

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0630-03

新生儿大鼠接种极低密度脂蛋白对部分免疫学及生物化学指标的影响

尹翠萍, 侯桂华, 冯月秋, 孔峰, 梁婷, 王束玫

(山东大学公共卫生学院流行病学与统计学教研室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 动脉粥样硬化; 极低密度脂蛋白; 免疫耐受; 血脂

[摘要] 目的 探讨新生儿大鼠接种极低密度脂蛋白是否能产生免疫耐受, 以及接种后对血脂和内皮素水平的影响。方法 选取体重在 150~180 g 雄性 Wistar 大鼠 40 只, 制作高脂模型后取血, 梯度密度离心提取极低密度脂蛋白并测定其蛋白含量。将出生 4 h 内的 Wistar 雄性乳鼠按窝别随机分为两组, 极低密度脂蛋白组腹腔注射极低密度脂蛋白 0.3 mg, 对照组注射等体积生理盐水, 普通饲料喂养 3 周。从两组大鼠中各随机抽取 10 只腹腔注射极低密度脂蛋白, 喂养 15 天后取血测血清抗极低密度脂蛋白水平; 剩余大鼠高脂饲料喂养 60 天, 取血测血脂、内皮素及 T 细胞增殖水平。结果 与对照组相比, 极低密度脂蛋白组抗体水平降低 ($P < 0.05$), T 细胞增殖水平有所下降 ($P < 0.05$), 而血脂及内皮素水平变化不明显。结论 新生儿大鼠接种极低密度脂蛋白可以诱导免疫耐受。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

Effects of Vaccination with Very Low Density Lipoprotein on Some Immunological and Biochemical Indicators in Neonatal Rats

YIN Cuiping HOU Guihua FENG Yueqiu KONG Feng LIANG Ting and WANG Shumei

(Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Very Low Density Lipoprotein; Immune Tolerance; Blood Lipids

[ABSTRACT] **Aim** To study whether very low density lipoprotein (VLDL) vaccination in neonatal rats could induce immune tolerance against VLDL and explore the neonatal vaccination's effects on blood lipids and endothelin.

Methods 40 Wistar male rats (weight 150~180 g) were selected, hyperlipidemic rats were built. VLDL were distilled by density-gradient centrifuge and the protein content was measured. The neonatal Wistar male rats were selected within 4 hours and divided into two groups randomly, while VLDL group was intraperitoneally injected 0.3 mg VLDL and control group saline. After 3 weeks, part of rats with VLDL were challenged, the serum anti-VLDL was measured. Then the rest of rats were given high fat diet for 60 days, the capacity of T cell proliferation, the level of serum lipids and the level of serum endothelin were measured respectively.

Results Compared with control group, serum anti-VLDL and the capacity of T cell proliferation in VLDL group were significantly reduced ($P < 0.05$). There were no significant difference on serum lipids and endothelin between the two groups.

Conclusion Neonatal VLDL vaccination could induce specific immune tolerance.

动脉粥样硬化 (As) 是一种自身免疫性疾病, 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 是其重要的自身抗原^[1,2]。大量研究显示动物免疫接种 ox-LDL 会减少 As 的发生^[3,4]。研究表明极低密度脂蛋白 (VLDL) 也可以诱导巨噬细胞转化为泡沫细胞^[5], 其代谢颗粒与分布于巨噬细胞表面的受体结合, 产生内皮毒性^[6]。VLDL 与低密度脂蛋白 (LDL) 含有相同的载脂蛋白, 巨噬细胞可摄取氧化后的载脂蛋

白, 变成泡沫细胞^[7]。1993 年李绍忱等^[8,9]给出生 12 h 内的乳兔接种 VLDL, 获得了预防约 85% 的 As 斑块的效果。VLDL 是机体转运内源性甘油三酯的主要脂蛋白, 是机体自身的成分, 为什么接种自身成分会预防 As 的发生? 接种 VLDL 对 As 的预防主要是影响了免疫还是血脂? 本研究观察了新生儿大鼠接种 VLDL 对免疫学、内皮素及血脂的影响, 以对前期研究做进一步探讨。

[收稿日期] 2010-06-07 [修回日期] 2010-07-28

[作者简介] 尹翠萍, 硕士研究生, 研究方向为慢性非传染性疾病流行病学。Email 为 cuiyingx317@163.com。侯桂华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为移植免疫耐受的分子机制及调节, Email 为 ghhou@sdu.edu.cn。通讯作者王束玫, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心脑血管病、动脉粥样硬化的病因及防治, Email 为 wshm@sdu.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 VLDL 的制备及其蛋白含量测定

自山东大学实验动物中心购体重在 150~180 g 的雄性 Wistar 大鼠 40 只, 高脂饲料喂养 (含 1% 胆

固醇、0.2% 3号胆盐、5% 猪油、93.8% 普通大鼠饲料) 30天。取全血于无菌离心管中分离血清。将血清置于无菌密封试管中, 梯度密度离心分离提取 VLDL, 用 0.45 μm 针头滤器滤菌后加入庆大霉素并分装于多个无菌密封试管中, -40°C 保存, 双缩脲法测定其蛋白含量为 3.80 g/L。

1.2 建立免疫耐受动物模型

将出生 4 h 内的雄性 Wistar 乳鼠按窝随机分为两组: VLDL 组 41 只, 每只腹腔注射 VLDL 0.3 mg; 对照组 41 只, 每只腹腔注射等容量生理盐水 0.13 mL。48 h 后, 每组乳鼠均有不同程度的死亡, VLDL 组存活 38 只, 对照组存活 34 只。

1.3 抗体水平检测

上述大鼠普通饲料喂养 3 周至断奶, 从两组大鼠各随机抽取 10 只, 均腹腔注射 0.3 mg VLDL, 然后普通饲料喂养 15 天, 取血后处死, 采用酶联免疫吸附法检测大鼠的血清抗 VLDL 水平。

1.4 T 淋巴细胞增殖水平测定

剩余大鼠 (VLDL 组 28 只, 对照组 24 只) 普通饲料喂养至体重 150 g 后改高脂饲料 (饲料配方同前) 喂养。60 天后, 取大鼠外周血约 2 mL 置于无菌试管中, 加肝素抗凝, 并用 RPMI 1640 (胎牛血清) 2 mL 倍比稀释, 调细胞浓度至 $5 \times 10^6 / \text{L}$, 然后每组各随机抽取 15 只大鼠用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法测定 T 细胞增殖水平。各样品加样 9 孔, 其中 3 孔加 100 μL VLDL 溶液 (以 RPMI 1640-10% FBS 溶液为稀释液, 配制终浓度为 60 mL/L); 3 孔加 100 μL 刀豆蛋白 A 溶液 (以 RPMI 1640-10% FBS 溶液为稀释液, 配制终浓度为 2 mg/L); 另 3 孔加 100 μL RPMI 1640-10% FBS 溶液作为空白对照。每孔加 100 μL $^3\text{H-TdR}$, 置 CO_2 孵箱 37°C 孵育 16 h。测量其放射性活度每分钟计数 (CPM), 每孔测定 3 次, 取其平均值为该动物 T 淋巴细胞在该孵育条件下的增殖水平。

1.5 血脂和内皮素水平测定

VLDL 组存活大鼠 23 只, 空白组存活大鼠 15 只。采用放射免疫分析技术测定血清内皮素水平, 酶法测定血清总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 和甘油三酯 (TG) 水平。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析, 先进行正态性检验、方差齐性检验、符合方差齐性和正态性的进行两样本的 t 检验, 不符合方差齐性或正态性的进行两样本的 t' 检验, 不符合正态性或方差齐性的多样本进行 Kruskal-Wallis 秩和检验。

2 结果

2.1 体液免疫效应

VLDL 组血清抗 VLDL 水平明显低于对照组 ($P < 0.05$ 表 1)。

表 1 血清抗 VLDL 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分 组	抗 VLDL
VLDL 组	0.339 \pm 0.141 ^a
对照组	0.507 \pm 0.021

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 细胞免疫效应

VLDL 孵育下两组 T 细胞增殖水平差异不显著 ($P > 0.05$), 而 VLDL 组 T 淋巴细胞 VLDL 孵育空白孵育值明显低于对照组 ($P < 0.05$ 表 2)。

表 2 各组 T 淋巴细胞在两种孵育条件下的 CPM 值 ($\bar{x} \pm s$)

孵育条件	VLDL 组	对照组
VLDL 孵育	2211 \pm 985	1729 \pm 598
ConA 孵育	47538 \pm 8881 ^a	27893 \pm 10742
空白孵育	2193 \pm 556 ^a	1485 \pm 645
VLDL 空白孵育	1.04 \pm 0.29 ^a	1.26 \pm 0.20
ConA 空白孵育	24.3 \pm 10.72	19.54 \pm 10.28

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.3 血脂和内皮素水平

两组 HDL 水平差异有显著性 ($P < 0.05$), 其他血脂指标及内皮素水平差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 5)。

表 3 两组血脂和内皮素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项 目	VLDL 组 ($n=23$)	对照组 ($n=15$)
TG (mmol/L)	0.90 \pm 0.35	1.10 \pm 0.44
TC (mmol/L)	3.35 \pm 0.59	3.94 \pm 1.22
LDL (mmol/L)	2.43 \pm 0.56	2.89 \pm 1.27
HDL (mmol/L)	0.92 \pm 0.15 ^a	1.07 \pm 0.26
内皮素 (ng/L)	132.9 \pm 38.2	160.0 \pm 57.5

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

3 讨论

在过去的 20 年来, 动脉粥样硬化的免疫与炎症机制得到广泛关注^[10]。人们发现脂蛋白的氧化与 As 的发生密切相关, Nicoletti 等^[3]首次给大鼠新生儿接种了 ox-LDL, 结果大鼠在体液和细胞免疫方面

都产生了特异性的免疫耐受。临床研究显示, 抗脂蛋白抗体与 A s 的进展相关, 并被认为是 A s 的危险因素^[11]。而免疫耐受是由于抗原诱导的专一淋巴细胞功能缺失, 导致机体对该抗原反应功能丧失或无应答。本研究中, 实验措施抑制了大鼠对 VLDL 的特异性体液免疫, 产生了免疫耐受。这与接种 ox-LDL 的结果相似。

细胞免疫参与了 A s 形成, 在正常的动脉内膜不见或罕见 T 细胞, 而在 A s 各个阶段 T 细胞均发挥作用^[12]。Zhou 等^[13]从接受 ox-LDL 免疫的小鼠体内转移 CD4T 细胞到另一个体, 此种转移可加快另一个体 A s 进程, 说明 T 细胞免疫对 A s 的发生起到了促进作用。本研究中, VLDL 组在 VLDL 和空白孵育条件下 T 细胞增殖水平相近。对照组在 VLDL 孵育下 T 细胞增殖水平较空白孵育下升高, 虽未达到统计学显著水平但升高趋势显而易见。两组 T 细胞增殖水平比较, 虽然 VLDL 孵育下两组无明显差异, 但 VLDL 组 VLDL 空白孵育值明显低于对照组, 说明实验措施在一定程度上使大鼠对 VLDL 产生了特异性免疫耐受。这与接种 ox-LDL 的结果相似。另外, VLDL 组 T 淋巴细胞增殖水平普遍较高, 至今尚未发现类似文献报道, 其原因有待于进一步研究。

本研究中, 虽然 VLDL 组血脂指标与对照组比较有降低趋势但差异未达到统计学显著水平。据此尚不能认定实验措施对血脂水平有明显影响。这与本实验前期工作结果不同, 前期工作结果显示兔新生期接种 VLDL 后, 血脂指标都有明显的下降^[8]。本研究认为这可能与动物种属不同, 对脂类食物吸收、代谢不同造成。VLDL 组内皮素水平与对照组比较虽无统计学意义, 但是 VLDL 组内皮素水平与对照组比较有降低趋势。

VLDL 是人体的自身成分, 理论上不会产生自身免疫反应, 但是研究证明, 无论是 LDL 还是 VLDL 被氧化后都是 A s 的危险因素^[14]。氧化后的 VLDL 比其本身更具内皮毒性^[6]。本研究为验证前期研究结果, VLDL 的制备重复了前期研究的过程,

VLDL 从高危动物模型中提取且没有采取抗氧化措施。根据本研究结果, 我们怀疑实验用 VLDL 有可能被轻微氧化, 或转化为 VLDL 颗粒后被轻微氧化。因为 VLDL 颗粒的主要成分是磷脂和载脂蛋白^[5], 较易被氧化。用未经氧化处理的 VLDL 接种动物已出现了免疫耐受的趋向, 由此可预计, 接种 ox-VLDL 应该具有预防 A s 的作用, 或许效果比接种 ox-LDL 更明显。

[参考文献]

- [1] Gounopoulos P, Merki E, Choi SH, et al. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease [J]. *Minerva Cardioangiol* 2007; **55** (6): 821-837.
- [2] Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control [J]. *J Intern Med* 2008; **263** (5): 464-478.
- [3] Nicoletti A, Caligiuri G, Zhou XH, et al. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in apoE knockout mice [J]. *Molecular Medicine* 2000; **6** (4): 283-290.
- [4] Nilsson J, Fredrikson GN, Carlsson R, et al. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease [J]. *Curr Pharm Des* 2007; **13** (10): 1021-030.
- [5] 田俊, 屈伸, 王燕, 等. 极低密度脂蛋白受体在泡沫细胞形成中的作用地位 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; **5** (12): 502-506.
- [6] 汪俊军, 封小美, 张春妮. 乳糜微粒和极低密度脂蛋白代谢残粒与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003; **7** (11): 681-683.
- [7] Knuth HS, Jones HL, Huang W, et al. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2005; **280**: 2352-360.
- [8] 李绍忱, 康殿民, 冯月秋, 等. 脂蛋白原接种对实验性高脂血症的影响 [J]. *中华预防医学杂志*, 1993; **27** (6): 332-334.
- [9] 康殿民, 李绍忱, 冯月秋, 等. 脂蛋白原预防动脉粥样硬化的实验研究 [J]. *山东医科大学学报*, 1995; **33** (1): 5-9.
- [10] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 165-197.
- [11] Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis [J]. *J Intern Med* 2000; **247**: 371-380.
- [12] 羊志辉, 阮云军, 黄祖坚. 冠心病患者免疫反应的变化研究 [J]. *海军医学杂志*, 2003; **2** (24): 106-107.
- [13] Zhou XH, Robertson AKI, Hansson CK, et al. Adoptive transfer of CD4T cells reactive to modified low-density lipoprotein aggravates atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; **26**: 864-870.
- [14] 瞿智玲, 阮秋蓉, 朱大和. 天然及氧化低密度和极低密度脂蛋白促进动脉平滑肌细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA [J]. *中国病理生理杂志*, 2005; **21** (3): 475-478.

(此文编辑 文玉珊)