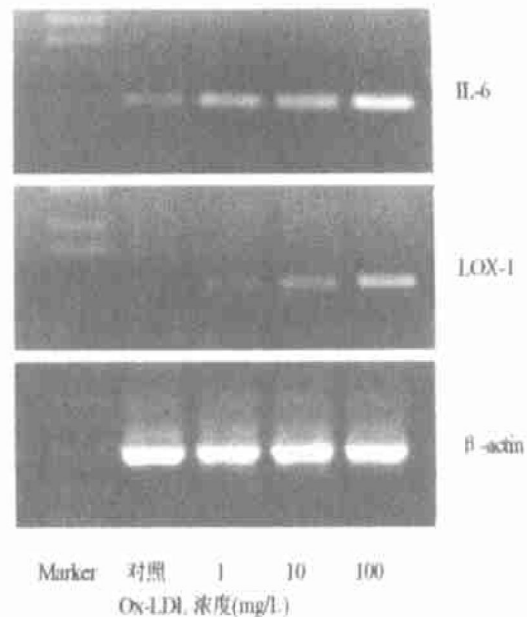


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白影响平滑肌细胞表达白细胞介素 6 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 泳道下的 1、10 和 100 为 ox-LDL 浓度 (mg/L)。

Figure 1. PCR products of VSMC IL-6 and LOX-1, after co cultured with different concentrations of ox-LDL

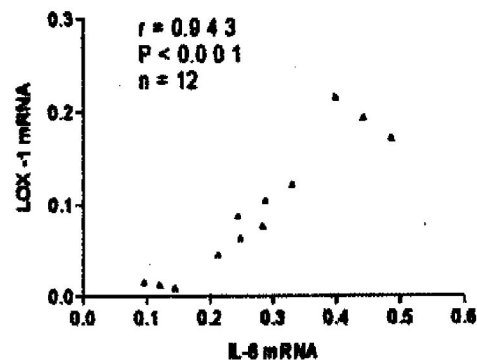


图 2. 平滑肌细胞表达白细胞介素 6 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 的相关分析

Figure 2. The correlation of VSMC expressed IL-6 mRNA and LOX-1 mRNA

表 3. 多聚肌酐对平滑肌细胞白细胞介素 6 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The effect of polyinosinic acid on the expression of VSMC IL-6 mRNA ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	IL-6 mRNA
对照组	3	0.145 ± 0.013
Ox-LDL 组	3	0.335 ± 0.018 <sup>b</sup>
Ox-LDL+ 多聚肌酐组	3	0.335 ± 0.018 <sup>bc</sup>

a:  $P > 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c:  $P < 0.001$ , 与 ox-LDL 组比较。

### 3 讨论

目前普遍认为 ox-LDL 在动脉粥样病变的形成与发展中起关键作用<sup>[7]</sup>。除导致内皮受损、激活斑块部位淋巴细胞外,还可致血管平滑肌细胞及巨噬细胞迁移、增殖、泡沫化及凋亡,并促进其分泌多种炎症介质,参与斑块的炎症过程<sup>[4]</sup>。内皮细胞在粥样病变形成时虽起重要作用,但作为斑块的特征性细胞,VSMC 和巨噬细胞在斑块进一步演变、失去稳定性及破裂过程中起了更主要作用。在斑块的炎症反应中,IL-6 被认为是一种多效能炎症因子,它可诱导 B 细胞分化、T 细胞激活<sup>[8]</sup>、VSMC 增殖<sup>[9]</sup>,促进巨噬细胞迁移、分泌基质金属蛋白酶<sup>[10]</sup>及表达低密度脂蛋白受体<sup>[11]</sup>,促进 VSMC 表达急性时相蛋白<sup>[12]</sup>,不稳定心绞痛病人外周血 IL-6 升高<sup>[13]</sup>,它在斑块内炎症反应中的地位不言而喻。本实验通过体外培养,进一步证实 ox-LDL 可促进 VSMC IL-6 转录水平的增加,其作用在数 h 即达峰值,并具有持续性,如 ox-LDL 浓度增加,作用则增强。所以实验结果支持了粥样硬化中 ox-LDL 的重要作用并发现 IL-6 持续表达。因此认为在斑块局部,ox-LDL 促进 IL-6 的分泌,参与了局部炎症网络的调节,促使粥样斑块进展。

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)是 ox-LDL 的一种重要受体,具有胞内部分、跨膜部分、颈部和 N-末端血凝素样部分四个结构域,N-末端是功能区,有较强结合 ox-LDL 及其他配体的能力<sup>[14]</sup>。目前多数研究集中于此受体对于内皮细胞的作用,ox-LDL 可通过 LOX-1 促进内皮细胞产生过氧化物、激活核因子  $\kappa$ B、减少 NO 生成、并可导致内皮细胞凋亡<sup>[6]</sup>。本实验证明 LOX-1 的确也存在于 VSMC,在受到 ox-LDL 诱导后,表达明显升高,且高浓度 ox-LDL 有更强的诱导作用,说明不仅对于内皮细胞,而对于 VSMC 而言,LOX-1 也是其结合或内吞 ox-LDL 的重要受体。在 ox-LDL 诱导下,IL-6 与 LOX-1 mRNA 表达存在正相关,提示 ox-LDL 促进 VSMC IL-6 mRNA 表达可能通过此受体介导。

前面已提到,多聚肌酐酸是一种多聚阴离子化合物,可作为 LOX-1 的抑制剂。实验发现多聚肌酐酸几乎完全抑制了 ox-LDL 对 VSMC IL-6 mRNA 的诱

导作用,这更加支持在粥样病变内,至少在 ox-LDL 诱导 VSMC IL-6 表达这一炎症过程中,LOX-1 起到了关键的介导作用。在冠心病治疗措施中阻断该受体也许是一种抑制斑块内炎症、稳定粥样斑块的有效未来方法。

实验证实了 LOX-1 是 ox-LDL 的受体,存在于 VSMC,并在 ox-LDL 与 VSMC 结合、促进 VSMC 表达 IL-6 过程中发挥了关键作用。但 LOX-1 对于 VSMC 及对于斑块内整体炎症反应的作用可能远不止如此,需进一步进行相关研究。

#### [参考文献]

- [1] 范乐明. 动脉粥样硬化的炎症和免疫机制. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2 (1): 51-55
- [2] Wenzel UO, Fouqueray B, Grandaliano G. Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein 1 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995, 77: 503-509
- [3] Sower LE, Froelich CJ, Carney DH, Fenton JW, Klimpel GR. Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells: evidence for the involvement of the seven transmembrane domain (STD) receptor for thrombin. *J Immunol*, 1995, 155: 895-901
- [4] Steinberg D. LDL oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20 963-966
- [5] Chen M, Masaki T, Sawamura T. Lox-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, 2002, 95 (1): 89-100
- [6] Li D, Jawahar L. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (4): 1 116-122
- [7] 田庆印, 潘其兴. 氧化修饰脂蛋白与动脉粥样硬化. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4 (2): 149-153
- [8] Le J, Vileek L. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest*, 1998, 61: 588-602
- [9] Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol*, 1991, 260: H1713-717
- [10] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res*, 1994, 75 (1): 181-189
- [11] Humanak R, Kohno K, Seguchi T. Induction of low density lipoprotein receptor and a transcription factor SP-1 by tumor necrosis factor in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1992, 267 (19): 13 160-165
- [12] Biswas P, Delfanti F, Mengozzi M. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein 1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*, 1998, 91 (1): 258-265
- [13] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C. Elevated levels of interleukin 6 in unstable angina. *Circulation*, 1996, 94: 874-877
- [14] Sawamura T, Kume N, Aoyama T. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 1997, 386: 73-77

(此文编辑 胡必利)