

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0925-06

· 实验研究 ·

氧化型低密度脂蛋白协同机械牵张力 促进巨噬细胞 ERK 1/2 活化

宁粉¹, 汪照静^{1,2}, 张征宇¹, 张敏¹, 刘树迎¹, 李宇煌¹, 黄锦桃¹, 李朝红¹

(1. 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东省广州市 510080; 2. 深圳市北科生物科技有限公司, 广东省深圳市 518057)

[关键词] 巨噬细胞; 机械牵张力; 氧化型低密度脂蛋白; ERK 1/2 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨机械牵张力、氧化型低密度脂蛋白单独或共同存在时对巨噬细胞 ERK 1/2 磷酸化的影响。方法 用墨汁染色法对体外培养的巨噬细胞株 RAW 264 7 进行鉴定; 用硫酸铜氧化天然低密度脂蛋白获得氧化型低密度脂蛋白, 并用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定和定量。体外培养静息状态的巨噬细胞分别给予氧化型低密度脂蛋白、机械牵张力以及机械牵张力 + 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间和强度, 收集的细胞蛋白用免疫印迹法检测细胞内 ERK 1/2 磷酸化水平。结果 巨噬细胞株 RAW 264 7 可吞噬墨汁, 镜下细胞内有墨汁斑块或墨汁颗粒存在, 或者有淡染呈云雾状的黑色物质存在。硫酸铜可氧化天然低密度脂蛋白成氧化型低密度脂蛋白, 琼脂糖凝胶电泳显示天然低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白泳道在血浆 β 脂蛋白处出现单一的条带, 并且氧化型低密度脂蛋白的迁移率明显较天然低密度脂蛋白高。氧化型低密度脂蛋白和机械牵张力刺激可分别引起细胞内 ERK 1/2 活性增加, 呈时间和强度依赖性; 与氧化型低密度脂蛋白组和机械牵张力组相比, 氧化型低密度脂蛋白和机械牵张力共同处理可使 ERK 1/2 磷酸化明显增加。结论 氧化型低密度脂蛋白、机械牵张力单独作用均可激活细胞内 ERK 1/2 而两者共同存在时可协同促进细胞内 ERK 1/2 信号。为高血压时巨噬细胞如何参与动脉粥样硬化形成的机制探讨提供有用资料。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein and Stretch Stress Synergistically Promote the Activation of ERK 1/2 in Macrophages

NING Fen¹, WANG Zhao-Jing^{1,2}, ZHANG Zheng-Yu¹, ZHANG Min¹, LIU Shu-Ying¹, LI Yuhuang¹, HUANG Jintao¹, and LI Chaohong¹

(1. Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Shenzhen Beike Biotechnology Company Limited, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Stretch Stress; Oxidized Low Density Lipoprotein; ERK 1/2; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore effects of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and mechanical stretch stress (SS) on activation of extracellular regulated kinase (ERK 1/2) in macrophage RAW 264 7 cells. **Methods** The cultured RAW 264 7 cells were identified via ink staining. Agarose gel electrophoresis was employed to identify and quantify ox-LDL which was oxidated from n-LDL with copper sulfate. The identified RAW 264 7 cells were subjected to treatment with ox-LDL and SS, respectively or jointly, for different dose/elongation and time duration, and then the phosphorylation of ERK 1/2 in the macrophages was detected by Western blotting. **Results** RAW 264 7 cells could phagocytize ink, forming cloudy ink plaque or black particles in cytoplasm. n-LDL could be oxidized into ox-LDL by copper sulfate, since a single lane about ox-LDL could be seen in agarose gel electrophoresis, and the electrophoretic mobility of ox-LDL was higher than that of n-LDL, indicating successful ox-LDL preparation. Ox-LDL and SS could induce ERK 1/2 phosphorylation, respectively, in a time and dose dependent manner, and dramatical increase of ERK 1/2 phosphorylation was observed when the cells were co-treated with SS and ox-LDL. **Conclusions** Ox-LDL and SS could induce ERK 1/2 phosphorylation, and combined treatment of ox-LDL and SS could synergistically promote ERK 1/2 phosphorylation in macrophages. This study could provide useful information for exploring the roles of macrophages and its mechanism in hypertension-related atherosclerosis.

环境和遗传因素与高血压密切相关。神经精神因素、血糖升高、血脂异常均可改变血管的结构和

[收稿日期] 2010-09-27 [修回日期] 2010-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金 (30570762, 30871023, 81070124); 广东省自然科学基金 (8151008901000044); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20090171110049)

[作者简介] 宁粉, 硕士, 研究方向为心血管重塑分子机制与防治, E-mail为 ningfen060412@163.com。汪照静, 硕士, 研究方向为心血管重塑分子机制与防治。通讯作者李朝红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管重塑分子机制与防治, E-mail为 lichaohongzq@yahoo.com。

功能,即血管重构(VR),引起慢性血压升高,并导致早期细小动脉血管硬化^[1]。而一旦高血压形成,因血压升高产生的异常生物机械力即刻成为了引起血管重构的主要因素^[2],并协同遗传与环境因素加速促进血管重构,最终出现晚期大中动脉粥样硬化(As)病变。As发生发展经历一个复杂的病理生理过程,是许多不同血管性疾病终极归属,如高血压、高血糖、高血脂等。As斑块中细胞成分有多种,主要包括血管平滑肌细胞(VSMC)、巨噬细胞以及少量炎症细胞等^[3]。巨噬细胞从血液迁移入内皮下层后吞噬脂质转变成泡沫细胞是As发生的重要事件之一^[4]。目前,关于脂质与巨噬细胞泡沫化形成机制的研究报道较多^[5],然而,对于在高血压引起As发生过程中,异常机械力和氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)两者如何影响巨噬细胞生物学活性的机制未见相关文献报道。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一组由丝氨酸/苏氨酸残基组成的蛋白激酶,包括三个成员ERK1/2、JNK1/2和p38MAPK。大量文献显示ERK1/2活化与细胞迁移、增殖密切相关,而JNK1/2和p38MAPK主要参与细胞应激以及细胞凋亡等^[6],因而MAPK磷酸化检测常用作为判断细胞活性的检测平台。本研究对体外培养的巨噬细胞RAW 264 7分别给予ox-LDL、SS刺激以及合并两因素同时处理,观察了RAW 264 7在接受刺激后细胞内ERK1/2磷酸化的变化,旨在探讨高血脂、高血压状态下巨噬细胞如何参与As的发生发展。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 干粉培养基、胰蛋白酶(Gibco公司),胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限公司),鼠抗p-ERK、兔抗 β -actin(Cell Signaling Technology公司),HRP标记的山羊抗鼠二抗、HRP标记的山羊抗兔二抗(QED, Biovision Inc),血浆(中山大学附属第一医院),0.2 μ m硝酸纤维素膜(Pall),ECL试剂盒(GE Healthcare),显影剂、定影剂(广州化学试剂厂),细胞牵拉仪、牵拉板(Flexcell)。

1.2 RAW 264 7细胞的培养与鉴定

鼠源性RAW 264 7巨噬细胞购自中科院上海细胞生物所细胞中心。细胞培养于10%胎牛血清、青霉素和链霉素的DMEM培养液中,取对数生长期的细胞按照 5×10^8 个/L,3 mL/孔接种于含有盖玻片的6孔培养板中,待细胞生长为典型形态后加入

终浓度为10%的墨汁,3 h后取出盖玻片,PBS冲洗3次,4%多聚甲醛固定10 min,PBS冲洗3次后用缓冲甘油封片,显微镜下观察拍片。

1.3 ox-LDL的制备

血浆解冻后装入透析袋埋入聚乙二醇中浓缩,KBr调整血浆密度为1.3 kg/L后加入到离心管中,并加入1.006 kg/L NaCl密度液,15℃、50 000 r/min离心5 h收集LDL带。0.01 mol/L PBS在4℃透析,每隔12 h换液一次,连续3天。加入终浓度为5~10 μ mol/L CuSO₄,37℃水浴氧化6~12 h加入终浓度为10 μ mol/L EDTA终止氧化。在含0.1% EDTA的PBS缓冲液中4℃透析,每隔12 h换液一次,连续3天。0.01 mol/L PBS 4℃透析,每隔12 h换液一次,连续3天。透析结束后,测定蛋白浓度。用0.22 μ m微孔小滤器过滤,无菌分装并4℃保存备用。

1.4 ox-LDL的琼脂糖凝胶电泳鉴定

用TAE配制0.5%琼脂糖加热溶解后倒入制胶槽,插入梳子室温冷却。放入到电泳池中拔出梳子,加入处理后的样品,100 V电压,70 min电泳,考马斯亮蓝染色0.5~1 h常规脱色。

1.5 ox-LDL对RAW 264 7巨噬细胞ERK1/2磷酸化的影响

用含10%胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度至 6.5×10^6 个/L,取5 mL细胞悬液接种于60 mm \times 15 mm培养皿。待细胞长到融合度为80%~90%时,换用无血清的DMEM培养基培养24 h,按照培养皿中ox-LDL的终浓度为0、12.5、25、50及100 mg/L设为一组;使ox-LDL终浓度为25 mg/L,作用细胞0.5、10、15、30、60及120 min后收集培养的细胞进行Western blotting检测。

1.6 SS对RAW 264 7巨噬细胞ERK1/2磷酸化的影响

用含10%胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度至 6.5×10^6 个/L,取2 mL细胞悬液接种于牵拉板的6个37 mm \times 15 mm独立小凹中。该牵拉板底部是含有硅有机树脂的弹力膜,接种于此弹力膜上的细胞随着弹力膜的伸张而感受牵张力,细胞牵拉仪与牵拉力与Banes等^[7]描述一致。待细胞长到融合度为80%~90%时,换用无血清的DMEM培养基培养细胞24 h,按照机械牵拉力为0%、5%、10%、15%及20%作用于细胞10 min设为一组;使SS为10%,作用于细胞的时间为0.5、10、15、30、60及120 min设为一组。收集培养的细胞进行Western blotting检测。

1.7 SS和 ox-LDL共同作用对 RAW 264 7巨噬细胞 ERK1/2磷酸化的影响

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞密度至 6.5×10^6 个/L, 取 2 mL 细胞悬液接种于牵拉板的 6 个 37 mm \times 15 mm 独立小凹中。待细胞长到融合度为 80% ~ 90% 时, 换用无血清的 DMEM 培养基培养 24 h 实验分组: 对照组、ox-LDL 组、SS 组、ox-LDL+ SS 组, 其中 ox-LDL 终浓度为 25 mg/L, 作用时间为 10 min, SS 强度为 10%, 作用时间为 10 min。收集培养的细胞进行 Western blotting 检测。

1.8 Western blotting 检测 RAW 264 7巨噬细胞磷酸化 ERK1/2

倒掉原来的培养液, 用冰 PBS 液洗 2 次, 加入适量 PBS 液用细胞刮快速收集不同条件处理的 RAW 264 7 细胞到 1.5 mL EP 管中, 低温冷冻离心 1 min, 吸去上清, 加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液混匀细胞, 冰上裂解细胞, 在高速振荡器上振荡细胞, 每隔 5 min 振荡一次, 共 30 min, 使细胞裂解充分, 13000 r/min 离心 20 min 后小心吸取上清到新的 EP 管中; 酶标仪测定细胞蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 电流设定为 40 mA, 蛋白上样量 100 μ g 转膜 180 min, 电流 400 mA。含 5% 脱脂牛奶的 TBS 室温封闭 30 min, 用含 5% BSA 的 TBS 稀释 p-ERK 抗体 (1: 1000) 及 β -actin 抗体 (1: 1000)。4 $^{\circ}$ C 于湿盒中反应过夜; 用 1 \times TBS 洗膜 3 次, 每次 5 min; 二抗用 5% 脱脂奶粉的 TBS 按照 1: 3000 稀释后室温反应 1~2 h, 1 \times TBS 洗 4 次, 每次 5 min; ECL 化学显色试剂盒 A 液: B 液以 1: 1 混匀后, 与膜作用 1 min, 然后将膜迅速放入暗盒中, 暗室曝光、显影。用 Image J Excle 及 SPSS13.0 对所存图像进行处理、分析。

1.9 统计学方法

每个实验独立重复 3 次以上, 各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 数据包进行处理, 多组间比较用单因素方差分析, LSD 法进行组间两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAW 264 7 细胞的形态学鉴定

镜下, RAW 264 7 细胞完全贴壁, 界限清楚, 呈圆形、椭圆形、扁梭形及不规则形, 胞核呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央或略偏, 胞质内可有空泡状结构存在, 细胞分裂增殖, 可出现短细或钝圆的突起; 墨汁染色后胞内有墨汁斑块或墨汁颗粒存在, 或者

有淡染呈云雾状的黑色物质存在 (图 1)。提示 RAW 264 7 细胞具有巨噬细胞特性, 并可用于后续研究。

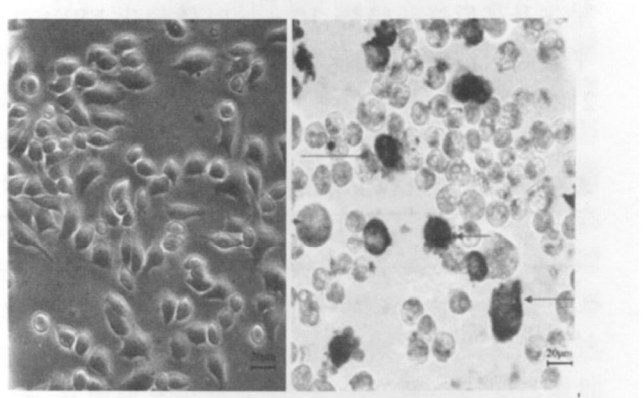


图 1 RAW 264 7 细胞的培养与鉴定 左为处于对数生长期的巨噬细胞 RAW 264 7; 右为巨噬细胞 RAW 264 7 的墨汁染色。

2.2 ox-LDL 的琼脂糖凝胶电泳鉴定

一次性密度梯度离心后, 在密度液中间隔出现极低密度脂蛋白 (vLDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL) 和无脂血浆蛋白条带, 分界清晰; 琼脂糖凝胶电泳显示 LDL 和 ox-LDL 泳道在血浆 β 脂蛋白处出现单一的条带, 并且 ox-LDL 迁移率明显较 LDL 高 (图 2)。提示这种方法制备的 ox-LDL 纯度和密度都比较高, 可用于后续研究。

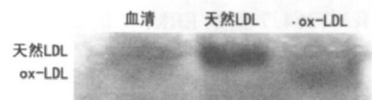


图 2 ox-LDL 的琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.3 ox-LDL 对 RAW 264 7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

当 ox-LDL 浓度为 12.5 mg/L 时, RAW 264 7 细胞内磷酸化 ERK1/2 无明显变化; 当 ox-LDL 浓度为 25 mg/L 时, RAW 264 7 细胞内磷酸化 ERK1/2 与空白对照相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 随着 ox-LDL 浓度的升高磷酸化 ERK1/2 水平逐渐升高。随着作用时间的不同, 25 mg/L ox-LDL 对磷酸化 ERK1/2 的影响不同, 呈先升高后降低态势; 10 min 时磷酸化 ERK1/2 水平最高, 120 min 时回落到基础水平 (表 1 和图 3)。

2.4 SS 对 RAW 264 7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

不同强度的 SS 对磷酸化 ERK1/2 的影响不同, 当牵拉强度为 10% 时 ERK1/2 磷酸化水平最高, 与

对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$); 当牵拉强度再上升时 ERK1/2 磷酸化水平有所下降。随作用时间不同, 10% 牵张力对磷酸化 ERK1/2 的影响不同, 呈先升高后降低趋势, 10 min 时磷酸化 ERK1/2 水平最高, 且与对照相比有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 2 和图 4)。

表 1. ox-LDL 对 RAW 264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

分 组	ERK1/2 磷酸化水平
对照组	1.0 ± 0.0
ox-LDL 干预浓度	
12.5 mg/L	1.3 ± 0.1
25 mg/L	5.3 ± 1.7 ^{ab}
50 mg/L	8.0 ± 0.7 ^{ab}
100 mg/L	8.5 ± 0.5 ^{ab}
ox-LDL 干预时间	
5 min	3.3 ± 1.2 ^{ac}
10 min	5.3 ± 1.7 ^a
15 min	4.5 ± 0.4 ^a
30 min	3.6 ± 0.2 ^a
60 min	2.7 ± 0.3 ^{ac}
120 min	1.6 ± 0.3 ^c

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 12.5 mg/L ox-LDL 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 10 min 组或 15 min 组比较。

表 2. SS 对 RAW 264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

分 组	ERK1/2 磷酸化水平
对照组	1.0 ± 0.0
SS 干预强度	
5% SS	6.6 ± 3.4
10% SS	7.8 ± 4.9 ^{ab}
15% SS	7.4 ± 3.7 ^{ab}
20% SS	3.0 ± 1.5 ^{ac}
SS 干预时间	
5 min	4.9 ± 3.5
10 min	7.8 ± 4.9 ^{ad}
15 min	7.5 ± 5.2
30 min	6.0 ± 4.1
60 min	5.5 ± 5.0
120 min	3.3 ± 2.9 ^d

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 5% SS 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 10% SS 组或 15% SS 组比较; d 为 $P < 0.05$ 与 15 min 组比较。

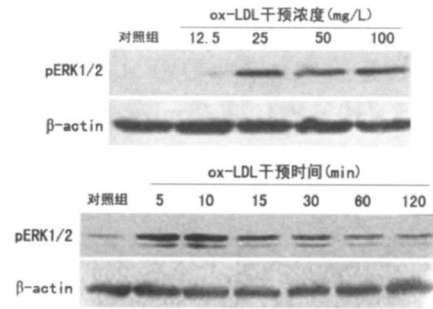


图 3. ox-LDL 对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

上图为不同浓度 ox-LDL 作用 10 min 对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响; 下图为 25 mg/L ox-LDL 作用不同时间对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

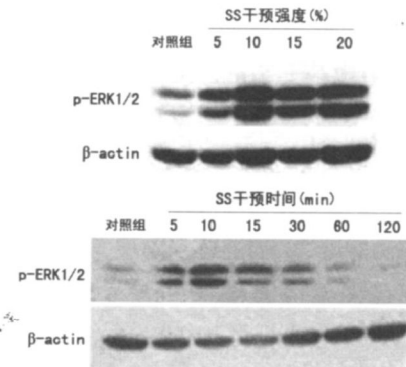


图 4. 机械力牵拉对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

上图为不同拉伸强度的 SS 作用 10 min 对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响; 下图为 10% 拉伸强度的 SS 作用不同时间对 RAW264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响。

2.5 SS 和 ox-LDL 共同作用对 RAW 264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

10% SS 与 25 mg/L ox-LDL 共同作用于 RAW 264.7 细胞 10 min 与对照组、ox-LDL 组、SS 组相比 ERK1/2 磷酸化水平显著增强 ($P < 0.05$)。ox-LDL 组、SS 组 ERK1/2 磷酸化水平与对照组相比也有显著性差异 (表 3 和图 5)。

表 3. SS 和 ox-LDL 共同作用对 RAW 264.7 细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

分 组	ERK1/2 磷酸化水平
对照组	1.0 ± 0.0
25 mg/L ox-LDL	5.3 ± 1.7 ^a
10% SS	7.8 ± 4.9 ^a
25 mg/L ox-LDL + 10% SS	10.2 ± 5.1 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P < 0.05$ 与 SS 组比较。

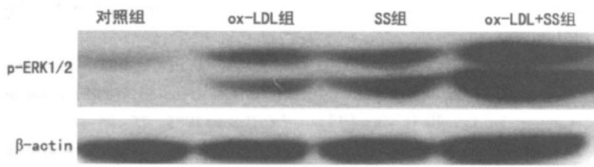


图 5 SS 和 ox-LDL 共同作用对 RAW 264.7 巨噬细胞 ERK1/2 磷酸化的影响

3 讨论

越来越多的证据显示血压升高引起的 SS 对心血管细胞是非常重要的细胞外刺激, 它可促进细胞的基因表达、蛋白质合成以及细胞迁移、分化、肥大、增殖或凋亡及炎症反应等, 最终导致心血管结构和功能的改变即血管重构^[8], 如 As。病理学研究显示在 As 斑块中存在的细胞主要有 VSMC 和单核巨噬细胞来源的泡沫细胞。SS 如何作用于 VSMC 引起其结构和功能变化的研究已有较多报道^[9], 同样, ox-LDL 如何引起 VSMC 和巨噬细胞泡沫化的机制也有很多资料^[5], 然而, SS 如何对巨噬细胞的影响却鲜有报道^[10]。本研究显示 SS 可激活巨噬细胞内 ERK1/2 活性, 明显增加 ERK1/2 磷酸化, 且呈牵拉时间和强度依赖性; 而当机械牵张力与 ox-LDL 合并存在时, 巨噬细胞内 ERK1/2 磷酸化水平更高。因此, 本研究具有以下几方面的重要意义: 首先, SS 诱导巨噬细胞内 ERK1/2 磷酸化的增加可以强调高血压在促进 As 发生发展过程中的重要作用; 其次, SS 与 ox-LDL 共存进一步增加 SS 对巨噬细胞内 ERK1/2 的激活作用, 可部分解释临床上高血压与高血脂并发时血管重构加速的现象; 最后, 本实验结果为高血压致病机制的研究提供了新证据。

3.1 SS 诱导巨噬细胞内 ERK1/2 磷酸化增加

已知 MAPK 通路是非常经典的细胞内信号通路, 许多种不同细胞可以被多种细胞外物理的、化学的刺激而直接激活, 包括生物机械力、生长因子、血管活性多肽、氧化应激等。ERK1/2 是 MAPK 成员之一, 与细胞迁移、分化、增殖、凋亡和炎症有关。我们前期研究显示 SS 可引起 VSMC MAPK 及其下游信号的激活, 导致其异常迁移、分化、增殖、凋亡和炎症等。本研究显示 SS 可明显地促进巨噬细胞 ERK 磷酸化。这些结果提示在体内高血压时生物机械力可能直接作用于沉积于内皮下层的巨噬细胞、VSMC, 导致其异常迁移、分化、代谢、增殖、泡沫化、凋亡、炎症等, 促进 As 发生发展。

3.2 ox-LDL 协同 SS 促进巨噬细胞内 ERK1/2 磷酸化增加

ox-LDL 对巨噬细胞的作用已有许多报道, 低剂量 ox-LDL 可以通过 ERK1/2 抑制 THP-1 和小鼠腹膜巨噬细胞凋亡^[11], ox-LDL 在 15 min 时可通过激活小鼠腹膜巨噬细胞 GiPKC 而升高 P-ERK1/2 增加 GM-CSF 的生成^[10], ox-LDL 还可以通过调节 ERK1/2 及 p38 使巨噬细胞 Galectin-3 的表达增加^[12]、上调巨噬细胞表面清道夫受体 LDLR 的表达^[13-14], 而加速泡沫细胞的形成。此外, ox-LDL 的组成成分溶血磷脂胆碱通过 ERK1/2 信号促进 ROS 的产生以及炎症因子 IL-1 β 、CCL2 和 CCL5 的表达上调, 从而介导炎症反应^[14], 小凹蛋白的表达增加使巨噬细胞的黏附性增强^[15], 长时间增加的 ERK 活化还可以介导 M-CSF 引起的巨噬细胞分化^[16]。本研究结果显示 ox-LDL 不仅呈浓度及时间依赖性提高 RAW 264.7 巨噬细胞的 ERK1/2 的磷酸化水平, 而且还能促进 SS 进一步引起巨噬细胞 ERK1/2 的磷酸化水平增加, 两者呈现明显地协同激活作用。提示高血压一旦并发高血脂, 可使病情变得更严重、更复杂, 而血管结构与功能改变也更快速。

3.3 SS 诱导巨噬细胞内 ERK1/2 磷酸化增加为高血压致病机制的研究提供了新证据

血液流经血管时主要产生两种力^[17, 18], 即与血管纵轴平行的剪切力和与管壁垂直的 SS。剪切力主要对血管内皮细胞起作用, 而 SS 对血管壁所有细胞起作用, 包括正常血管壁内膜内皮细胞、中膜平滑肌细胞、外膜的成纤维细胞及未分化的间充质细胞等。无论临床或实验证据均显示过低或过高的机械力均可引起血管损害^[19], 而血压升高可明显引起剪切力和牵张力的同时增加。研究证明 SS 可以增强巨噬细胞的水解活性和迁移能力^[20]。在牵张力影响下, 巨噬细胞与内皮细胞之间的黏附加强^[21, 22]。本研究结果显示 SS 可以引起 ERK1/2 磷酸化水平改变, 并且呈强度及时间依赖性。与正常血管结构相比, As 血管出现了中膜 VSMC 肥大增厚、内膜增厚, 内皮下存在大量的 VSMC、巨噬细胞、炎症细胞等, 这些细胞似乎都可受到高血压机械力的直接作用。因此, 高血压与 As 发生发展密切相关, 而高血压产生的异常机械力直接激活新生内膜巨噬细胞也是高血压致病的重要机制之一。

3.4 VSMC 与巨噬细胞对 SS 反应的异同

VSMC 与巨噬细胞都是 As 斑块中的主要细胞, 两者来源不同, 功能不一, 两者均可吞噬脂质, 成为泡沫细胞。我们以往的实验中使用 VSMC 作为研究

对象,当给予一定 SS 强度刺激时,细胞内 ERK 1/2 的激活随着时间的增加出现从有无到有,到最大,然后出现下降,最终回归基础状态;而当牵拉时间一定时,随着牵拉强度的增大,细胞内 ERK 1/2 的激活随着强度的增加出现从有无到有,到最大,然后维持在一定的水平^[23]。而在本研究中,随着机械牵张强度增加,细胞内 ERK 1/2 的激活增加,10% 达高峰,随后开始下降。这与报道的 VSMC 对机械力作用后反应效果有所不同。原因之所在可能主要与细胞类型不同有关。静息状态的 VSMC 生长状态很好,在实验施加的牵张条件下细胞依然黏附在培养板上,而巨噬细胞则不然,静息状态时就有少部分细胞漂浮,若再施以机械力牵拉,随着牵拉强度的增加,漂浮的细胞数越多,因而出现目前结果,即先扬后抑。是否还存在其他原因,有待深入观察。

总之,遗传与环境可引起血管重构,导致高血压产生。然而一旦高血压产生,因血压升高产生的机械力即刻成为了血管重构的主要因素。因此可以推论:高血压状态下,血管壁实际上不仅受到原发性遗传与环境因素的作用,而且同时受到激发性血压升高增加的生物机械力的作用,两因素相加可加速血管重构。巨噬细胞给予单独的 ox-LDL 或 SS 刺激均可激活细胞内 ERK 1/2 信号,而两者合并存在,对 ERK 1/2 信号的激活比任何单一因素都要明显。那么,巨噬细胞是如何感受细胞外机械力信号并将其转入细胞内信号? ox-LDL 又如何协同 SS 增加 ERK 1/2 信号? 这些都将是本研究需要深入关注的问题。

[参考文献]

[1] Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, et al. Small artery structure in hypertension: Dual processes of remodeling and growth [J]. *Hypertension*, 1993, **21**: 391-397.

[2] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo [J]. *Cell Signal*, 2007, **19**: 881-891.

[3] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: Pathogenesis and pharmacology of plaque rupture [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, **3**: 63-68.

[4] Etzion Y, Hackett A, Proctor BM, et al. An unbiased chemical biology screen identifies agents that modulate uptake of oxidized LDL by macrophages [J]. *Circulation Research*, 2009, **105**: 148-157.

[5] 王宇石,刘心刚. 单核细胞源性泡沫细胞 *trm21* 的表达 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, **30**: 1 247-249.

[6] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-38 MAP kinases on apoptosis [J]. *Science*, 1995, **270**: 1 326-331.

[7] Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, et al. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro [J]. *J Cell Sci*, 1985, **75**: 35-42.

[8] 李子卿,李朝红. 代谢综合征与血管重塑研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17**: 1 035-037.

[9] 刘树迎,张征宇,谢富康,等. 钙离子通道部分介导 SS 引起的小鼠主动脉血管平滑肌细胞丝裂原活化蛋白激酶的激活 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17**: 581.

[10] Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, et al. Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase mediate macrophage proliferation induced by oxidized low-density lipoprotein [J]. *Atherosclerosis*, 2004, **176**: 233-245.

[11] Nangaladze D, Kollas A, Brune B. Oxidized LDL attenuates apoptosis in monocytic cells by activating ERK signaling [J]. *J Lipid Res*, 2008, **49**: 58-65.

[12] Koanhoik K, EPM, Maurice Nachtigal. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by RAS/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2003, **1 641**: 13-23.

[13] Fu Y, Huang Y, Bandyopadhyay S, et al. LDL immune complexes stimulate LDL receptor expression in U937 histiocytes via extracellular signal-regulated kinase and AP-1 [J]. *J Lipid Res*, 2003, **44**: 1 315-321.

[14] Park CH, Kim MR, Han JM, et al. Lysophosphatidylcholine exhibits selective cytotoxicity accompanied by ROS formation in RAW 264.7 macrophages [J]. *Lipids*, 2009, **44**: 425-435.

[15] Wu CC, Wang SH, Kuan H, et al. Ox-LDL upregulates caveolin-1 expression in macrophages: Role for caveolin-1 in the adhesion of ox-LDL-treated macrophages to endothelium [J]. *J Cell Biochem*, 2009, **107**: 460-472.

[16] Suzu SHM, Yoshikuni Y. MCSF-mediated macrophage differentiation but not proliferation is correlated with increased and prolonged ERK activation [J]. *J Cell Physiol*, 2007, **212** (2): 519-525.

[17] Binkov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, **11**: 1 651-667.

[18] Shyu KG. Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, **116**: 377-389.

[19] 李朝红. 高血压机械力引起血管重塑的分子机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15**: 531.

[20] Wang DL, Wang BS, Shyy YJ, et al. Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells: Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells [J]. *Circ Res*, 1995, **77**: 294-302.

[21] Cheng JJ, Wang BS, Chao YJ, et al. Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhesion molecule-1 expression [J]. *Hypertension*, 1996, **28**: 386-391.

[22] Yun JK, Anderson JM, Ziats NP. Cyclic strain effects on human monocyte interactions with endothelial cells and extracellular matrix proteins [J]. *Tissue Eng*, 1999, **5**: 67-77.

[23] Li CH, Hu YH, Mayr M, et al. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by RAS/RAC-MAPK pathways [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 25 273-280.

(此文编辑 文玉珊)