

低密度脂蛋白免疫复合物对单核细胞源性巨噬细胞胆固醇代谢及低密度脂蛋白受体表达的影响

倪晓晴¹, 朱健华², 孙承龙³

(南通大学附属医院 1. 老年医学科; 2. 心内科; 3. 医学检验中心, 江苏省南通市 226001)

[关键词] 生物化学; 脂蛋白免疫复合物致动脉硬化作用; 低密度脂蛋白; 免疫复合物; 单核细胞源性巨噬细胞; 低密度脂蛋白受体; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究动脉粥样硬化过程中低密度脂蛋白免疫复合物对单核细胞源性巨噬细胞胆固醇代谢和低密度脂蛋白受体表达的影响。方法 以佛波酯刺激分化的 THP-1 细胞作为单核细胞源性巨噬细胞模型。通过胆固醇酶联法测定细胞内胆固醇含量, 逆转录-聚合酶链反应检测细胞低密度脂蛋白受体 mRNA 的表达, Western blot 检测细胞低密度脂蛋白受体蛋白的表达。结果 与低密度脂蛋白组、阴性组及 IgG 免疫复合物组比较, 低密度脂蛋白免疫复合物组细胞内胆固醇水平明显增高, 并且低密度脂蛋白受体 mRNA 及蛋白的表达增加。结论 低密度脂蛋白免疫复合物能显著增加巨噬细胞内胆固醇含量, 亦能够促进低密度脂蛋白受体 mRNA 与蛋白的表达, 提示低密度脂蛋白免疫复合物在动脉粥样硬化进展过程中起重要的作用。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Effects of LDL-Containing Immune Complexes on Cholesterol Metabolism and LDL Receptor Expression in Monocyte-Derived Macrophages

NI Xiao Qing¹, ZHU Jian-Hua², and SUN Cheng-Long³

(1. Department of Geriatric disease; 2. Department of Cardiology; 3. Medical Laboratory Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[KEY WORDS] Low Density Lipoprotein; Immune Complexes; Atherosclerosis; Monocyte Derived Macrophages; Low Density Lipoprotein Receptor; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of low density lipoprotein-immune complexes (LDL-IC) on the cholesterol metabolism and on the expression of low density lipoprotein receptor (LDLR) in monocyte-derived macrophages. **Methods** PMA-treated THP-1 cell were used as a model of monocyte-derived macrophages. Quantitative analysis of intracellular cholesterol content was performed by cholesterol enzyme link assays. The expression of LDLR mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and LDLR protein was detected by Western blot. **Results** The intracellular cholesterol level treated with LDL-IC was higher than other groups treated with LDL, IgG-IC and negative control. Both LDLR mRNA and LDLR protein values of macrophages stimulated by LDL-IC were significantly enhanced. **Conclusions** Incubating with LDL-IC can not only markedly elevate the intracellular cholesterol content but also promote the expression of LDLR mRNA and protein which suggest LDL-IC may be an important factor during the development of atherosclerosis.

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的核心含有大量不饱和脂肪酸, 容易发生各种形式的氧化和修饰。其结构发生变化后具有了免疫原性, 使体内产生自身抗体, 后者与 LDL 发生免疫反应, 形成 LDL 免疫复合物(low density lipoprotein immune complexes, LDL-IC)^[1]。冠心病患者具有较高的 LDL-IC 水平^[2]。LDL-IC 对巨噬细胞作用的相关研究国内尚未见报道。本实验研究 LDL-IC 对人类巨噬细胞胆固醇代谢、低密度脂蛋白受体及基因表达

的影响, 为防治动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)提供一个可能的治疗方向。

1 材料与方法

1.1 材料

THP-1 细胞来自于上海细胞所, 佛波酯购自美国 Alexis 公司, RPMI1640 培养基、特级胎牛血清和 Trizol 均购自 Gibco 公司, 无脂人白蛋白购自 Sigma 公司, LDL 购自 Calbiochem 公司, 抗人 LDL 抗体购自上海明华体外诊断公司, 人 IgG 及抗人 IgG 抗体购自北京中山生物技术公司, 抗 LDL 受体(LDL receptor, LDLR)抗体购自武汉博士德公司, 胆固醇酶联

[收稿日期] 2004-08-26 [修回日期] 2005-06-13

[作者简介] 倪晓晴, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为动脉粥样硬化, 联系电话为 0513-5052307, E-mail 为 nixiao1973@hotmail.com。朱健华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为分子心脏病学基础与临床电生理。

试剂购自上海复星长征医学科学有限公司,胆固醇纯品购自上海化学试剂公司,AMV 逆转录试剂盒购自上海生工生物工程公司、Taq 酶购自美国 Promega 公司。引物由上海生工合成。

1.2 低密度脂蛋白免疫复合物的制备

100 μ L 抗 LDL 抗体与 1 000 μ L LDL 混合,4 $^{\circ}$ C 过夜能够产生最多的免疫沉淀物。同样用 100 μ L 人 IgG 和 500 μ L 兔抗人 IgG 制备对照组免疫复合物。上述免疫复合物经 2 000 转/min 离心,取沉淀重溶于 0.01 mol/L PBS 溶液,以 Lowry 法测定 LDL-IC 和 IgG-IC 的蛋白含量。

1.3 细胞培养及分组

THP-1 细胞生长于 25 cm^2 的培养瓶中,含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中,细胞呈椭圆形或类圆形悬浮样生长,每周传代 1 次,每隔 2 或 3 天换液 1 次。细胞密度达 $1.0 \times 10^9/\text{L}$ 左右、活力 > 95% 时可用于实验。调整各瓶细胞数相等,在培养基中加入 PMA 使终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$,经 PMA 诱导孵育 36 h,倒置显微镜下可观察到细胞由悬浮转为贴壁生长,伸出伪足。弃去悬浮细胞及培养基,用预温 1 \times PBS 轻洗 1 次,加入等量无血清无脂培养基进行实验分组。实验分为 LDL 组、LDL-IC 组、阴性组和 IgG-IC 组。除阴性组外,各组相应加入 LDL、LDL-IC 及 IgG-IC,终浓度均为 150 ng/L 。3 h 后收集各组细胞,测定 LDL 受体的表达,36 h 后测定胆固醇含量。

1.4 细胞内胆固醇的测定

弃培养上清,PBS 洗涤 3 次,细胞刮收集贴壁细胞至试管中。2 000 转/min 离心 10 min,再以 PBS 洗涤一次,2 000 转/min 离心 10 min。弃上清,细胞沉淀加 1 mL 双蒸水混匀。静置 15 min 后吸出 200 μ L 至另一试管中,以 Lowry 法测蛋白含量。向剩余的细胞悬液中依次加氯仿 1 mL、甲醇 2 mL 和氯仿 1 mL,最后加双蒸水 1 mL,每次均充分混匀。静置 30 min 后 2 000 转/min 离心 5 min,吸弃上清液,将下层氯仿相在沸水浴中蒸干,然后 105 $^{\circ}$ C 烘烤 20 min。每个测定管及标准管加无水乙醇 100 μ L 完全溶解脂质,空白管只加 100 μ L 无水乙醇。各管均加入胆固醇酶联试剂 3 mL,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,500 nm 比色。结果以细胞胆固醇含量除以细胞蛋白质含量来表示 (mg/g)。每组均重复 3 次。

1.5 逆转录—聚合酶链反应

Trizol 法常规提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 间,取总 RNA 4.5 μg 逆转录合成 cDNA。取 2 μ L 逆转录产物和 LDLR 基因的上

下游引物各 1 μ L(上游 5'-CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG-3',下游 5'-TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG-3',预期扩增产物长度 258 bp),预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min 后进入循环:94 $^{\circ}$ C 40 s \rightarrow 56 $^{\circ}$ C 40 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 40 s;6 次循环后加入内参 β 2 微球蛋白引物各 1 μ L(上游:5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3',下游:5'-ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG-3',预期扩增产物长度 114 bp)扩增至 29 次循环。总延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min。将扩增产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳分离,凝胶置四星图像分析仪摄像,采用 Scion image 图像分析软件,以 LDLR 带与内参 β 2MG 带密度比表示 LDLR 在转录水平的相对表达。

1.6 低密度脂蛋白受体蛋白检测

PBS 洗涤贴壁细胞,加细胞裂解液 M-PER 200 μ L,细胞刮收集后离心取上清。提取的蛋白定量后,电泳分离并转膜。在内参 β -actin(42 kDa)与目的蛋白带(115 kDa)间剪开 NC 膜,放于配好的含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,摇床上室温封闭 2 h。以 1:500 的抗 LDLR 抗体摇床室温孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入 1:5 000 HRP 标记二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次。ECL 显色,采用图像分析软件对产物条带光密度进行半定量分析。

1.7 统计学处理

每个实验组设 3 个重复管,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用单因素方差分析,方差分析后两两比较用 *Schffe* 法。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组细胞内胆固醇含量的比较

低密度脂蛋白免疫复合物组细胞胆固醇含量 ($69.76 \pm 11.6 \text{ mg}/\text{g}$) 与阴性组 ($10.17 \pm 1.08 \text{ mg}/\text{g}$)、LDL 组 ($14.77 \pm 1.76 \text{ mg}/\text{g}$) 和 IgG-IC 组 ($9.91 \pm 1.12 \text{ mg}/\text{g}$) 比较差异有显著性 ($P < 0.01$),阴性组胆固醇含量与 LDL 组和 IgG-IC 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。提示 LDL-IC 能增加细胞胆固醇的含量,而 LDL 和 IgG-IC 对细胞胆固醇的含量没有影响。

2.2 低密度脂蛋白受体 mRNA 表达的比较

低密度脂蛋白 LDLR mRNA 半定量值 (0.36 ± 0.05) 与阴性组 (0.91 ± 0.06) 比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。LDL-IC 组 LDLR mRNA (1.87 ± 0.22) 与 LDL 组和 IgG-IC 组 (0.58 ± 0.03) 及阴性组比较表达增加 ($P < 0.01$),说明 LDL-IC 增加了细胞 LDLR mRNA 的表达。IgG-IC 组 LDLR mRNA 表达与阴性组比

较差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

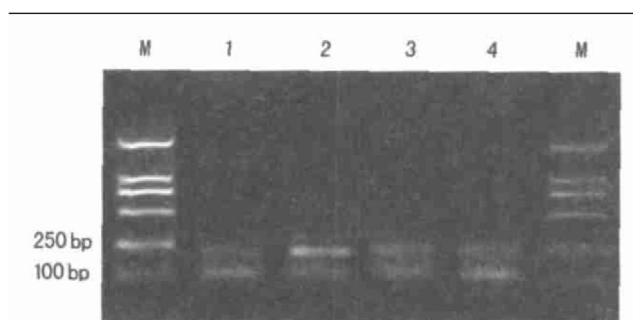


图 1. 低密度脂蛋白受体 mRNA 逆转录-聚合酶链反应扩增产物电泳结果 M 为 Marker, 1 为 LDL 组, 2 为 LDL-IC 组, 3 为对照组, 4 为 IgG-IC 组。

Figure 1. Expression of LDLR mRNA of different groups by RT-PCR

2.3 低密度脂蛋白受体蛋白表达的比较

低密度脂蛋白免疫复合物组 LDLR 蛋白表达(1.34 ± 0.12)较阴性组(0.91 ± 0.11)、LDL 组(0.50 ± 0.10)和 IgG-IC 组(0.86 ± 0.13)升高($P < 0.05$), 可认为 LDL-IC 能够增加细胞 LDLR 的表达。LDL 组 LDLR 表达较阴性组减弱($P < 0.01$), 表明在 LDL 的作用下 LDLR 表达下调。IgG-IC 组与阴性组比较没有明显改变($P > 0.05$), 说明 IgG-IC 对细胞 LDLR 表达没有影响。

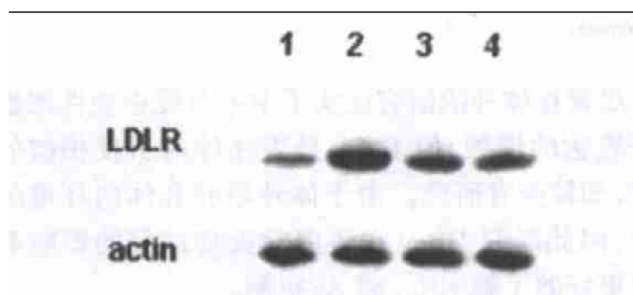


图 2. 各组低密度脂蛋白受体蛋白 Western blot 显色结果 1 为 LDL 组, 2 为 LDL-IC 组, 3 为对照组, 4 为 IgG-IC。

Figure 2. Expression of LDLR protein of different groups by western blot

3 讨论

细胞通过以下机制调节自身胆固醇的动态平衡: 抑制 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶, 减少自身的胆固醇合成; ④减少 LDL 受体的合成, 从而减少 LDL 的摄取; ④激活内质网脂酰基 CoA 胆固醇酰基转移酶, 使游离胆固醇在胞质内酯化成胆固醇酯贮存。“修饰的低密度脂蛋白假说”认为, 动脉粥样硬化中细胞摄入的脂质必定经过了某种修饰, 使

巨噬细胞不断摄入大量修饰的 LDL 而不受调控, 最终成为泡沫细胞, 导致脂质条纹的形成。自 1994 年证实了动脉粥样硬化局部存在 LDL-IC 后^[3], 国外许多学者对 LDL-IC 进行了研究并认为 LDL-IC 可以看作是 LDL 的免疫修饰形式。

在我们实验中观察到在单核细胞源性巨噬细胞中加入 LDL 后, 细胞内胆固醇呈增多趋势, 但未出现显著改变。除了存在实验误差外, 说明在 LDL 作用下细胞能够保持胆固醇的自稳态, 可能与 caveolin-1 介导的胆固醇流出增多有关^[4]。LDL 组 LDLR mRNA 的表达与 LDLR 蛋白表达均较阴性组减弱, 反映了 LDL 与细胞作用后 LDL 受体表达的下调过程。而 LDL-IC 组与阴性组、LDL 组、IgG-IC 组比较, 细胞内胆固醇含量明显增加, 可能是由于含 LDL 的免疫复合物的摄入增多及不受调控所致。LDL-IC 与细胞作用后, LDL 受体的 mRNA 与蛋白表达并未表现为一般情况下的下调反而表现为明显增高, 提示 LDL-IC 增加 LDLR 表达的效应是通过 LDLR 的转录活性增加所致, 进而经过翻译和表达增加了 LDLR 的数目, 从而增加了脂质的摄入。推测可能由于 LDL-IC 摄入后降解所释出胆固醇与正常情况下摄入的 LDL 释出的胆固醇不同, 前者不能调控 LDL 受体的表达。并且由于细胞内 LDL-IC 降解产生的胆固醇可能经过另一途径成为乙酰辅酶 A 胆固醇酰基转移酶的底物, 尤其在巨噬细胞胆固醇需要量增加时, 这类胆固醇不能被巨噬细胞所利用, 在这种情况下, 有调控作用的胆固醇逐渐枯竭, 导致 LDLR 表达的增加^[5]。

总之, LDL-IC 与巨噬细胞相互作用不仅导致了细胞内胆固醇的堆积, 而且对 LDL 受体产生了正调节。实验通过设立阴性对照组, 观察到 LDL-IC 所产生的诸多效应有别于一般的免疫复合物, 也不是单独 LDL 的成分所致, 可以认为 LDL-IC 是作为一个新的独立的成分在 As 中发挥作用。

[参考文献]

- [1] Lopes Virella MF, Virella G. Atherosclerosis and Autoimmunity. *Clinical Immunology Immunopathology*, 1994, **73** (2): 155-167
- [2] Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J American College Cardiology*, 2003, **41** (3): 360-370
- [3] Ylir-Herttuala S, Palinski W, Butler SW. Rabbit and human atherosclerosis lesions contain ige that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Atherosclerosis Thrombosis*, 1994, **14** (1): 32-40
- [4] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin 1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383
- [5] 汪俊军, 史利宁, 张春妮. 低密度脂蛋白自身免疫在动脉粥样硬化发生中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 545-548

(此文编辑 朱雯霞)