

ox-LDL 促进树突状细胞 LOX-1 表达及炎症因子分泌

李倩, 李帆, 章越凡, 芮耀诚

(第二军医大学药学院药理学教研室, 上海市 200433)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 树突状细胞; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1

[摘要] **目的** 应用小鼠高脂模型及树突状细胞株研究血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)高表达树突状细胞(DC)在动脉粥样硬化中的作用。**方法** 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导原代培养的 C57 小鼠骨髓来源的树突状细胞(BMDC),采用 Western blot 检测 BMDC LOX-1 蛋白水平;采用流式细胞术检测高表达 LOX-1 和低表达 LOX-1 细胞亚群的比例;MACS 磁珠分选 LOX-1 表达水平不同的两种细胞亚群,观察 ox-LDL 对两种细胞亚群的影响及释放炎症因子的影响;采用 C57 小鼠高脂模型,在高脂喂养的不同时间(4 周、6 周、8 周)检测小鼠总胆固醇水平和主动脉中 DC 数量;用不同浓度的 Dil 标记的 ox-LDL(Dil-ox-LDL)刺激 DC2.4 细胞,荧光显微镜观察各组细胞吞噬作用的差异,Western blot 检测 LOX-1 的表达。**结果** DC 可分为高表达和低表达 LOX-1 两种细胞亚群,且 ox-LDL 能增加 LOX-1^{high} DC 的比例;分选后的阳性细胞被 ox-LDL 刺激后,TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达明显上调($P<0.01$),且阳性细胞的上升比例高于阴性细胞。在 C57 小鼠高脂模型中,高脂喂养组总胆固醇水平明显升高,且随着总胆固醇水平的升高,小鼠主动脉中 DC 增多,且 LOX-1^{high} DC 比例明显增加。用不同浓度的 Dil-ox-LDL 刺激 DC2.4 细胞,随着 Dil-ox-LDL 浓度的升高,DC2.4 细胞对 ox-LDL 的吞噬也增加,并且 ox-LDL 可以诱导 DC2.4 细胞表面 LOX-1 表达,20 mg/L 和 40 mg/L 的 ox-LDL 对 LOX-1 表达的诱导作用明显。**结论** ox-LDL 能够上调 DC 表面受体 LOX-1,增加 LOX-1^{high} DC 比例,促进炎症因子表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Ox-LDL promotes the expression of LOX-1 and inflammatory cytokines secretion in dendritic cells

LI Qian, LI Fan, ZHANG Yue-Fan, RUI Yao-Cheng

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Oxidized low density lipoprotein; Dendritic cell; Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of dendritic cells (DC) with lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) high expression in atherosclerosis in vitro and in vivo. **Methods** Western blot was used to examine the protein expression levels of LOX-1 in ox-LDL stimulated primary cultured bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from C57 mice, flow cytometry was used to measure the ratio of LOX-1 high expression subsets and LOX-1 low expression subsets in BMDC, MACS was used to sort the two cell subsets with different LOX-1 expression and to observe the effects of ox-LDL on the ratio of two cell subsets and release of inflammatory factors. **Results** There were two different subsets of DC with high and low expression of LOX-1, the ratio of LOX-1^{high} DC was increased after ox-LDL treatment. After the LOX-1^{high} DC was stimulated by ox-LDL, the TNF- α and IL-1 β mRNA was up-regulated ($P<0.01$), and the percentage of positive cells increased higher than that of negative cells. In hyperlipidemia model of C57 mice, total cholesterol levels were significantly increased after fed with high fat diet for 4, 6 and 8 weeks. This was paralleled with an increase in DC number and in the ratio of LOX-1^{high} DC and LOX-1^{low} DC in the aorta from mice. Different concentrations of Dil-ox-LDL was used to stimulate DC2.4 cells, there was a concentration-dependent increase in the phagocytosis of Dil-ox-LDL by DC2.4 cells. Western blot showed that the LOX-1 expression in DC2.4 cells could be induced by ox-LDL at 20 mg/L and

[收稿日期] 2016-06-13

[修回日期] 2016-09-12

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30972713)

[作者简介] 李倩,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化防治研究,E-mail 为 liq.xx@163.com。通讯作者芮耀诚,教授,主要从事心脑血管药理学研究,E-mail 为 ruiyc163@163.com。

40 mg/L. **Conclusions** Two DC subsets of LOX-1^{high} DC and LOX-1^{low} DC were found in the present study, and the levels of expression of inflammatory cytokines in LOX-1^{high} DC subsets were significantly higher than LOX-1^{low} DC subsets. In hyperlipidemia model of mice in vivo, the ratio of LOX-1^{high} DC and LOX-1^{low} DC was significantly increased in the aorta. In DC2.4 cells, ox-LDL could up-regulate LOX-1 expression.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是危害人类健康的主要疾病之一,是多种心脑血管事件的病理基础^[1]。近年的研究表明,高脂血症是 As 的主要危险因素,同时,炎症和免疫激活是 As 发病的重要因素之一^[2-3]。作为免疫反应的重要调节者,树突状细胞 (dendritic cell, DC) 在 As 中起着非常重要的作用^[4-5]。DC 识别抗原后在固有免疫和适应性免疫中均有着重要作用,尤其是氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱发的免疫反应。已有研究表明,DC 在新生血管部位表达最丰富,并且紧邻 T 细胞。DC 在趋化因子的作用下聚集到血管壁,识别外源性或自身抗原,在斑块内诱导 T 细胞活化进一步加重血管炎症^[6-7]。研究显示,DC 的数量及功能状态与 As 斑块的性质有相关性。在小鼠 As 模型中,斑块损伤区的 DC 数量增加。动脉壁上的脂蛋白也作为刺激或抗原参与早期的免疫激活。已有研究表明 ox-LDL 会诱导 DC 表面的清道夫受体表达上调^[7],这可能对脉管系统中 DC 形成泡沫细胞起重要作用。

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是 ox-LDL 的主要受体之一^[8-10]。LOX-1 主要表达于血管内皮细胞和体内血管丰富的组织,也可被诱导表达于单核/巨噬细胞、平滑肌细胞、DC 和活化的血小板等^[11-12]。正常情况下,LOX-1 的表达很低,但在一些病理条件下,如高血压、糖尿病、心肌缺血、高脂血症、缺血再灌注损伤、移植以及 As 的发展中,LOX-1 的表达明显增加^[13-14]。ox-LDL 通过 LOX-1 与血管内皮细胞相互作用,引起血管内皮细胞损伤及内皮功能障碍,是 As 病理变化的始动环节之一^[15-18]。

本研究拟用 ox-LDL 诱导原代培养的 C57 小鼠骨髓来源的树突状细胞 (bone marrow derived dendritic cells, BMDC)、小鼠树突状细胞株 (DC2.4 细胞) 以及小鼠高脂模型,研究 DC 中 LOX-1 不同亚群的存在以及对 As 的影响。

1 材料和方法

1.1 动物和细胞

6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,购于上海斯莱

克动物有限公司,许可证号为 SCXK (沪) 2012-0002。实验动物饲养在 22℃、相对湿度 70% 的环境中,实验前饲养 1 周。DC2.4 细胞购自上海研谨生物公司。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI1640、胎牛血清、青链双抗、0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司);重组小鼠白细胞介素 4、重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (Invitrogen 公司);胆固醇检测试剂盒 (北京北化康泰临床试剂有限公司);PerCP-Cy5.5 标记的抗小鼠 CD45 抗体、APC 标记的抗小鼠 MHC II 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD11c 抗体、PE 标记的抗小鼠 LOX-1 抗体 (eBioscience 公司);羊抗小鼠 LOX-1 抗体 (R&D 公司);小鼠单克隆 β -actin 抗体和 HRP 标记的二抗 (上海康成生物有限公司);PE 标记的二抗 (Santa Cruz 公司);抗 PE 标记的 MACS 微珠、MACS 分选柱、MACS 分选器 (Miltenyi Biotec 公司);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司);siRNA 转染试剂 (Polyplus 公司);Dil-ox-LDL、ox-LDL (北京欣源佳和生物有限公司);real-time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司);流式细胞仪 (BD 公司)。

1.3 BMDC 的培养及 LOX-1^{high} DC 的测定

处死 C57BL/6J 小鼠,剥离出胫骨、股骨,分别剪开胫骨、股骨的两端,PBS 缓冲液将骨髓冲出,无血清 RPMI1640 重悬清洗 2 次,用含 10% 胎牛血清、10 μ g/L GM-CSF、10 μ g/L IL-4 的 RPMI1640 培养基于 37℃ 培养,6 天后可见 BMDC 集落,收集悬浮的细胞及细胞集落,PBS 缓冲液清洗 1 次,4% 多聚甲醛固定,1000 r/min 离心弃上清。PBS 缓冲液重悬细胞,FITC 标记 CD11c 一抗孵育 40 min,离心弃上清,流式细胞仪检测 BMDC 数量。

收集 1×10^6 个 BMDC,PBS 缓冲液清洗 1 次,4% 多聚甲醛固定,用 LOX-1 一抗孵育 40 min,PBS 缓冲液洗 1 次,加入 PE 标记的二抗避光孵育 40 min,流式细胞仪检测 LOX-1^{high} DC 比例。

1.4 分选 LOX-1^{high} DC

取培养第 6 天的 BMDC,ox-LDL (100 mg/L) 刺激 36 h 后,收集悬浮的 BMDC,离心弃上清,加入 100 μ L 缓冲液 (0.5% BSA, 0.08% EDTA, pH 7.2 PBS) 和 10 μ L 抗小鼠 LOX-1 抗体,4℃ 孵育 30 min,离心弃上清,加入

100 μ L 缓冲液(0.5%BSA,0.08%EDTA,pH7.2 PBS)和 10 μ L PE 标记的二抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,加入 80 μ L 缓冲液(0.5%BSA,0.08%EDTA,pH7.2 PBS)和 20 μ L 抗 PE 标记的磁珠,混匀,孵育 15 min,离心弃上清,加入 500 μ L 缓冲液重悬细胞,加至 MACS 分选柱中,自然流下的细胞液为未结合的阴性细胞;缓冲液冲洗 MACS 分选柱 2 次后,将分离柱插在阳性收集管上,加 1 mL 缓冲液,用针芯推尽液体,冲出阳性结合的细胞。能够与抗 LOX-1 抗体结合,被 MACS 分选柱分选出的阳性细胞为 LOX-1^{high}DC。

1.5 小鼠高脂模型的建立

6 周龄 C57 雄性小鼠,适应性喂养 1 周后随机分为两组:正常对照组和高脂喂养组。正常对照组采用普通饲料喂养,高脂喂养组采用高脂饲料喂养。分别于喂养 4 周、6 周和 8 周三个时间点摘除眼球的方法取血,离心后取血清,按照试剂盒操作说明检测总胆固醇(total cholesterol,TC)含量。

1.6 小鼠主动脉 DC 和 LOX-1^{high}DC 的测定

小鼠摘除眼球取血后,迅速开胸,剪取主动脉,PBS 缓冲液清洗后将主动脉剪碎,置于离心管中,加入酶消化液,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,4 $^{\circ}$ C、1500 r/min 离心 5 min,弃上清,离心管加入 PBS 缓冲液洗涤,4 $^{\circ}$ C、1500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 100 μ L PBS 缓冲液重悬沉淀的细胞,加入 PerCP-cy5.5 标记的抗 CD45 抗体、APC 标记的抗小鼠 MHC II 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD11c 抗体、PE 标记的抗小鼠 LOX-1 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,流式细胞仪检测 DC 和 LOX-1^{high}DC 的比例。

1.7 荧光显微镜观察 DC2.4 细胞对 Dil-ox-LDL 的吞噬作用

将 DC2.4 细胞以 2×10^5 的密度接种于 24 孔板,培养 24 h,待细胞完全贴壁后,弃去培养基,用 PBS 缓冲液清洗 1 次。加入含 50 mg/L Dil-ox-LDL 的培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,弃去培养基,用 PBS 缓冲液清洗 3 次,将细胞置于荧光显微镜下观察。

1.8 real-time PCR 检测

收集悬浮培养的 BMDC,按照 5×10^5 的密度加入 RNAiso Reagent,室温静置后,加入氯仿,混匀静置,待分层后吸取上清液,加入异丙醇,12000 g、4 $^{\circ}$ C 离心后,沉淀用适量的 RAase-free 水溶解,采用逆转录酶试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,加入引物和 real-time PCR 试剂盒,在 real-time PCR 仪上进行扩增,以 GAPDH 作为内参,比较 TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达差异。TNF- α 引物序列:上游为 5'-CAA

AGG GAG AGT GGT CAG GT-3',下游为 5'-ATT GCA CCT CAG GGA AGA GT-3';IL-1 β 引物序列:上游为 5'-AAC CTG CTG GTG TGT GAC GTT C-3',下游为 5'-CAG CAC GAG GCT TTT TTG TTG T-3';GAPDH 引物序列:上游为 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3',下游为 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3'。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 刺激对 DC LOX-1 表达的影响

取培养第 6 天的 BMDC,用 ox-LDL(100 mg/L)刺激 0 h、6 h、12 h、24 h、36 h、48 h 后提取 BMDC 总蛋白,Western blot 检测细胞中 LOX-1 蛋白的表达。结果发现,ox-LDL(100 mg/L)刺激 24 h、36 h、48 h 可以明显上调 BMDC 中 LOX-1 蛋白的表达($P < 0.01$;图 1)。

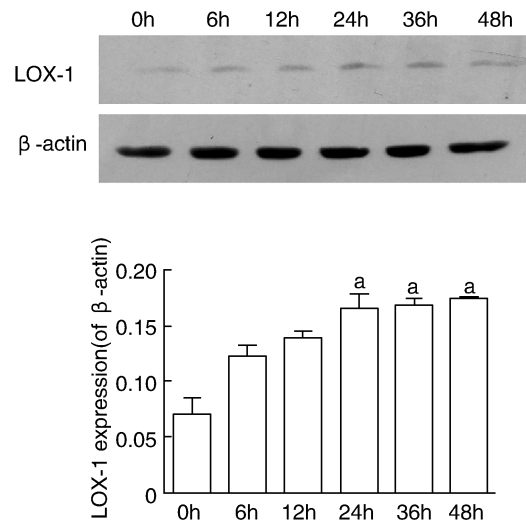


图 1. ox-LDL 刺激对 BMDC 中 LOX-1 表达的影响 a 为 $P < 0.01$,与 ox-LDL 刺激 0 h 比较。

Figure 1. Effect of ox-LDL stimulation on LOX-1 expression in BMDC

2.2 ox-LDL 刺激对 LOX-1^{high}DC 的影响

取培养第 6 天的 BMDC,用 ox-LDL(100 mg/L)刺激 0 h、36 h,经 FITC-CD11c 抗体和 PE-LOX-1 抗体孵育,流式细胞术检测 LOX-1^{high}DC 比例。结果发现,ox-LDL(100 mg/L)刺激 BMDC 36 h,PE-阳性细胞比例从 7.18% 上升至 25.05%,说明 ox-LDL 可以促进 LOX-1^{high}DC 比例增加(图 2)。

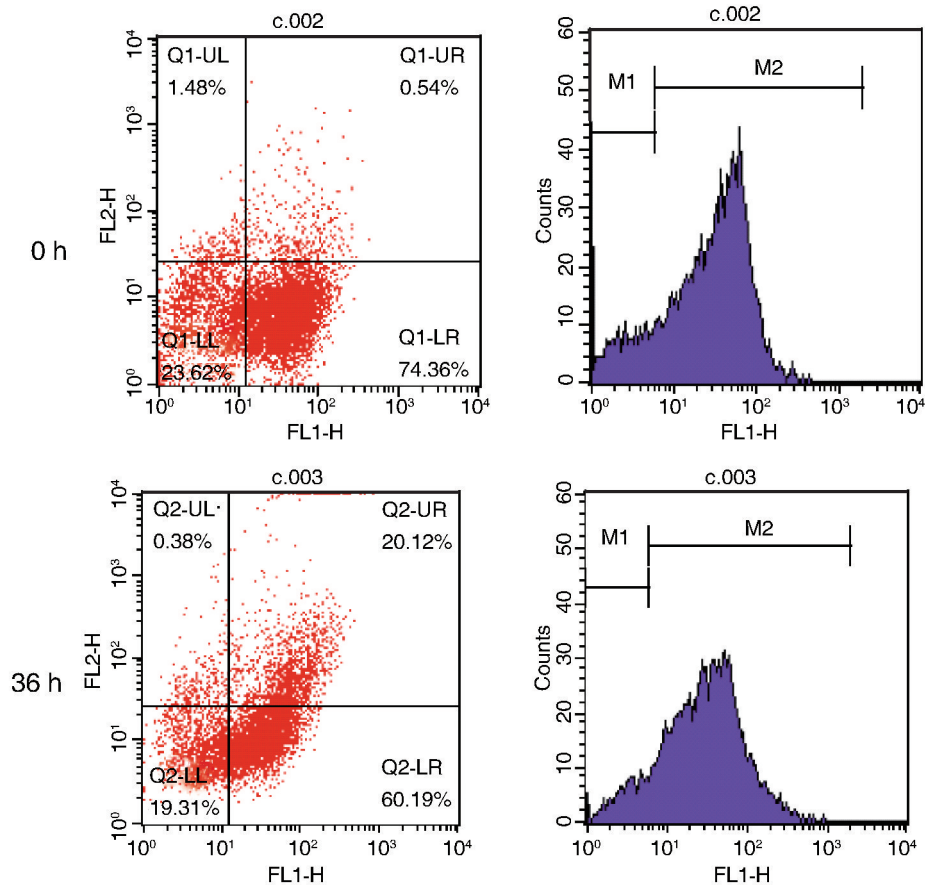


图 2. ox-LDL 刺激对 BMDC LOX-1^{high} DC 比例的影响

Figure 2. The ratio of LOX-1^{high} DC in BMDC induced by ox-LDL

2.3 ox-LDL 刺激对 BMDC 炎症因子分泌的影响

取培养第 6 天的 BMDC, 用 ox-LDL (100 mg/L) 刺激 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h, 提取 BMDC 总 RNA, real-time PCR 检测细胞内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达水平。结果发现, ox-LDL (100 mg/L) 刺激 BMDC 3 h 可以明显促进 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达 ($P < 0.01$; 图 3)。

取培养第 6 天的 BMDC, 用 ox-LDL (100 mg/L) 刺激 36 h 后进行 MACS 分选, ox-LDL 刺激分选后的阳性细胞 (LOX-1 高表达的 BMDC) 和阴性细胞 (LOX-1 低表达的 BMDC) 3 h, 抽提总 RNA, real-time PCR 检测细胞中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达水平。结果发现, 与 ox-LDL (100 mg/L) 刺激 0 h 相比, 分选后的阳性细胞被 ox-LDL 刺激 3 h 后 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.01$), 且阳性细胞中的上升比例高于阴性细胞 (图 4)。

2.4 高脂饲料喂养对小鼠主动脉中 DC 的影响

高脂饲料喂养 C57 小鼠 4 周、6 周、8 周后, 血清总胆固醇含量显著升高 ($P < 0.01$)。高脂饲料喂养 4

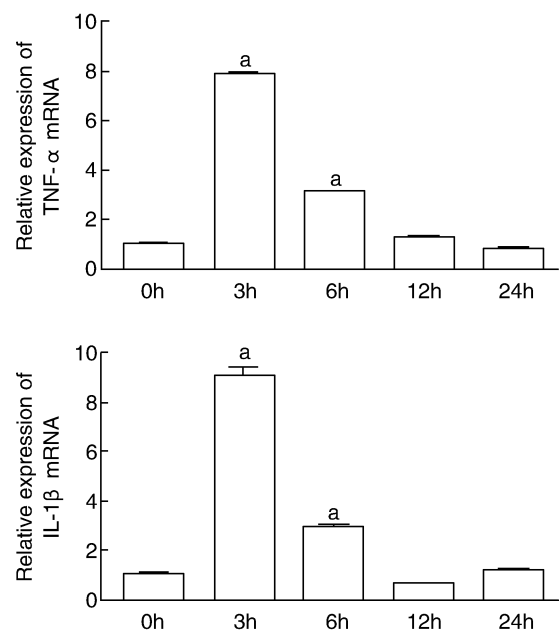


图 3. ox-LDL 刺激对 BMDC 炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达的影响 a 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 刺激 0 h 比较。

Figure 3. Effects of ox-LDL stimulation on TNF- α and IL-1 β mRNA in BMDC

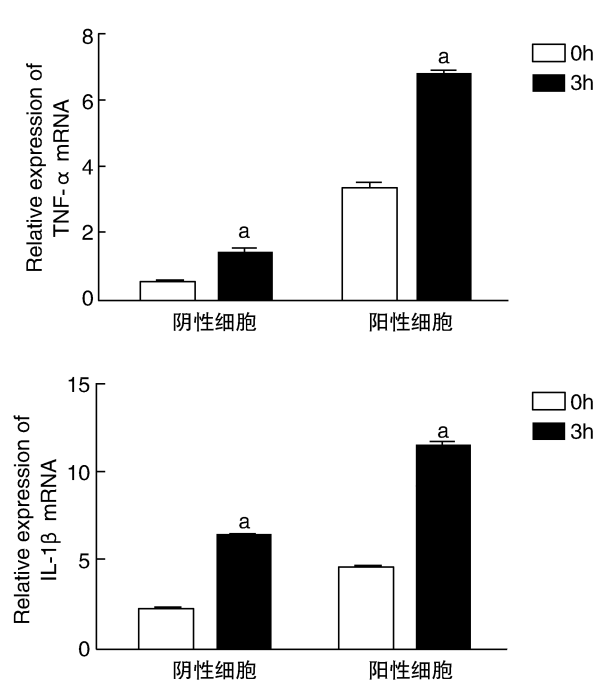


图 4. ox-LDL 刺激对分选的细胞中 TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达的影响 a 为 $P<0.01$, 与 0 h 比较。
Figure 4. Effects of ox-LDL stimulation on TNF-α and IL-1β mRNA expression in sorted cells

周、6 周后,小鼠主动脉中 DC 占白细胞的比例有所增加,但与正常对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$);高脂饲料喂养 6 周、8 周后,小鼠主动脉中 LOX-1^{high} DC 占 DC 的比例显著上升,与正常对照组相比具有显著性差异 ($P<0.01$;图 5)。

2.5 DC2.4 细胞对 Dil-ox-LDL 的吞噬作用

将不同浓度的 Dil-ox-LDL (5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 及 40 mg/L) 与 DC2.4 细胞共孵育 12 h,荧光显微镜观察发现,随着 Dil-ox-LDL 浓度的升高,细胞吞噬的脂质量也相应地增加(图 6)。

2.6 ox-LDL 对 DC2.4 细胞 LOX-1 表达的影响

将不同浓度的 ox-LDL (0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 及 40 mg/L) 与 DC2.4 细胞共孵育 24 h, Western blot 检测细胞中 LOX-1 的蛋白表达。结果发现,ox-LDL 能显著诱导 DC2.4 细胞 LOX-1 的表达 ($P<0.01$),且 LOX-1 的表达呈浓度依赖性增加(图 7)。

3 讨论

随着对 As 的深入研究,目前普遍认为 As 是一种慢性炎症反应性疾病,已有研究证实,固有免疫和适应性免疫介导的炎症反应在 As 损伤早期有重要作用。DC 是目前已知的功能最强的抗原提呈细

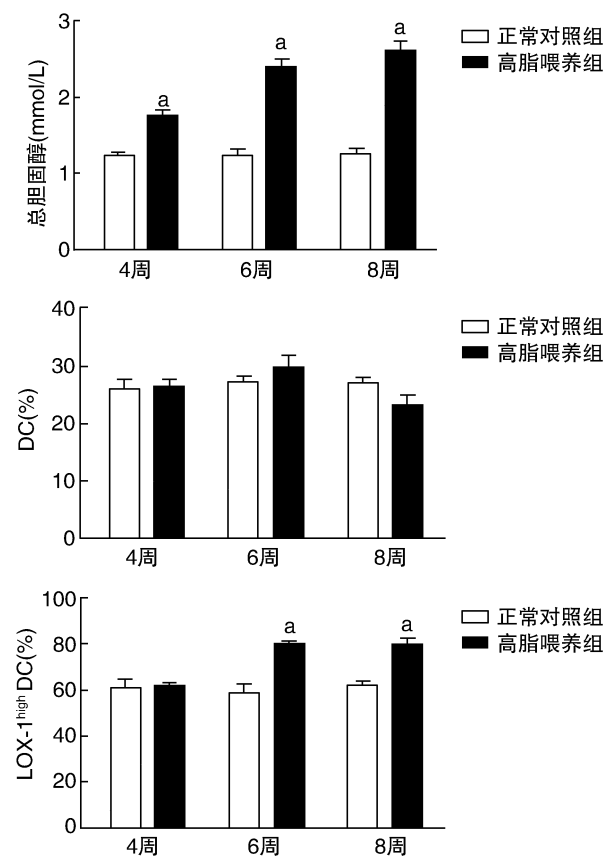


图 5. 小鼠血清总胆固醇含量及主动脉中 DC 和 LOX-1^{high} DC 的比例 a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较。
Figure 5. Serum total cholesterol levels and ratio of DC and LOX-1^{high} DC in the mouse aorta

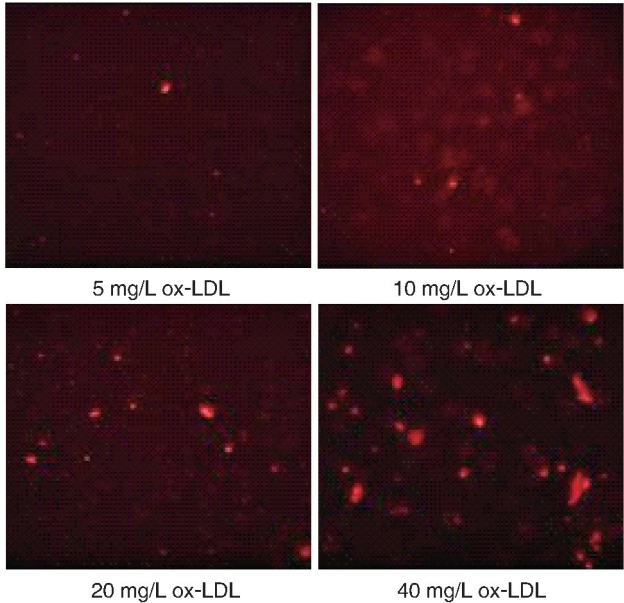


图 6. 荧光显微镜观察 DC2.4 细胞对 Dil-ox-LDL 的吞噬作用
Figure 6. The phagocytosis of Dil-ox-LDL by the DC2.4 cells was observed by fluorescence microscopy

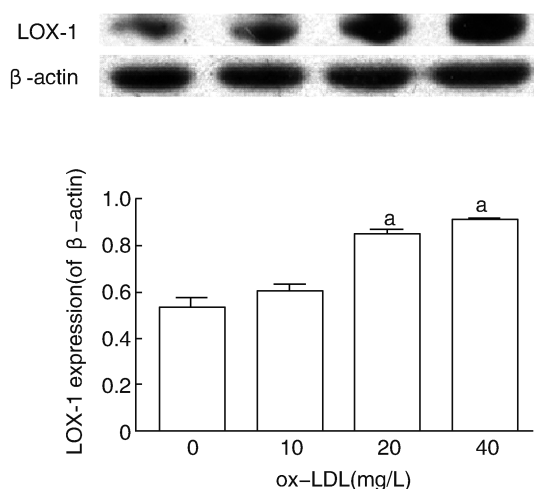


图 7. Western blot 检测 DC2.4 细胞中 LOX-1 的表达
为 $P < 0.01$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 7. The protein expression of LOX-1 induced by ox-LDL in the DC2.4 cells

胞,能特异性地激活初始 T 细胞。DC 不仅能对有害抗原引发免疫反应,而且还能维持免疫耐受。ox-LDL 是导致 As 的重要的脂蛋白,是在 As 慢性炎症中第一个被研究的,而 LOX-1 是 ox-LDL 的主要受体之一。

DC 作为免疫反应的始动者,在 As 的形成和发展中起重要的作用。在 ApoE 缺陷小鼠 As 模型中,As 斑块的内膜层及动脉内膜、外膜层均有 DC 聚集。这些 DC 通过毛刺状胞浆突起,使细胞外分子能进入 DC 的溶酶体,从而降解抗原,起提呈作用。另外,DC 的突起可绕泡沫细胞,并可插入泡沫细胞的胞浆中,提示 DC 参与了 As 免疫反应的形成。虽然越来越多的证据表明,DC 参与了 As 的形成,DC 在 As 斑块炎症反应中的功能仍未明确^[19-20]。实际上,DC 并非一类均一的细胞,而是由数种表型和功能各异的细胞亚群所组成。近年来,不同 DC 亚群的发现为 DC 功能的深入研究提供了新的认识。

本研究发现,ox-LDL 可以上调 DC 中清道夫受体 LOX-1 的蛋白表达水平;ox-LDL 刺激后部分 DC 亚群明显地高表达 LOX-1;将 ox-LDL 刺激后高表达 LOX-1 与低表达 LOX-1 的细胞进行分选,用 ox-LDL 诱导刺激,real-time PCR 检测炎症因子 mRNA 的表达水平,结果发现,高表达 LOX-1 的 DC 亚群其炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达水平明显高于低表达 LOX-1 的细胞,在由 ox-LDL 诱导的 As 炎症反应过程中,确实存在一种 DC 亚群,能够通过其高表达清道夫受体吞噬摄入脂质,引发炎症因子的表达,在 As 发生发展中起重要作用,进一步用高脂喂

养小鼠及 DC 株证明以上结论。正常情况下,绝大多数体内的 DC 处于非成熟状态,其表达低水平的共刺激分子和黏附分子,但具有极强的抗原内吞和加工处理能力。在摄取抗原或接受到某些刺激因素(主要是炎症信号)后,可以分化成熟,其 MHC 分子、共刺激分子、黏附分子的表达显著提高,体外激发 MLR 能力很强,但其抗原摄取加工能力大大降低。DC 在成熟的过程中,也同时发生迁移,由外周组织(获取抗原信号)通过淋巴管和/或血循环进入次级淋巴器官,然后激发 T 细胞,发生应答反应。

本研究用高脂饲料喂养 C57 小鼠,发现主动脉 LOX-1^{high} DC 占总 DC 的比例在高脂喂养 6 周及 8 周时有明显的增加,提示在 As 的进展中,DC 可能会聚集于主动脉损伤区,这与已知的研究报道也是相符合的^[5,21-22]。结合前面的研究结果,体外 ox-LDL 诱导的 DC 显示出更强烈的炎症反应,提示 LOX-1^{high} DC 可能会促进 As 损伤,在 As 的发展中有着更重要的作用。所以,如果能抑制 DC,更重要的是抑制 DC 分化为 LOX-1^{high} DC,将对 As 的防治有重要意义。

用 GM-CSF 和 IL-1 诱导培养高脂饲料喂养小鼠的 BMDC,在培养至第 6 天时,用流式细胞术检测发现,模型组 BMDC 表达 LOX-1 显著增加。本研究中,高脂模型小鼠的主动脉中 DC 数量有所增加,而且主动脉存在 LOX-1 表达不同的 DC 亚群,LOX-1^{high} DC 在总 DC 中的比例明显增加。用不同浓度的 Dil-ox-LDL 刺激 DC2.4 12 h,在荧光显微镜下观察,DC2.4 对 ox-LDL 有吞噬作用,而且随着 ox-LDL 浓度的升高,吞噬也随之增强,荧光也更明显,显示了浓度依赖性。为了检测 ox-LDL 是否会引起 DC2.4 表达 LOX-1 增多,采用不同浓度的 ox-LDL 刺激 DC2.4,用 Western blot 检测 LOX-1 的表达。结果显示,随着 ox-LDL 浓度的增加,DC2.4 表面 LOX-1 的表达也随之上调,与荧光检测结果相似,也显示了浓度依赖性,在浓度为 40 mg/L 时 LOX-1 的表达更为显著,而且在显微镜下观察细胞也未出现凋亡。

总之,本研究表明,部分 DC 亚群明显地高表达 LOX-1;高表达 LOX-1 的 DC 亚群其炎症因子的表达水平均明显高于低表达 LOX-1 的细胞;高脂模型小鼠随着胆固醇水平的升高,主动脉中 DC 及 LOX-1^{high} DC 比例明显增多;ox-LDL 可以诱导 DC2.4 表面受体 LOX-1 的表达上调,为 As 的防治提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Boudoulas KD, Triposciadis F, Geleris P, et al. Coronary

- atherosclerosis: Pathophysiologic basis for diagnosis and management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2016, 58 (6): 676-692.
- [2] Legein B, Temmerman L, Biessen EA, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3 847-869.
- [3] Edsfeldt A, Grufman H, Asciutto G. Circulating cytokines reflect the expression of pro-inflammatory cytokines in atherosclerotic plaques [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241 (2): 443-449.
- [4] IuV B, Karagodin VP, Orekhov AN. Dendritic cells and their role in immune reactions of atherosclerosis [J]. *Tsitologiia*, 2012, 54(11): 793-805.
- [5] Cartland SP, Jessup W. Dendritic cells in atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(33): 5 883-890.
- [6] Van Brussel I, Schrijvers DM, Van Vre EA, et al. Potential use of dendritic cells for anti-atherosclerotic therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(33): 5 873-882.
- [7] Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (4): 679-691.
- [8] Nickel T, Schmauss D, Hanssen H, et al. ox-LDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(2): 442-450.
- [9] DiPietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of ox-LDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 84: 1-7.
- [10] Yamamoto K, Kakino A, Takeshita H, et al. Oxidized LDL (ox-LDL) activates the angiotensin II type 1 receptor by binding to the lectin-like ox-LDL receptor [J]. *FASEB J*, 2015, 29(8): 3 342-356.
- [11] Qian Y, Zhang X, Zhou L, et al. Site-specific N-glycosylation identification of recombinant human lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) [J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(5-6): 399-409.
- [12] Huang D, Lu H, Liu H, et al. Losartan attenuates human monocyte-derived dendritic cell immune maturation via downregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60 (2): 133-139.
- [13] Chen M, Kakutani M, Naruko T, et al. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282 (1): 153-158.
- [14] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. LOX-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis [J]. *Cell Physiol Biochem*. 2016, 38(5): 1 851-859.
- [15] Eichhorn B, Muller G, Leuner A, et al. Impaired vascular function in small resistance arteries of LOX-1 overexpressing mice on high-fat diet [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(3): 493-502.
- [16] Lu J, Mitra S, Wang X, et al. Oxidative stress and lectin-like ox-LDL-receptor LOX-1 in atherogenesis and tumorigenesis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15 (8): 2 301-333.
- [17] Akhmedov A, Rozenberg I, Paneni F, et al. Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(40): 2 839-848.
- [18] 王宁, 孙荣国, 夏 笼, 等. LOX-1 经 ox-LDL 介导致动脉粥样硬化机制的研究进展 [J]. *老年医学杂志*, 2012, 32(18): 4 108-110.
- [19] van Dijk RA, Rijs K, Wezel A, et al. Systematic evaluation of the cellular innate Immune response during the process of human atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(6): e002860.
- [20] Lu X. Impact of macrophages in atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(18): 1 926-937.
- [21] 胡炎伟, 唐朝克, Jim Xiang. 树突状细胞在动脉粥样硬化发生发展中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(6): 476-478.
- [22] 邓 琼, 胡何节, 方征东, 等. 免疫原性和耐受性树突状细胞在粥样硬化动脉壁内的分布及意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(6): 567-573.
- (此文编辑 文玉珊)