

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0453-06

· 实验研究 ·

## 氧化型低密度脂蛋白诱导 RAW264.7 细胞表达 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2

韩冠平, 敖彩卉, 薛林, 赵春玉, 齐丽彤

(北京大学第一医院心内科, 北京市 100034)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化; 分泌型磷脂酶 A2

[摘要] 目的 通过研究不同氧化程度的氧化型低密度脂蛋白对鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞表达 IV 型胞浆型磷脂酶 A2、V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的调节作用, 探讨氧化型低密度脂蛋白在促进动脉粥样硬化过程中的炎症机制。方法 利用不同的氧化方法对低密度脂蛋白进行氧化修饰, 分别制备轻度修饰低密度脂蛋白、轻度氧化低密度脂蛋白和重度氧化低密度脂蛋白, 将此三型氧化型低密度脂蛋白用于刺激 RAW264.7 细胞, 分别孵育 4 h 及 8 h 后收集细胞裂解液和细胞培养上清液, 分别用逆转录聚合酶链反应法检测胞浆型磷脂酶 A2、V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达, Western blotting 法检测胞内和细胞培养上清液中 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 蛋白的表达。结果 与 PBS 对照组及低密度脂蛋白组相比, RAW264.7 细胞经各型氧化型低密度脂蛋白刺激后胞浆型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 但 V 型分泌型磷脂酶 A2 和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平和胞内及细胞培养液中蛋白的表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与轻度修饰低密度脂蛋白组和重度氧化低密度脂蛋白组相比, 轻度氧化低密度脂蛋白组诱导 V 型分泌型磷脂酶 A2 和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 和蛋白表达作用更强 ( $P < 0.05$ ), 而轻度修饰低密度脂蛋白组的作用又要强于重度氧化低密度脂蛋白组 ( $P < 0.05$ )。结论 氧化型低密度脂蛋白可诱导 RAW264.7 细胞表达 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2, 而两型轻度氧化的氧化型低密度脂蛋白诱导 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 表达的能力明显强于重度氧化程度的低密度脂蛋白, 说明轻度氧化程度的氧化型低密度脂蛋白具有较强的诱导巨噬细胞产生炎症反应的能力。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Expression of Group V and Group X Secretory Phospholipase A2 on RAW264.7 Cell Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

HAN Guan-Ping, AO Cai-Hui, XUE Lin, ZHAO Chun-Yu, and QI Li-Tong

(Department of Cardiology, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Macrophage; Atherosclerosis; Secretory Phospholipase A2

[ABSTRACT] Aim To investigate whether the expression of group IV cytosolic phospholipase A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2), group V secretory phospholipase A2 (sPLA2-V) and group X secretory phospholipase A2 (sPLA2-X) could be regulated by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) of different oxidation levels in the mouse macrophage cell line RAW264.7 cells, and to explore the inflammatory mechanisms of the interactions between ox-LDL and macrophages in the process of promoting atherosclerosis. Methods 3 types of ox-LDL (minimally modified low density lipoprotein or MM-LDL, lightly ox-LDL or ox<sub>4</sub>-LDL, heavily ox-LDL or ox<sub>48</sub>-LDL) were prepared by different oxidation ways. 3 types of ox-LDL were used to incubate with RAW264.7 cells for 4 h and 8 h, then the cell lysate and cell culture supernatant were collected. The mRNA expression and protein expression of cPLA2, sPLA2-V and sPLA2-X were determined respectively by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting analysis.

Results The mRNA expression and protein expression of sPLA2-V and sPLA2-X were undetectable in untreated RAW264.7 cell. Compared with the PBS control group and the LDL group, the mRNA expression of cPLA2 was not affected by all types of ox-LDL ( $P > 0.05$ ). But the mRNA expression and protein expression of sPLA2-V and sPLA2-X were significantly enhanced by the stimulation of MM-LDL and ox<sub>4</sub>-LDL in RAW264.7 cell ( $P < 0.05$ ), while ox<sub>48</sub>-LDL had a slight ability to induce the expression of sPLA2-V and sPLA2-X ( $P < 0.05$ ). However, PBS control group and native LDL failed to induce the expression of sPLA2-V and sPLA2-X. Conclusion The exposure of ox-LDL to RAW264.7 cells did not affect the mRNA expression of cPLA2, but could significantly induce RAW264.7 cells to express sPLA2-V and sPLA2-X. Two types of mildly oxidized LDL (MM-LDL and ox<sub>4</sub>-LDL)-induced expression of sPLA2-V and sPLA2-X was stronger than that of heavily oxidized LDL (ox<sub>48</sub>-LDL), indicating that mildly oxidized LDL was capable of inducing a strong inflammatory response on macrophages.

[收稿日期] 2009-04-01

[修回日期] 2009-06-06

[作者简介] 韩冠平, 硕士研究生, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 hanguanping@yahoo.cn。通讯作者齐丽彤, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 从事血脂代谢与冠心病研究, E-mail 为 qilitong2003@yahoo.com.cn。

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)和巨噬细胞的相互作用在动脉粥样硬化斑块形成和发展过程中起着极为关键的作用, ox-LDL通过促进巨噬细胞泡沫化、诱导巨噬细胞凋亡以及诱导巨噬细胞释放炎症因子和基质金属蛋白酶(MMP)等方式加速动脉粥样硬化病变的进程<sup>[1-3]</sup>。磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)是一类能水解低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)内的磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)从而释放出游离脂肪酸(FFA)、溶血磷脂(Lyso-PC)等促动脉粥样硬化炎症介质的酶类超家族,分为分泌型、胞浆型和钙离子非依赖型三大类<sup>[4]</sup>。近年研究发现IV型胞浆型磷脂酶 A2(cytosolic phospholipase A2, cPLA2)、V型分泌型磷脂酶 A2(V secretory phospholipase A2, sPLA2-V)和X型分泌型磷脂酶 A2(sPLA2-X)在巨噬细胞向泡沫细胞的转化过程中起关键作用。活化的 cPLA2可能通过加快其水解 ox-LDL 颗粒中氧化脂质的方式,提供胆固醇酯化过程所需的脂肪酸,促进胆固醇酯在巨噬细胞内的聚集<sup>[5]</sup>。有研究发现经 sPLA2-V 和 sPLA2-X 水解修饰过的 LDL 会更强烈的被巨噬细胞摄取,进而促进脂质在巨噬细胞中的蓄积以及泡沫细胞的形成<sup>[6,7]</sup>。但 ox-LDL 对巨噬细胞表达 cPLA2、sPLA2-V 和 sPLA2-X 的调节作用尚不清楚,本研究对鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞经不同氧化程度的 ox-LDL 诱导后, cPLA2、sPLA2-V 和 sPLA2-X 的表达情况进行了观察,以进一步探讨 ox-LDL 诱导泡沫细胞以及动脉粥样硬化斑块形成的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人血浆 LDL(美国 Calbiochem 公司), 硫代巴比妥酸反应物法(thiobarbituric acid-reactive substance, TBARS)测定试剂盒(南京建成科技有限公司), RAW264.7 细胞系(中国协和医科大学细胞中心), 小鼠抗小鼠  $\beta$ -actin 一抗和小鼠抗小鼠 sPLA2-V 单克隆抗体(美国 Santa-Cruz 公司), 兔抗小鼠 sPLA2-X 多克隆抗体(美国 Cayman 公司), HRP 标记山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司), RNAtrip 总 RNA 提取试剂、改良 Lowry 法蛋白定量试剂盒以及 SuperECL Plus 超敏发光液(北京普利莱基因技术公司), 100 bp DNA Ladder Marker、Taq DNA 聚合酶、Oligo d(T)<sub>15</sub> 和

dNTP[宝生物工程(大连)有限公司](Takara 公司), M-MLV 逆转录酶(Promega 公司), 预染蛋白分子量 Marker(Fermentas 公司), RIPA 细胞裂解液[北京索莱宝(solarbio)科技有限公司], 浓缩用超滤离心管(Millipore 公司)。

### 1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰和鉴定

将购买的 LDL 用无菌的 PBS 于 4℃ 透析 24 h(每 6 h 换液 1 次), 充分去除 EDTA 后, 分别按以下方法制备各型 ox-LDL。①轻微修饰低密度脂蛋白(MM-LDL)的制备:按文献[8]的方法将 LDL 置于含 9  $\mu\text{mol/L}$  FeSO<sub>4</sub> 无菌 PBS 中, 4℃ 透析 72 h; ②轻度氧化低密度脂蛋白(ox<sub>4h</sub>-LDL)的制备:LDL 与 Cu<sup>2+</sup> 的比例为 1 g/L 的 LDL 对 5  $\mu\text{mol/L}$  CuSO<sub>4</sub>, 在 37℃ 下氧化 4 h; ③重度氧化低密度脂蛋白(ox<sub>48h</sub>-LDL)的制备:LDL 与 Cu<sup>2+</sup> 的比例为 1 g/L 的 LDL 对 5  $\mu\text{mol/L}$  CuSO<sub>4</sub>, 在 37℃ 下氧化 48 h。将以上制备的三型 ox-LDL 用不含 FeSO<sub>4</sub> 和 CuSO<sub>4</sub> 的无菌 PBS 液于 4℃ 继续透析 24 h(每 6 h 换液 1 次), 使用 Millipore 超滤离心管在 4℃ 下适当浓缩体积后, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 取少量 Lowry 法测定蛋白含量后, 用 PBS 调整蛋白浓度为 1 g/L, 分装 4℃ 避光保存, 于 1 周内使用。按 TBARS 测定试剂盒说明书进行操作, 同时用 1% 琼脂糖凝胶电泳通过测定 ox-LDL 与 LDL 的相对电泳迁移率(relative electrophoretic mobility, REM)来鉴定 LDL 的氧化程度。

### 1.3 RAW264.7 细胞的培养和实验分组

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 用含 10% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基培养, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中生长, 1:3 传代, 将对数生长期的细胞(10 代或 11 代)用于实验, 待施加刺激前改用不含血清的 DMEM 培养基继续培养。

将 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板,  $5 \times 10^5$  个/孔, 待达到 90% 以上汇合度时, 先用无血清的培养液将细胞洗两遍, 然后分组进行干预: (1)不同氧化程度的 ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞 4 h 或 8 h(分别用于检测 mRNA 和蛋白表达): ①PBS 空白对照组; ②LDL 组(80 mg/L); ③MM-LDL 组(80 mg/L); ④ox<sub>4h</sub>-LDL 组(80 mg/L); ⑤ox<sub>48h</sub>-LDL(80 mg/L)。 (2)不同浓度的轻度氧化 LDL(ox<sub>4h</sub>-LDL)刺激 RAW264.7 细胞 4 h(检测 mRNA 表达): ①PBS 空白对照组; ②LDL 组(80 mg/L); ③ox<sub>4h</sub>-LDL(40 mg/L)组; ④ox<sub>4h</sub>-LDL 组(80 mg/L); ⑤ox<sub>4h</sub>-LDL(120 mg/L)组。 (3)80 mg/L 的轻度氧化 LDL(ox<sub>4h</sub>-LDL)分别刺激 RAW264.7 细胞 1、2、3、4 和 5 h(检测 mRNA 表达)。

#### 1.4 逆转录聚合酶链反应测定IV型胞浆型磷脂酶A2、V型和X型分泌型磷脂酶A2 mRNA的表达

收集各组处理后的细胞,用PBS液冲洗2次后,使用RNA trip试剂一步法提取细胞总RNA。取总RNA样本2  $\mu\text{g}$ ,使用200 U的M-MLV逆转录酶和125 pmol的Oligo d(T)<sub>15</sub>引物以25  $\mu\text{L}$ 体系逆转录合成cDNA第一链。取总RNA样本2  $\mu\text{g}$ ,50 mmol/L的Oligo d(T)<sub>15</sub> 2.5  $\mu\text{L}$ ,用H<sub>2</sub>O补齐至14  $\mu\text{L}$ ,70℃ 5 min,迅速冰浴2 min以上;25  $\mu\text{L}$ 体系逆转录体系[RNA样本/Oligo d(T)<sub>15</sub>混合液14  $\mu\text{L}$ 、M-MLV 5  $\times$  Reaction Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(10 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ 和M-MLV逆转录酶1  $\mu\text{L}$ (200 U)]在42℃下反应1 h。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。cPLA2上游引物为5'-GCA GGA AGC GAA CGA GAC-3',下游引物为5'-CCA TGC TGA ACC GTA GGT-3',产物长度为279 bp;sPLA2-V上游引物为5'-GGC TTC TAC GGC TGC TAC TG-3',下游引物为5'-CAG GCA GTA GAC CAG CTT CC-3',产物长度为231 bp;sPLA2-X上游引物为5'-GCT GTT ATT GTG GCC TTG GT-3',下游引物为5'-GTA AGC CAG CTC CTC GTC AC-3',产物长度为218 bp;GAPDH上游引物为5'-TGT TCC TAC CCC CAA TGT GT-3',下游引物为5'-CCC TGT TGC TGT AGC CGT AT-3',产物长度为269 bp。PCR反应体系为25  $\mu\text{L}$ [10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、20 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(10 mmol/L) 1.25  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(5 mmol/L)各1  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2.5  $\mu\text{L}$ 以及Taq DNA聚合酶(5  $\times 10^6$  U/L) 0.25  $\mu\text{L}$ ,用H<sub>2</sub>O补齐至25  $\mu\text{L}$ ]。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s→57.8℃退火30 s→72℃延伸60 s,共37个循环,72℃再延伸10 min。所有PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳,PCR产物测序鉴定,凝胶成像系统扫描灰度值并进行分析,并计算目的基因与GAPDH二者吸光度的比值。重复3次独立实验。

#### 1.5 Western blotting 检测细胞内及细胞培养液中V型和X型分泌型磷脂酶A2蛋白的表达

使用RIPA细胞裂解液(临用时向其中加入蛋白酶抑制剂使其浓度为20  $\mu\text{mol/L}$  leupeptin/aprotinin/pepstatin和1 mmol/L PMSF)提取细胞的总蛋白,细胞培养上清液也加入蛋白酶抑制剂后用Millipore超滤离心管4℃,5 000  $\times g$ ,2 h离心来浓缩蛋白。

Bradford法蛋白定量后,取100  $\mu\text{g}$ 蛋白与5  $\times$ 上样缓冲液混匀煮沸10 min;浓缩后的细胞培养上清液也与5  $\times$ 上样缓冲液混匀煮沸10 min,将各组

蛋白样品变性后用1  $\times$ 上样缓冲液调成等体积等浓度后立即上样进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,在6%浓缩胶中电压为80V,待进入15%分离胶后调电压为120V;湿转80 mA,120 min转移至PVDF膜上;对于 $\beta$ -actin以及sPLA2-V,室温以5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗( $\beta$ -actin:1:2000;sPLA2-V:1:100)4℃封闭过夜;对于sPLA2-X则以5%脱脂奶粉4℃封闭过夜,次日一抗1:200室温孵育2.5 h, TBST洗膜后,二抗( $\beta$ -actin:1:2000;sPLA2-V:1:1000;sPLA2-X:1:1000)室温孵育1 h, TBST洗涤,HRP-ECL显色,暗盒压片曝光。凝胶成像系统扫描X线片结果并计算灰度值。重复3次独立实验。

#### 1.6 统计学分析

用Bio-Rad图像分析软件Quantity One 4.6.2对RT-PCR产物电泳条带、Western blotting的结果进行吸光度扫描。重复实验的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异性比较采用单因素ANOVA检验,由SPSS13.0统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

#### 2.1 琼脂糖凝胶电泳鉴定低密度脂蛋白氧化程度

LDL经氧化修饰后,因ox-LDL所带负电荷数量增加,各型ox-LDL在1%琼脂糖凝胶上的相对REM明显加快,且随着氧化程度的增高呈递增趋势(图1)。经亚铁离子在低温下氧化72 h产生的MM-LDL的REM达到1.1,而经Cu<sup>2+</sup>在37℃下氧化4 h产生的ox<sub>4h</sub>-LDL的REM达到1.5,经Cu<sup>2+</sup>在37℃下氧化48 h产生的ox<sub>48h</sub>-LDL的REM达到2.6。

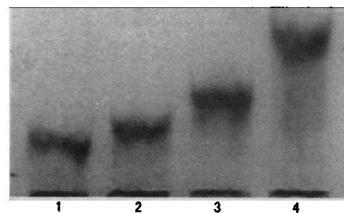


图1 琼脂糖凝胶电泳鉴定预染低密度脂蛋白氧化程度  
1为LDL,2为MM-LDL,3为ox<sub>4h</sub>-LDL,4为ox<sub>48h</sub>-LDL。

#### 2.2 硫代巴比妥酸反应法鉴定低密度脂蛋白氧化程度

氧化后的ox-LDL与未经氧化的LDL相比较,TBARS值明显升高,且随着氧化程度的升高而增高(LDL及MM-LDL、ox<sub>4h</sub>-LDL和ox<sub>48h</sub>-LDL的TBARS

值分别为 $1.2 \pm 0.3$ 、 $4.1 \pm 0.7$ 、 $17.5 \pm 5.2$ 和 $62.5 \pm 9.3$  pmol/g)。

2.3 氧化型低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞 4 h 或 8 h 对 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响

与 LDL 组和 PBS 空白对照组相比,各型氧化型低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞 4 h 后,cPLA2 mRNA 表达差异无显著性( $P > 0.05$ ),但 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达明显增加( $P < 0.05$ ),其中  $ox_{4h}$ -LDL 和 MM-LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X mRNA 表达作用明显强于  $ox_{48h}$ -LDL ( $P < 0.01$ ), $ox_{4h}$ -LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X mRNA 表达作用最强( $P < 0.05$ ;图 2 和表 1)。

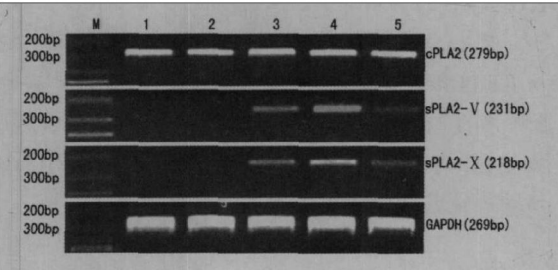


图 2. 各型氧化型低密度脂蛋白(80 mg/L)刺激 RAW264.7 细胞 4 h 对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 mRNA 表达水平的影响 1 为 PBS 空白对照组,2 为 LDL 组,3 为 MM-LDL 组,4 为  $ox_{4h}$ -LDL 组,5 为  $ox_{48h}$ -LDL。

与 PBS 空白对照组和 LDL 组相比,各型氧化型低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞 8 h 后,sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 胞内蛋白以及培养液上清中蛋白的表达水平均增加( $P < 0.05$ ),其中  $ox_{4h}$ -LDL 和 MM-LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 蛋白表达的作用明显强于  $ox_{48h}$ -LDL ( $P < 0.01$ ), $ox_{4h}$ -LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 蛋白表达的作用最强( $P < 0.05$ ;图 3 和表 1)。

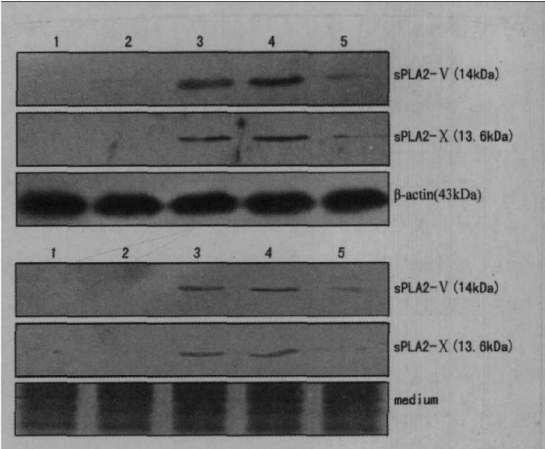


图 3. 各型氧化型低密度脂蛋白(80 mg/L)刺激 RAW264.7 细胞 8 h 对 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 在胞内(上图)和培养液上清(下图)中表达的影响 1 为 PBS 空白对照组,2 为 LDL 组,3 为 MM-LDL 组,4 为  $ox_{4h}$ -LDL 组,5 为  $ox_{48h}$ -LDL。

表 1. 各型氧化型低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞 4 h 或 8 h 后对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分 组	cPLA2 mRNA	sPLA2 - V mRNA	sPLA2 - X mRNA	sPLA2 - V 胞内蛋白	sPLA2 - X 胞内蛋白	sPLA2 - V 上清蛋白	sPLA2 - X 上清蛋白
PBS 空白对照组	$0.556 \pm 0.054$	0	0	0	0	0	0
LDL 组	$0.537 \pm 0.043$	0	0	0	0	0	0
MM-LDL 组	$0.541 \pm 0.061$	$0.212 \pm 0.021^{ab}$	$0.232 \pm 0.019^{ab}$	$0.126 \pm 0.013^{ab}$	$0.144 \pm 0.017^{ab}$	$0.094 \pm 0.013^{ab}$	$0.121 \pm 0.010^{ab}$
$ox_{4h}$ -LDL 组	$0.547 \pm 0.032$	$0.482 \pm 0.025^{abc}$	$0.425 \pm 0.034^{abc}$	$0.222 \pm 0.011^{abc}$	$0.176 \pm 0.026^{abc}$	$0.154 \pm 0.018^{abc}$	$0.143 \pm 0.013^{abc}$
$ox_{48h}$ -LDL 组	$0.552 \pm 0.028$	$0.085 \pm 0.013^a$	$0.121 \pm 0.008^a$	$0.026 \pm 0.005^a$	$0.031 \pm 0.006^a$	$0.021 \pm 0.007^a$	$0.012 \pm 0.003^a$

a 为  $P < 0.05$ ,与 PBS 空白对照组和 LDL 组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与  $ox_{48h}$ -LDL 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 MM-LDL 组比较。

2.4 不同浓度的轻度氧化低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响

与 PBS 空白对照组和 LDL 组相比,40、80 和 120 mg/L 的  $ox_{4h}$ -LDL 均可明显诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),且呈一定的浓度依赖性。80 mg/L 和 120 mg/L 的  $ox_{4h}$ -LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达作用要强于 40 mg/L 的  $ox_{4h}$ -LDL( $P < 0.05$ ),但 80 mg/L 和

120 mg/L 的  $ox_{4h}$ -LDL 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达作用差异并无显著性( $P > 0.05$ );各浓度组的 cPLA2 mRNA 表达差异并无显著性( $P > 0.05$ ;图 4 和表 2)。

2.5 轻度氧化低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞不同时间对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响

$ox_{4h}$ -LDL(80 mg/L)分别刺激 RAW264.7 细胞 1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h 后,各组的 cPLA2 mRNA 表

达差异并无显著性( $P>0.05$ ),而 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达水平随时间延长呈逐渐增加的趋势,4 h 时 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的 mRNA 表达水平达到高峰,4 h 与 5 h 的 mRNA 表达水平差异并无显著性( $P>0.05$ ;图 5 和表 3)。

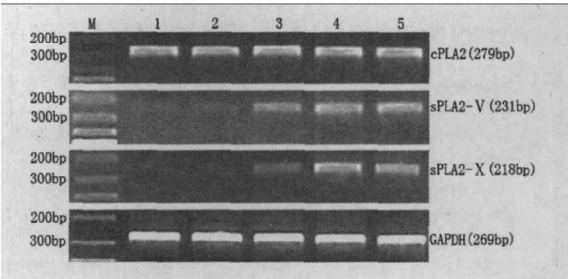


图 4. 不同浓度轻度氧化低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响 1 为 PBS 空白对照组,2 为 LDL 组(80 mg/L),3 为 40 mg/L  $ox_{4h}$ -LDL 组,4 为 80 mg/L  $ox_{4h}$ -LDL 组,5 为 120 mg/L  $ox_{4h}$ -LDL 组。

表 2. 不同浓度的轻度氧化低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响

分 组	cPLA2 mRNA	sPLA2 - V mRNA	sPLA2 - X mRNA
PBS 空白对照组	0.559 ± 0.055	0	0
80 mg/L LDL 组	0.540 ± 0.042	0	0
40 mg/L $ox_{4h}$ -LDL 组	0.558 ± 0.026	0.239 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.147 ± 0.012 <sup>a</sup>
80 mg/L $ox_{4h}$ -LDL 组	0.550 ± 0.034	0.486 ± 0.027 <sup>ab</sup>	0.423 ± 0.036 <sup>ab</sup>
120 mg/L $ox_{4h}$ -LDL 组	0.543 ± 0.041	0.492 ± 0.031 <sup>ab</sup>	0.431 ± 0.017 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与 PBS 空白对照组和 LDL 组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 40 mg/L  $ox_{4h}$ -LDL 组比较。

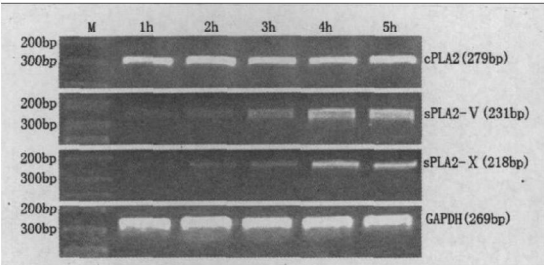


图 5. 轻度氧化低密度脂蛋白(80 mg/L)刺激 RAW264.7 细胞不同时间对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响

3 讨论

巨噬细胞向泡沫细胞的转化是动脉粥样硬化斑块形成和发展的关键事件。以往研究发现巨噬细胞

表 3. 80 mg/L 轻度氧化低密度脂蛋白刺激 RAW264.7 细胞不同时间对 IV 型胞浆型磷脂酶 A2 以及 V 型和 X 型分泌型磷脂酶 A2 的 mRNA 表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间(h)	cPLA2 mRNA	sPLA2 - V mRNA	sPLA2 - X mRNA
1	0.549 ± 0.032	0.033 ± 0.007	0.021 ± 0.009
2	0.535 ± 0.037	0.085 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.099 ± 0.017 <sup>a</sup>
3	0.551 ± 0.044	0.179 ± 0.019 <sup>ab</sup>	0.174 ± 0.016 <sup>ab</sup>
4	0.544 ± 0.035	0.479 ± 0.028 <sup>abc</sup>	0.425 ± 0.033 <sup>abc</sup>
5	0.538 ± 0.056	0.498 ± 0.019 <sup>abc</sup>	0.418 ± 0.032 <sup>abc</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与 1 h 组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 2 h 组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 3 h 组比较。

可通过其表面的清道夫受体(如 SR-A 和 CD36 等)识别并摄取 ox-LDL,进而加速胆固醇酯等脂质在胞内的积聚,从而向泡沫细胞转化<sup>[1,9]</sup>。但能够被清道夫受体识别的大多是重度氧化的 ox-LDL,对于轻度氧化的 LDL 以及 MM-LDL 来说,尽管载脂蛋白 B (apolipoprotein B, ApoB) 发生了一些较为明显的修饰,并不足以被巨噬细胞清道夫受体识别<sup>[10]</sup>。从动脉粥样硬化患者病变处提取的 ox-LDL 大多数都是轻度氧化的 LDL<sup>[11]</sup>,且极少能够被清道夫受体识别<sup>[12]</sup>。以上研究结果提示动脉粥样硬化病变处的 LDL 存在其他非清道夫受体途径被巨噬细胞识别和摄取的方式。本研究中利用不同的氧化方法对 LDL 进行氧化修饰,分别制备 3 型不同氧化程度的 ox-LDL 用于刺激鼠巨噬细胞,发现轻微修饰的 LDL (MM-LDL) 和轻度氧化的 LDL ( $ox_{4h}$ -LDL) 诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 表达的能力要明显强于重度氧化的 LDL ( $ox_{48h}$ -LDL),说明轻度氧化修饰的 LDL 已经具备较强的诱导巨噬细胞产生炎症反应的作用,而且这种作用可能并不依赖于清道夫受体识别途径。

于路等<sup>[13]</sup>研究发现冠心病患者分泌型磷脂酶 A2 水平明显升高,并在一定程度上可反映出冠心病的炎症状态,提示分泌型磷脂酶 A2 可能在动脉粥样硬化病变过程中起着重要的作用。研究表明经 sPLA2-V 和 sPLA2-X 水解修饰过的 LDL 与天然 LDL (native LDL) 相比,颗粒的体积发生了明显的缩小,并且容易发生自发性的 LDL 颗粒融合,产生 LDL 聚合物 (aggregated LDL),从而明显增强巨噬细胞对其的摄取以及泡沫细胞的形成<sup>[7, 14]</sup>。本研究结果表明巨噬细胞经 ox-LDL 刺激后可诱导 sPLA2-V 和 sPLA2-X 的表达,可能是动脉粥样硬化病变局部 sPLA2-V 和 sPLA2-X 的来源,产生的 sPLA2-V 和 sPLA2-X 可进一步水解修饰 LDL,一方面可产生游



离脂脂肪酸(FFA)、溶血磷脂(Lyso-PC)等促动脉硬化炎性介质,另外一方面经过修饰的 sPLA2-LDL 可更强烈的被巨噬细胞摄取,血管壁局部 ox-LDL—巨噬细胞—sPLA2 间的相互作用可能是动脉粥样硬化斑块形成及持续进展的机制之一。

同时本研究发现天然 LDL 并不能诱导鼠巨噬细胞 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的表达,而重度氧化的 LDL(ox<sub>48h</sub>-LDL)诱导 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 表达的能力较为微弱,由于天然 LDL 和重度氧化的 LDL 分别是通过 LDL 受体和清道夫受体被巨噬细胞识别和摄取,因此可以据此推测 ox-LDL 诱导巨噬细胞产生炎症反应和表达 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的途径可能并非是通过传统的 LDL 受体以及清道夫受体识别途径。值得注意的是巨噬细胞 Toll 样受体 4/核因子  $\kappa$ B (TLR4/NF- $\kappa$ B) 信号转导途径,有研究提示轻度氧化修饰的 LDL 与巨噬细胞 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导途径的激活关系密切<sup>[15]</sup>,同时受体外途径如细胞表面的蛋白多糖介导的 LDL 摄取途径也不能排除<sup>[6]</sup>。我们将深入研究 ox-LDL 诱导巨噬细胞表达 sPLA2 - V 和 sPLA2 - X 的具体分子机制,从而进一步阐明动脉粥样硬化斑块的形成和发展的炎症机制,为动脉粥样硬化的防治提出新的线索和思路。

#### [参考文献]

- [1] 朱颖,罗心平,朱军,等. U937 源性泡沫细胞形成中组织因子途径抑制物 2 的表达定位及变化规律[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (11): 834-838.
- [2] Boullier A, Li Y, Quehenberger O, et al. Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (5): 1 169-176.
- [3] Levula M, Jaakkola O, Luomala M, et al. Effects of oxidized low- and high-density lipoproteins on gene expression of human macrophages [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2006, 66 (6): 497-508.
- [4] Murakami Makoto, Kudo Ichiro. New phospholipase A2 isozymes with a potential role in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14 (5): 431-436.
- [5] Satoshi Akiba, Yukimasa Yoneda, Satoshi Ohno, et al. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification [J]. *J Lipid Res*, 2003, 44 (9): 1 676-685.
- [6] Boyanovsky Boris B, van der Westhuyzen Deney R, Webb Nancy R. Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (38): 32 746-752.
- [7] Kohji Hanasaki, Katsutoshi Yamada, Shigenori Yamamoto, et al. Potent modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (32): 29 116-124.
- [8] Liao F, Berliner JA, Mehrabian M, et al. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice [J]. *J Clin Invest*, 1991, 87 (6): 2 253-257.
- [9] 曾颖,谭玉林,易光辉,等. 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (10): 729-732.
- [10] Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2000, 11 (5): 473-481.
- [11] Niu X, Zammit V, Upston JM, et al. Coexistence of oxidized lipids and  $\alpha$ -tocopherol in all lipoprotein density fractions isolated from advanced human atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (7): 1 708-718.
- [12] Steinbrecher UP, Loughheed M. Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1992, 12 (5): 608-625.
- [13] 于路,姜文兵,傅国胜,等. 冠心病患者分泌型磷脂酶 A2 的变化及其与高敏 C 反应蛋白的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 16 (10): 884-886.
- [14] Ruth Wootton-Kee C, Boyanovsky Boris B, Nasser Munira S, et al. Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (4): 762-767.
- [15] Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, et al. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (6): 1 213-219.

(此文编辑 许雪梅)