

## RAW 264.7巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定

周云, 沃兴德, 卢德赵

(浙江中医药大学生命科学院, 浙江省杭州市 310053)

[关键词] RAW 264.7细胞; 泡沫细胞; 胆固醇酯; 氧化型低密度脂蛋白

[摘要] 目的 以小鼠巨噬细胞 RAW 264.7为对象, 建立简便而又准确的泡沫细胞诱导及鉴定方法。方法 将实验分为正常对照组和不同浓度氧化型低密度脂蛋白与细胞孵育组, 在以孵育时间为 24 h的前提下, 用 MTT法和流式细胞术来确定诱导泡沫细胞的氧化型低密度脂蛋白合适浓度区间范围, 并用总胆固醇试剂盒和游离胆固醇试剂盒测定不同程度泡沫细胞内胆固醇酯含量。结果 氧化型低密度脂蛋白浓度范围为 20~30 mg/L时, 细胞存活率已受到显著抑制, 并随着氧化型低密度脂蛋白浓度的增高细胞凋亡率和坏死率逐渐增大, 起初以细胞凋亡为主, 当氧化型低密度脂蛋白浓度大于 40 mg/L时凋亡的细胞不断坏死。20 mg/L和 30 mg/L氧化型低密度脂蛋白与 RAW 264.7细胞共孵育 24 h 细胞内胆固醇酯比重分别为 66.26%和 71.19%, 而 10 mg/L的氧化型低密度脂蛋白诱导 24 h的泡沫细胞不典型, 40 mg/L以上的氧化型低密度脂蛋白诱导的泡沫细胞泡沫化程度严重, 贴壁不牢, 大部分细胞破裂或凋亡, 脂滴散布于细胞外。结论 20~30 mg/L氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW 264.7巨噬泡沫细胞模型稳定且形态较完整, 符合泡沫细胞的形态学特征。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

### The Model Establishment and Identification of RAW 264.7 Macrophage-Derived Foam Cell

ZHOU Yun, WO Xing-De, and LU De-Zhao

(College of Life Science, Zhejiang Traditional Chinese Medicine University, Hangzhou, Zhejiang 310053, China)

[KEY WORDS] RAW 264.7 Cells, Foam Cell, Cholesterol Ester, Oxidized Low Density Lipoprotein

[ABSTRACT] **Aim** To establish the model of murine macrophage RAW 264.7 derived foam cell and identify them with simple and accurate method. **Methods** The experiment was divided into normal control group and six experimental groups of different concentration of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) incubated with cell. On the incubation time for 24 hours that MTT method and flow cytometry (FCM) were used to determine the suitable range of ox-LDL concentration, then measure intracellular cholesterol ester in different level of macrophage foam cell with total cholesterol and free cholesterol kit. **Results** Cell viability had been significantly inhibited when ox-LDL concentration was at the range of 20~30 mg/L, when ox-LDL concentration was greater than 40 mg/L, apoptosis cells continuously necrosis. Ox-LDL at the concentration of 20 and 30 mg/L, incubated with cell for 24 hours, the proportion of intracellular cholesterol ester were 66.26% and 71.19%. Foam cell induced by 10 mg/L of ox-LDL was not typical and by 40 mg/L of ox-LDL or more severe degree of foam cell led to cells floating, most cells were rupture or apoptosis, lipid droplet dispersed in extracellular. **Conclusion** Ox-LDL at the concentration range of 20~30 mg/L, incubated with RAW 264.7 for 24 h, induced foam cell has good morphology and model stability, meet the morphology feature of foam cell.

巨噬细胞泡沫化是早期动脉粥样硬化病变的标志之一, 常用于建立巨噬泡沫细胞模型的细胞有 THP-1、U937和 RAW 264.7。THP-1和 U937培养较为困难, 且在佛波脂诱导形成巨噬细胞过程中容易丧失活性。RAW 264.7细胞来源广泛、性质稳定、贴

壁易养。而且目前在关于泡沫细胞形成的通路、抗炎药物的作用机制以及炎症信号传导通路的研究中<sup>[1-6]</sup>, 大量实验以 RAW 264.7巨噬细胞作为研究对象。因此, 本实验用铜离子氧化法制备氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL), 并利用不同浓度的 ox-LDL 诱导 RAW 264.7巨噬细胞泡沫化, 以胆固醇酯/总胆固醇 (CE/TC)值以及细胞流式反应不同程度泡沫细胞凋亡情况为指标, 寻找诱导 RAW 264.7泡沫细胞的最佳浓度范围, 为抗动脉粥样硬化药物作用机制的研究及抗动脉粥样硬化新药的筛选提供良好的细胞模型和实验平台。

[收稿日期] 2010-07-23 [修回日期] 2010-09-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30873366)

[作者简介] 周云, 硕士研究生, 主要从事中药抗动脉粥样硬化研究, Email为 zhouyun04y@163.com。卢德赵, 博士, 讲师, 主要从事中西医结合基础研究。通讯作者沃兴德, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂代谢与动脉粥样硬化研究, Email: woxd@126.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

RAW 264 7细胞株购于中国科学院上海细胞库; RPM I1640、胎牛血清和胰蛋白酶购于杭州昊天生物技术有限公司; 丙二醛检测试剂盒购于凯基生物科技发展有限公司; Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购于上海超研生物科技有限公司; 总胆固醇(TC)和游离胆固醇(FC)检测试剂盒购于北京五洲元业科贸中心; Sepharose™ 6B和 2-D Quik试剂盒购于GE公司; 健康人血清购于浙江省血液中心。

### 1.2 主要仪器

超速离心机、21C-B-IV(MB99-4)液相色谱分离层析系统和 UV 8500双束紫外分光光度计(日本 HITACHI公司); Heraeus型三气细胞培养箱(德国 Heraeus公司); DM II型倒置荧光显微镜(德国 Leica公司); UR-4100型酶标仪(美国 Dynatech公司); 流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson公司)。

### 1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

取健康人血清,用序列超速离心法及 Sepharose™ 6B凝胶过滤法分离获取纯化的低密度脂蛋白(LDL)。定量后用 0.01 mol/L PBS将其稀释至 50 mg/L,向稀释后的 LDL中加入 1 mol/L CuSO<sub>4</sub>,使之终浓度为 5 mmol/L,37℃水浴 24 h。氧化结束后取少量样品,根据硫代巴比妥酸反应物含量来鉴定 LDL氧化程度,以四乙氧基丙烷为标准品,按照丙二醛测定试剂盒说明书测定 LDL氧化程度,其余 ox-LDL转入透析袋中,于含 0.1% EDTA-Na<sub>2</sub>的 PBS缓冲液中室温透析 24 h,每 2 h换液一次,第 4次透析过夜。透析完毕,用 PEG20000浓缩,用 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,测定浓度后 4℃保存。

### 1.4 泡沫细胞模型的建立

1.4.1 ox-LDL对巨噬细胞增殖活力的影响 将生长良好的 RAW 264 7细胞以  $1 \times 10^4$  /200 μL的密度接种于 96孔板,每孔 200 μL,培养 24 h,细胞贴壁后弃细胞液,将 ox-LDL用培养基配置成 10、20、30、40、60及 80 mg/L,加入 96孔板中,对照组不加 ox-LDL,每个浓度设五个重复,继续培养 24 h后,MTT法在 570 nm处测各浓度组的吸光值。

1.4.2 ox-LDL对巨噬细胞凋亡和坏死的影响 将 ox-LDL用细胞培养液分别稀释至 10、20、30、40、60及 80 mg/L,在 6孔板中与巨噬细胞共孵育 24 h,分别收集不同程度的泡沫细胞于 EP管中,用 500 μL的 Binding buffer悬浮细胞,再分别相继加入 5 μL Annexin V-FITC和 Propidium Iodide 混匀,避光

室温反应 5 min,用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm。

1.4.3 巨噬细胞泡沫化程度的测定 将细胞以  $5 \times 10^7$  /L的密度接种于 6孔板中,每孔 4 mL,培养 24 h后弃原液,用细胞培养液配置的 10、20及 30 mg/L ox-LDL与细胞共同孵育 24 h,正常对照组不加 ox-LDL,孵育结束后,将不同程度泡沫细胞分别转移至 1 mL的 EP管中,再用无水乙醇超声破碎萃取细胞内胆固醇,按照总胆固醇和游离胆固醇试剂盒操作说明书,测定细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量,再计算出泡沫细胞内胆固醇酯(CE)比重。

1.4.4 泡沫细胞油红 O染色 弃细胞培养液,用 0.01 mol/L PBS清洗 3遍后,多聚甲醛固定 10 min,用油红 O染色 15 min,再用 60%油红 O异丙醇清洗,再立即用 PBS清洗 3遍,显微镜下观察泡沫细胞形态。

### 1.5 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson直线相关分析,以  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氧化程度鉴定

LDL氧化结束后,在  $\lambda = 532$ 处测得标准品、空白对照品和样品的吸收值分别为 0.1347、0.0027及 0.0212,蛋白浓度为 50 mg/L,按照公式计算得出丙二醛含量为 28.03 μmol/g。

### 2.2 巨噬细胞增殖活力的变化

MTT实验结果显示,随着 ox-LDL浓度的增高泡沫细胞存活率明显降低。与空白对照组相比,ox-LDL浓度范围为 20~30 mg/L时,细胞存活率已受到显著性抑制,当 ox-LDL浓度大于 40 mg/L时细胞存活率受到非常显著性抑制(图 1)。

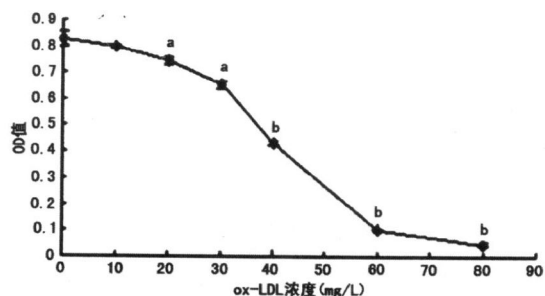


图 1. ox-LDL对巨噬细胞增殖活力的影响 a为  $P < 0.05$ , b为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较。

### 2.3 ox-LDL对巨噬细胞凋亡和坏死的影响

流式细胞仪检测结果显示,随着 ox-LDL浓度的增高细胞凋亡率和坏死率逐渐增大,起初以细胞凋亡占主要部分,当 ox-LDL浓度大于 40 mg/L时凋亡的细胞不断坏死,此时坏死的细胞占主要部分(表 1)。

表 1 ox-LDL对巨噬细胞凋亡和坏死的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

| ox-LDL浓度 | 正常细胞               | 凋亡细胞               | 坏死细胞               |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 0 mg/L   | 99.52% $\pm$ 0.56% | 0.07% $\pm$ 0.06%  | 0                  |
| 10 mg/L  | 93.71% $\pm$ 2.20% | 6.47% $\pm$ 1.82%  | 0.23% $\pm$ 0.15%  |
| 20 mg/L  | 80.11% $\pm$ 1.80% | 14.31% $\pm$ 3.21% | 5.33% $\pm$ 1.45%  |
| 30 mg/L  | 72.72% $\pm$ 2.01% | 16.32% $\pm$ 2.12% | 10.81% $\pm$ 2.34% |
| 40 mg/L  | 60.82% $\pm$ 2.23% | 16.94% $\pm$ 2.72% | 26.44% $\pm$ 1.92% |
| 60 mg/L  | 30.41% $\pm$ 2.02% | 12.82% $\pm$ 2.22% | 55.91% $\pm$ 3.32% |
| 80 mg/L  | 12.43% $\pm$ 3.73% | 5.94% $\pm$ 2.62%  | 80.80% $\pm$ 4.56% |

### 2.4 荷脂细胞内胆固醇酯含量

正常巨噬细胞内 CE的比重小于 60%,当用 20 mg/L和 30 mg/L ox-LDL诱导细胞 24 h,荷脂细胞内 CE比重分别为 66.26%和 71.19%,而 10 mg/L

诱导的荷脂细胞是非典型泡沫细胞,大于 40 mg/L诱导的泡沫细胞,其泡沫化程度严重,贴壁不牢,大部分细胞破裂或凋亡,脂滴散布于细胞外(表 2)。

表 2 不同程度荷脂细胞内胆固醇酯的比重 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

| ox-LDL浓度 | TC(mg/dL)        | FC(mg/dL)       | CE比重               |
|----------|------------------|-----------------|--------------------|
| 0 mg/L   | 14.78 $\pm$ 1.16 | 8.54 $\pm$ 0.59 | 42.12% $\pm$ 4.97% |
| 10 mg/L  | 15.02 $\pm$ 1.17 | 7.09 $\pm$ 0.43 | 52.79% $\pm$ 3.11% |
| 20 mg/L  | 28.16 $\pm$ 1.92 | 9.5 $\pm$ 0.88  | 66.26% $\pm$ 3.37% |
| 30 mg/L  | 29.85 $\pm$ 2.25 | 7.13 $\pm$ 0.43 | 76.12% $\pm$ 2.55% |
| 40 mg/L  | 16.63 $\pm$ 2.04 | 3.08 $\pm$ 0.52 | 81.48% $\pm$ 2.84% |
| 60 mg/L  | 9.98 $\pm$ 1.85  | 1.95 $\pm$ 0.46 | 80.46% $\pm$ 3.05% |
| 80 mg/L  | 6.65 $\pm$ 1.56  | 1.25 $\pm$ 0.24 | 81.23% $\pm$ 2.35% |

### 2.5 荷脂细胞形态改变

油红 O染色显示,正常细胞内未见或少见脂滴,10 mg/L ox-LDL诱导的荷脂细胞内可见少量脂滴,而 20~30 mg/L ox-LDL诱导的荷脂细胞脂滴明显增多,环状排列在细胞膜内侧,40、60及 80 mg/L ox-LDL诱导的泡沫细胞大多已破裂凋亡,脂滴遍布分散(图 2)。

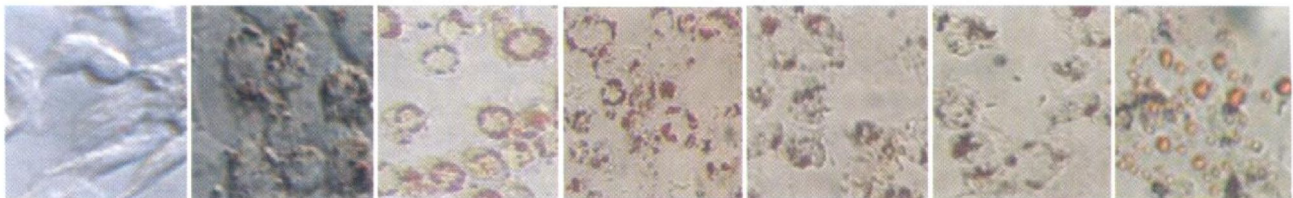


图 2 不同浓度 ox-LDL诱导的荷脂细胞形态 (40  $\times$  10) 从左至右分别为 0、10、20、30、40、60及 80 mg/L ox-LDL组。

## 3 讨论

动脉粥样硬化是一种多因素疾病,而 ox-LDL是致病的关键因素,在动脉粥样硬化形成过程中通过炎症和免疫机制促进泡沫细胞的形成<sup>[7]</sup>。研究发现<sup>[8]</sup> ox-LDL能上调多种黏附因子使单核细胞与内皮黏附,单核细胞进入内膜下分化成组织巨噬细胞。活化后的巨噬细胞大量表达多种受体,介导氧化修饰脂蛋白入胞,由于无节制地摄取脂蛋白,导致大量脂质蓄积于细胞内。另一方面细胞内聚集的 ox-LDL可以造成巨噬细胞内胆固醇外流受阻<sup>[9]</sup>,两方面的因素均促使胆固醇在巨噬细胞内蓄积,最终使巨噬细胞转化为泡沫细胞,成为动脉粥样硬化的病理性标志。为了进一步阐明动脉粥样硬化形成的机制以及研究抗动脉粥样硬化药物的作用机制,本研究以铜离子氧化法制备 ox-LDL,通过 ox-LDL诱导

RAW 264.7巨噬细胞的方法建立小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞模。研究表明,经氧化修饰后的 LDL对巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、激活的淋巴细胞等有较强的细胞毒性作用,能够激活相关信号传导途径诱导细胞凋亡<sup>[10]</sup>。另有文献[11, 12]报道 ox-LDL能显著以时间依赖的方式诱导细胞内 CE和 TC升高,且 ox-LDL可选择性作用于细胞循环周期的 S期,对增殖活跃期细胞的细胞毒性作用更强,可引起泡沫细胞坏死,形成粥样斑块的脂质核心,加速斑块的不稳定性。由于 ox-LDL对细胞显示了一定的毒性<sup>[13, 14]</sup>,所以本研究进一步采用 MTT法和流式细胞术研究了 ox-LDL对 RAW 264.7细胞增殖活力以及凋亡、坏死的影响,结果发现当 ox-LDL浓度超过 40 mg/L时,细胞活力急剧下降,细胞凋亡和坏死的总比率明显增加。在诱导泡沫细胞过程中,不同

研究显示诱导巨噬细胞源性泡沫细胞的 ox-LDL 浓度和诱导时间不一,有采用 20 mg/L 作用时间 72 h, 50 mg/L 诱导 24 h, 80 mg/L 诱导 24 h 等,因此可知诱导巨噬细胞泡沫化,除了细胞种类不同外,ox-LDL 的浓度和诱导时间是其关键的因素。本研究在确定 ox-LDL 与细胞孵育 24 h 的前提下,利用不同浓度的 ox-LDL 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞泡沫化,以 CE/TC 值以及细胞流式反应不同程度泡沫细胞凋亡情况为指标,寻找诱导 RAW 264.7 巨噬细胞泡沫化的最佳浓度范围。泡沫细胞的生物学特征有:一是胞浆内脂质成分增多,聚集成滴;二是细胞内 TC 增多,其中 CE 占 60% 以上<sup>[15,16]</sup>。根据以上两点特征,用 20 ~ 30 mg/L ox-LDL 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞后,脂滴聚集在胞浆内,形态完整,符合典型的泡沫细胞特征。

由于 RAW 264.7 巨噬细胞来源广泛,性质稳定,贴壁易养,且与人源巨噬细胞亲缘关系较近,本研究成功建立了 RAW 264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞模型,泡沫细胞形态典型,操作简单,模型稳定且细胞凋亡率低,为深入探讨动脉粥样硬化的发病机制提供良好的细胞疾病模型,为筛选抗动脉粥样硬化药物及其机制研究搭建良好平台。

#### [参考文献]

- [1] Liu Q, Dai Z, Liu Z, et al. Oxidized low density lipoprotein activates adropin through ERK1/2 signal pathway in RAW 264.7 cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010 **42** (9): 635-645
- [2] Kim JS, Park DW, Lee HK, et al. Early growth response-1 is involved in foam cell formation and is upregulated by the TLR9-MYD88-ERK1/2 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009 **390** (2): 196-200
- [3] Xie S, Lee YF, Kim E, et al. TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009 **106** (32): 13353-13358
- [4] Kim JM, Jung HA, Choi JS, et al. Comparative analysis of the anti-inflammatory activity of Huang-lian extracts in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage-like cells using oligonucleotide microarrays [J]. *Arch Pharm Res*, 2010 **33** (8): 1149-1157
- [5] Hirata K, Miyashiro M, Ogawa H, et al. Inhibition of tumor progression locus 2 protein kinase decreases lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production due to the inhibition of the tyrosine-associated protein induction in RAW 264.7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010 **33** (7): 1233-237
- [6] Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, et al. Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-kappaB and IFN-beta/STAT1 pathways in RAW 264.7 cells [J]. *Nitric Oxide*, 2010 **23** (3): 214-219
- [7] Capareviu Z, Kostin N, Iliu S, et al. Oxidized LDL and C-reactive protein level in relation to carotid intima-media thickness in population with risk factors for atherosclerosis [J]. *Sp Arh Celok*, 2009 **137** (3-4): 140-145
- [8] Wolfgang E, Weber PC, Weber C, et al. Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands [J]. *Atherosclerosis*, 1998 **136** (2): 297-300
- [9] Azam A, Takada M, Maeda M, et al. The COP9 signalosome controls ubiquitinylation of ABCA1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009 **382** (1): 145-148
- [10] Bustamante M, Diaz F, Munoz M, et al. Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in human lymphocytes: involvement of mitogen-activated protein kinases [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2007 **53** (Suppl): OL954-64
- [11] Klinkner AM, Waites CR, Kems WD, et al. Evidence of foam cell and cholesterol crystal formation in macrophages incubated with oxidized LDL by fluorescence and electron microscopy [J]. *J Histochem Cytochem*, 1995 **43** (10): 1071-078
- [12] Sack MN, Rader DJ. Estrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women [J]. *Lancet*, 1994 **343**: 269-273
- [13] Baird SK, Reid L, Hampton MB, et al. OxLDL induced cell death is inhibited by the macrophage synthesized pterin, 7,8-dihydropterin, in U937 cells but not THP-1 cells [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2005 **1745** (3): 361-369
- [14] Norata GD, Tonti L, Ramai P, et al. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidized LDL [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2002 **12** (5): 297-305
- [15] Fan J, Shimokawa T, Tokunaga O, et al. Activation and cholesterol accumulation of macrophages induced by hypercholesterolemia: A study using a rat peritoneal macrophage model for extravascular in vivo generation of foam cells [J]. *Pathobiology*, 1994 **62** (1): 1-7
- [16] Fogelman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980 **77**: 2214-2220

(此文编辑 文玉珊)