

低密度脂蛋白免疫复合物对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯蓄积和一氧化氮释放的影响

张春妮¹, 张辰宇¹, 汪俊军², 周 毓², 李 文², 刘建宁¹

(1. 南京大学分子医学研究所, 江苏省南京市 210093; 2. 南京军区南京总医院全军医学检验中心, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 生物化学; 脂蛋白免疫复合物致动脉硬化作用; 酶荧光法; 低密度脂蛋白; 免疫复合物; 泡沫细胞; 一氧化氮

[摘要] 目的 探讨低密度脂蛋白免疫复合物对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯的蓄积和一氧化氮释放的影响。方法 密度梯度超速离心从新鲜人血浆分离天然低密度脂蛋白, 与抗低密度脂蛋白抗血清 IgG 组分制备低密度脂蛋白免疫复合物, 低密度脂蛋白免疫复合物与小鼠腹腔巨噬细胞孵育后采用酶荧光法检测细胞胆固醇酯含量, 进行细胞形态学观察和组织化学分析, 并用硝酸还原酶法测定细胞释放至培养基中的一氧化氮量。结果 低密度脂蛋白免疫复合物剂量依赖性地诱导巨噬细胞内胆固醇酯的大量堆积, 其效应显著强于氧化型低密度脂蛋白 ($P < 0.01$), 经低密度脂蛋白免疫复合物处理的巨噬细胞呈典型泡沫细胞状, 与猩红强染色, 而天然低密度脂蛋白、抗低密度脂蛋白 IgG 处理的巨噬细胞内未见胆固醇酯的蓄积。此外, 低密度脂蛋白免疫复合物剂量依赖性地抑制巨噬细胞一氧化氮的分泌。结论 低密度脂蛋白免疫复合物不仅通过致小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化, 也通过损伤巨噬细胞分泌一氧化氮的功能参与致动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

The Effects of Low Density Lipoprotein Immune Complexes on the Accumulation of Cholesteryl Ester in Mouse Peritoneal Macrophages and on the Release of Nitric Oxide from the Macrophages

ZHANG Chun Ni¹, ZHANG Chen Yu¹, WANG Jun Jun², ZHOU Yu², LI Wen², and LIU Jian Ning¹

(1. Institute of Molecular Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093; 2. Center of Medical Laboratory Science, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

[KEY WORDS] Low Density Lipoprotein; Immune Complexes; Macrophages; Foam Cell; Nitric Oxide; Atherosclerosis; Mouse

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of low density lipoprotein immune complexes (LDL-IC) on the accumulation of cholesteryl ester (CE) in mouse peritoneal macrophages and on the secretion of nitric oxide (NO) from the macrophages.

Methods LDL was isolated from fresh human plasma by ultracentrifugation, and then LDL-IC was prepared by incubating LDL with IgG fraction of a sheep anti-LDL antiserum in vitro. After mouse peritoneal macrophages were incubated with LDL-IC, cellular cholesteryl ester mass was quantified by an enzymatic fluorometric methods and the morphological observation and histochemistry of macrophages were performed. In addition, nitric oxide secreted from macrophages to the medium was measured by nitric acid reductase method.

Results The levels of cellular CE in macrophages were increased markedly with LDL-IC dose dependent manner, which was significantly higher than that induced by corresponding level of oxidized LDL (ox-LDL) ($P < 0.01$).

Whereas native LDL and apoB-IgG did not show any effect on the level of cellular CE. Morphologically, after exposure to LDL-IC, macrophages exhibited a phenotype typical of lipid-laden foam cell, becoming strongly stained with scarlet. In addition, the content of NO in the medium released from the macrophages were decreased and also showed a LDL-IC dose dependent manner.

Conclusion LDL-IC participates in atherosclerotic formation not only by inducing the formation of foam cell, but also by damaging the function of NO of macrophages.

[收稿日期] 2004-08-31

[修回日期] 2005-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30471649)和江苏省六大人才高峰基金资助

[作者简介] 张春妮, 博士, 副教授, 主要研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化的研究, 电话为 025-80860181, E-mail 为 zchunni@public1.ptt.js.cn。张辰宇, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为分子内分泌和糖尿病代谢, 电话为 025-83686697, E-mail 为 cyzhang@nju.edu.cn。汪俊军, 硕士, 副教授, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化的研究, 电话为 025-80860181, E-mail 为 wangjj@jlonline.com。

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化后具有一定的免疫原性, 诱导机体产生自身抗体并与体内 LDL 结合, 形成 LDL 免疫复合物(LDL immune complex, LDL-IC)^[1]。我们既往的研究发现人血浆 LDL-IC 水平与体内氧化型 LDL(oxidized LDL, ox-LDL)水平高度正相关, 与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性心脑血管疾病有关^[2]。国外体外实

验发现 LDL-IC 可促进 As 的发生、发展^[3,4], 但国内尚无相关报道。本实验通过分析 LDL-IC 对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯(cholesteryl ester, CE) 的蓄积及一氧化氮(nitric oxide, NO) 释放的影响以期进一步探讨 LDL-IC 的致 As 作用。

1 材料和方法

1.1 脂蛋白分离与氧化

正常人血浆 LDL 系用密度梯度超速离心法分离($d = 1.019 \sim 1.063 \text{ kg/L}$)^[5], 0.22 μm 滤器除菌过滤, Lowry 法蛋白定量。ox-LDL 参照文献[6] 制备, Ox-LDL 的氧化程度用硫代巴比妥酸值和紫外吸光度 OD₂₃₄ 值鉴定。

1.2 循环免疫复合物的制备

低密度脂蛋白与羊抗人 LDL IgG 37 °C 孵育 2 h 后, 4 °C 过夜, 离心。免疫复合物中 LDL 与 IgG 的浓度由沉淀曲线决定, LDL: IgG 在 3: 1 (v/v) 时沉淀最充分, 为最佳比例。将 LDL-IC 复溶于已灭菌的 pH7.4 PBS 溶液中。

1.3 细胞培养

参照文献[5], 用 6 mL 冷 PBS 收集小鼠(ICR 小鼠, 雄性, 25~30 g) 腹腔巨噬细胞, 细胞接种于 24 孔板, 于 RPMI 1640 (含 3% 牛血清白蛋白) 培养基贴壁培养 2 h 后, 加入脂蛋白继续孵育。

1.4 细胞形态学观察与组织化学分析

细胞与脂蛋白孵育 20 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。细胞与脂蛋白孵育 20 h 后, PBS 洗涤 3 次, 10% 多聚甲醛固定 4 h, 用猩红染色, 再用苏木素复染, 倒置显微镜下观察, 拍照。

1.5 细胞胆固醇测定

采用酶荧光法测定细胞胆固醇含量^[5]。用 Lowry 法测定细胞蛋白。

1.6 细胞培养基中一氧化氮含量测定

细胞与脂蛋白孵育 20 h 后, 取上清液, 用硝酸还原酶法测定细胞释放至培养基中的一氧化氮含量。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白免疫复合物对巨噬细胞胆固醇酯的蓄积作用

比较相同脂蛋白浓度(100 mg/L) 下各种脂蛋白

诱导鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯蓄积的能力发现, 天然 LDL、抗 LDL-IgG 处理的巨噬细胞游离胆固醇和胆固醇酯含量与空白对照组比较差异无显著性; 经 ox-LDL 处理后细胞内胆固醇酯含量明显增加(与空白对照组比较 $P < 0.01$); 而与 LDL-IC 孵育后, 细胞内胆固醇酯含量增加更为显著(与空白对照组比较 $P < 0.001$, 与 ox-LDL 组比较 $P < 0.01$) (表 1, Table 1)。提示 LDL-IC 诱导鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯蓄积的能力强于 ox-LDL。

表 1. 低密度脂蛋白免疫复合物对巨噬细胞胆固醇酯蓄积的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1. Effects of LDL-IC on the accumulation of cellular cholesteryl ester in macrophages

分 组	细胞胆固醇酯 ($\mu\text{mol/g}$)	细胞游离胆固醇 ($\mu\text{mol/g}$)
基质组	5.6 \pm 2.8	68.6 \pm 6.5
LDL 组	5.8 \pm 3.4	71.4 \pm 5.4
抗 LDL-IgG 组	6.9 \pm 2.3	66.7 \pm 6.3
Ox-LDL 组	55.4 \pm 6.4 ^a	83.6 \pm 2.3
LDL-IC 组	115.9 \pm 6.1 ^{ab}	104.3 \pm 5.6 ^b

a: $P < 0.001$, 与基质组比较; b: $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

2.2 低密度脂蛋白免疫复合物诱导鼠腹腔巨噬细胞胆固醇酯蓄积的剂量效应

低密度脂蛋白免疫复合物与鼠腹腔巨噬细胞孵育 18 h, 随 LDL-IC 浓度增加(0 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 和 250 mg/L), 细胞胆固醇酯含量分别为 5.6 \pm 4.8 $\mu\text{mol/g}$ 、63.1 \pm 4.7 $\mu\text{mol/g}$ 、115.9 \pm 6.1 $\mu\text{mol/g}$ 、134.6 \pm 5.6 $\mu\text{mol/g}$ 、145.3 \pm 6.4 $\mu\text{mol/g}$ 和 151.4 \pm 7.5 $\mu\text{mol/g}$, 表明 LDL-IC 剂量依赖性地诱导巨噬细胞胆固醇酯蓄积。

2.3 巨噬细胞形态学观察

倒置显微镜下可见(图 1, Figure 1), LDL 或 IgG 与巨噬细胞孵育 20 h 后, 巨噬细胞形态与基质对照组无差异; 经 ox-LDL 处理的巨噬细胞胞体膨大, 可见胞浆内泡沫状、大小均一的粒状体, 为泡沫细胞状; 而经 LDL-IC 处理的细胞胞体增大最为明显, 胞浆内脂质形成的粒状体几乎充满整个胞浆, 为典型巨噬细胞源性泡沫细胞。

2.4 巨噬细胞组织化学分析

天然 LDL、抗 LDL-IgG 处理的巨噬细胞用猩红染色看不到红色的脂质颗粒; Ox-LDL 和 LDL-IC 处理的细胞呈红色(图 2, Figure 2)。

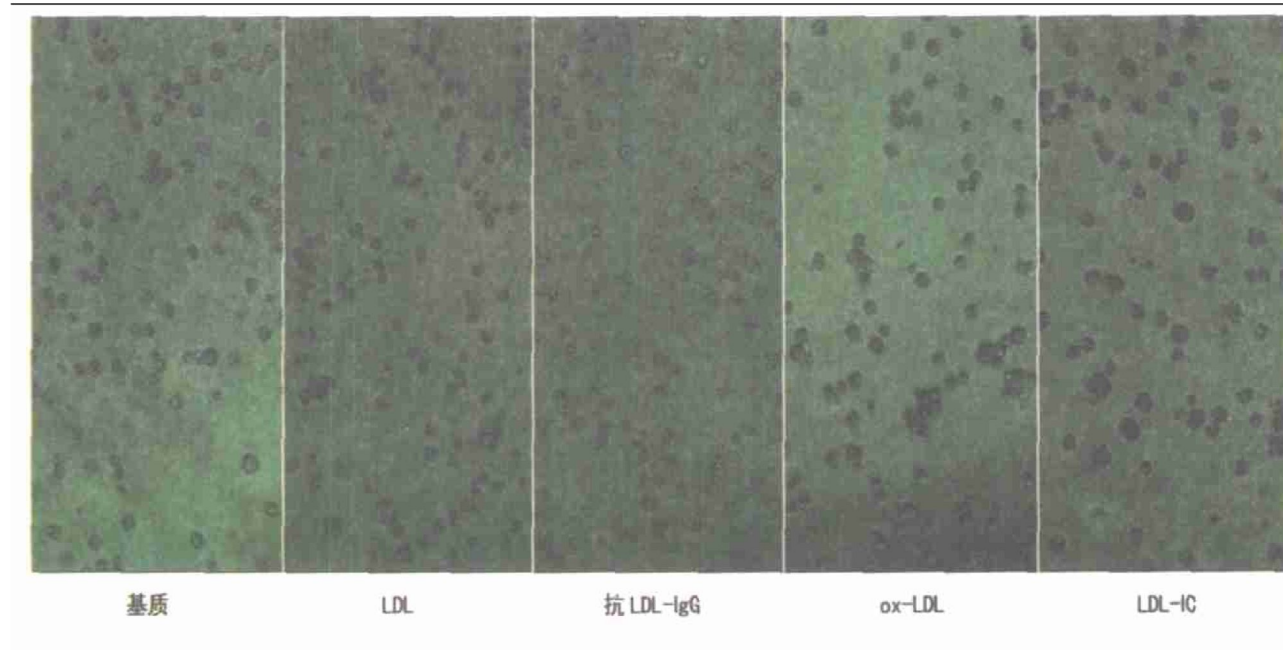


图 1. 各组巨噬细胞光镜照片(×40)

Figure 1. Microscope photos of macrophages in each group (×40)

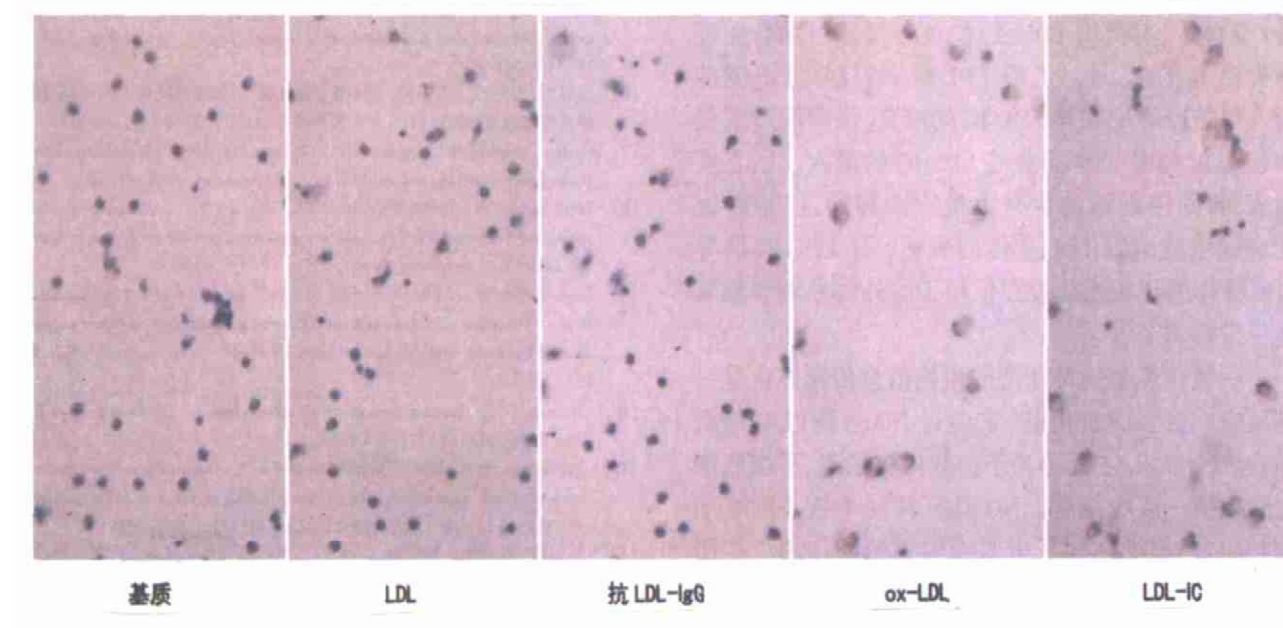


图 2. 各组巨噬细胞猩红染色照片(×40)

Figure 2. Staining of macrophages with scarlet in each group (×40)

2.5 低密度脂蛋白免疫复合物对巨噬细胞分泌一氧化氮的影响

低密度脂蛋白免疫复合物与鼠腹腔巨噬细胞孵育 20 h, 随 LDL-IC 浓度增加(0 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L 和 500 mg/L), 细胞释放至培养基中的 NO 含量分别为 $276.58 \pm 11.89 \mu\text{mol/L}$ 、 $252.71 \pm 12.51 \mu\text{mol/L}$ 、 $226.87 \pm 10.45 \mu\text{mol/L}$ 、 $202.22 \pm 9.87 \mu\text{mol/L}$ 、 $185.12 \pm 10.40 \mu\text{mol/L}$ 、

$150.09 \pm 11.34 \mu\text{mol/L}$ 和 $116.05 \pm 10.41 \mu\text{mol/L}$, 表明 LDL-IC 剂量依赖性地抑制巨噬细胞 NO 释放。

3 讨论

本研究证实, LDL-IC 可被小鼠腹腔巨噬细胞摄取, 呈剂量依赖性地导致鼠腹腔巨噬细胞内 CE 大量堆积, 其效果明显强于 ox-LDL。形态学观察显示与 LDL-IC 孵育后, 巨噬细胞呈现典型泡沫样变性,

与猩红强染色。这些结果进一步证实 LDL-IC 是一种强的泡沫细胞诱导剂。

动脉粥样硬化患者外周血中可检测到循环 LDL-IC, 引起人们高度重视, 进而发现细胞与 LDL-IC 孵育显著干扰脂蛋白和胆固醇代谢。Dachet 等^[7]首次发现将人纤维母细胞与 LDL-IC 直接孵育, 导致细胞内游离胆固醇过量生成, 并引起细胞内 LDL 代谢的变化。随后国外研究表明, LDL-IC 亦可导致不同类型巨噬细胞内 CE 大量的堆积, 这些巨噬细胞包括人单核巨噬细胞、U937 和 THP-1 细胞株。实验证明, 巨噬细胞与 LDL-IC 孵育后细胞内胆固醇酯的蓄积主要是由于 LDL-IC 摄入增加及不受调控所致^[8, 9]。Lopes-Virella 等^[9]用人单核巨噬细胞研究发现, 胆固醇酯积聚与 LDL-IC 的摄取增加有关, 同时也与吞噬细胞内 LDL 的降解延迟有关, 提示巨噬细胞中聚集的胆固醇酯并不都来源于 LDL 的降解, 有一部分来源于溶酶体水解 LDL 后所释出的游离胆固醇的再酯化。已由竞争抑制实验证实^[10], LDL-IC 可以经两种受体途径被巨噬细胞摄取, 主要途径为 Fc γ 受体 iv, 其次为 LDL 受体, Fc γ 受体可结合免疫球蛋白 G 的 Fc 片。乙酰 LDL 或 β -VLDL 均不能抑制人单核巨噬细胞与 LDL-IC 的结合, 说明清道夫受体和 LDL 相关受体不参与 LDL-IC 的摄入。已有实验表明, 即使细胞内含有大量胆固醇酯, LDL-IC 也能增强巨噬细胞 LDL 受体的表达, 且 LDL-IC 诱导 LDL 受体的正相表达过程依赖于胞外信号调节激酶途径进行调节^[11]。

一氧化氮是一种新型的生物信息传递体也是一种反应性极强的自由基, 它通过 NO 合酶以 L-精氨酸为底物合成, 主要分泌于血管内皮细胞、平滑肌细胞和单核—巨噬细胞。NO 具有抑制单核—巨噬细胞粘附、内皮细胞和平滑肌细胞增殖的作用。本研究发现, LDL-IC 可剂量依赖性地抑制小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的分泌。有关 LDL-IC 对巨噬细胞 NO 释放的影响国外尚未见文献报道, 其作用机制不清楚, 但已有大量研究发现 LDL 尤其是 α -LDL 明显抑制内

皮细胞 NO 的生成^[12]。我们推测 LDL-IC 对 NO 影响的机制可能与 α -LDL 有相似之处, 它可能含有与 NO 直接作用的物质降解 NO, 使基础性 NO 产量低, 也可能刺激了蛋白激酶 C 的活性, 使 G 蛋白(Gi-protein)的磷酸化作用增加, G 蛋白受抑制导致 NO 释放减少^[13]。其详细机制有待进一步阐明。

本实验结果不仅进一步证实了 LDL-IC 是比 α -LDL 更强的泡沫细胞诱导剂, 同时发现 LDL-IC 也能通过损伤小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的功能参与致 As 作用。

[参考文献]

- [1] Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fialova L, Lapin A. Antibodies against oxidized LDL: theory and clinical use. *Physiol Res*, 2001, **50** (2): 131-141
- [2] Hu B, Wang JJ, Zhang CN, Cai H. Positive correlation between in vivo oxidized LDL and LDL immune complexes. *Clin Biochem*, 2004, **37**: 72-75
- [3] Gordon PA, George J, Khamashta MA, Harats D, Hughes G, Shoenfeld Y. Atherosclerosis and autoimmunity. *Lupus*, 2001, **10** (4): 249-252
- [4] Gorski A. The role of immune mechanisms in the pathogenesis of atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn*, 2001, **106** (2): 711-717
- [5] Zhang CN, Miyazaki A, Hakamata H, Sakaguchi H, Horiuchi S. Very low and intermediate density lipoprotein fractions from apolipoprotein E gene-knockout mice induce cholesteryl ester accumulation in J774 macrophages. *J Chin Med*, 1999, **112** (6): 543-545
- [6] 张春妮, 庄一义, 吉维民, 刘小传, 强红娟. 氧化型脂蛋白(a)对鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 305-307
- [7] Dachet C, Bandet MF, Beaumont JL. Cholesterol synthesis by human fibroblasts in the presence of LDL and anti-LDL IgA. *Biomedicine*, 1979, **31**: 80-82
- [8] Lopes-Virella MF, Griffith RL, Shunk KA, Virella GT. LDL metabolism by macrophages activated with LDL immune complexes: a possible mechanism of foam cell formation. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11** (5): 1356-367
- [9] Lopes-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, Koskinen S, Evans RW, Becker DJ, et al. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 1999, **9** (2): 165-172
- [10] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (12): 1876-890
- [11] Jorg Kotzka, Stefan Lehr. Insulin-activated ERK-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem*, 2004, **279** (21): 22404-411
- [12] 杜怡峰, 孙圣刚, 童蓓塘, 申黎青. 氧化修饰低密度脂蛋白对血管内皮细胞一氧化氮合成的影响. *中华老年学杂志*, 2003, **20**: 110-112
- [13] Mukherjee S, Coaxum SD, Maleque M, Das SK. Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase activities in bovine endothelial cell. *Cell Mol Biol*, 2001, **47** (6): 1051-058

(此文编辑 朱雯霞)