

小鼠腹腔巨噬细胞清道夫受体活性的影响因素*

张 赛 楼定安 张 骅

(浙江医科大学病理学教研室, 杭州 310006)

Influencing Factors of Scavenger Receptor Activity of Mouse Peritoneal Macrophages

ZHANG Sai, LOU Ding-An and ZHANG Hua

(Department of Pathology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT Oil red O staining and analysis of cell image are used to quantitate and compare the uptake of oxidized low density lipoprotein (LDL) by mouse peritoneal macrophages under different cultural conditions. The results show that absence of LDL (1640 medium contains 5 percent BSA) and LDL preincubation enhances the uptake of LDL by 25 and 105 percent respectively, while high concentration of LDL (1640 medium contains 200 mg · L⁻¹ LDL) or 1 g · L⁻¹ BCG preincubation decrease the uptake by 46 percent and 26 percent. No predominant alteration occurs after pretreatment of 100 mg · L⁻¹ SiO₂. The results suggest that absence of LDL and LDL preincubation induce the scavenger receptor activity, while high concentration of LDL or BCG suppress those receptors.

KEY WORDS Mouse peritoneal macrophage; Scavenger receptor activity; Influencing factors

摘要 本实验采用油红O染色和细胞图像分析法定量研究了NIH小鼠腹腔巨噬细胞在不同培养环境下对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, LDL)的摄取。结果显示,预先以含5%的牛血清白蛋白的RPMI 1640无脂培养或50 mg · L⁻¹ LDL处理后分别使巨噬细胞摄取LDL增加了

g · L⁻¹的卡介苗处理后分别使LDL的摄取量下降了46%和26%。100 mg · L⁻¹的SiO₂处理后的结果与对照组无显著性差异。表明低脂环境和LDL对清道夫受体活性的诱导作用,高LDL环境和卡介苗抑制清道夫受体活性。

关键词 小鼠腹腔巨噬细胞; 清道夫受体活性; 影响因素

富含脂质的巨噬细胞(泡沫细胞)在动脉壁内膜沉积,是动脉粥样硬化的早期病变。细胞内脂质沉积的原因和机制尚未彻底阐明,大多认为与巨噬细胞经清道夫受体途径摄取LDL有关^[1]。本实验用细胞图像分析法研究培养的小鼠腹腔巨噬细胞在各种条件下对LDL的摄取活性。

1 材料和方法

1.1 巨噬细胞的收集和培养

健康NIH小鼠,雌性,20 g左右,由本校动物科提供。按Goldstein法收集未经刺激的腹腔巨噬细胞,培养于RPMI 1640(日本株式会社)培养液中。贴壁后原培养液中加入15%小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)继续培养。24 h后,光镜观察细胞呈星形。

1.2 分组培养及诱导条件

实验分6组:①对照组,含15%小牛血清的RPMI 1640培养液继续培养12 h;②低脂组,含5%牛血清白蛋白(中国科学院上海生物化学研究所东风生物化学技术公司)的RPMI 1640培养液培养12 h;③高LDL组,含200 mg · L⁻¹ LDL(本室制备)的RPMI 1640培养液培养12 h;④OLDL组,含50 mg · L⁻¹ OLDL(本室制备)^[2]的RPMI 1640培养液培养12 h;⑤SiO₂组,含100 mg · L⁻¹ SiO₂(标准石英粉尘由中国预防医学科学院卫生研究所提供)的RPMI 1640培养液培养4 h;⑥卡介苗组,含1 g · L⁻¹卡介苗(上海生物化学制品研究所)的RPMI 1640培养液培养4 h。

分别在对照组、低脂组、高LDL组、OLDL组、SiO₂组、卡介苗组随机抽取60、47、45、55、45、47个细

*国家自然科学基金及浙江省自然科学基金资助项目
25%和105%;而含200 mg · L⁻¹ LDL的高脂培养或1

分别在对照组、低脂组、高 LDL 组、OLDL 组、 SiO_2 组、卡介苗组随机抽取 60、47、45、55、45、47 个细胞按下述方法作细胞内脂质定量。另取一批细胞按上述各组处理后再在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL 的 RPMI 1640 培养液中培养 12 h, 然后再次胞内脂质定量。前后所得两组脂质定量结果相减, 所得即为该组条件下巨噬细胞对 OLDL 摄取能力的相对大小。

1.3 油红 O 染色及图像分析法脂质定量

各组细胞经油红 O 染色^[2]以示细胞内脂质, 略去苏木精染色。光镜观察后用 MIPS-I 型多功能图像分析仪^[3]测定油红 O 染色阳性反应产物光密度积分。所得数据经 *t* 检验确定其统计学意义。

2 结果

2.1 形态观察

光镜下细胞透亮、核未染。胞内脂质呈红色颗粒状。对照组只在胞质内发现少数细小颗粒, OLDL 组胞质内脂质融合成大滴, 占据胞内大部空间, 把核挤向一侧(Figure)。

2.2 测定结果

Table. Influence of cultural condition on uptake of OLDL by mouse peritoneal macrophages.

Groups	cultural condition	n	IOD ^① ($\bar{x} \pm s$)	AR ^② (%)
control	15% bovineserum pretreatment	60	1.5 ± 0.5	0
LCL ^③	5% BSA ^④ pretreatment	47	$1.9 \pm 0.5^*$	26.7
HCLDL ^⑤	$200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LDL pretreatment	45	$0.8 \pm 1.3^*$	-46.7
OLDL	$50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OLDL preincubation	55	$2.1 \pm 1.0^*$	40
SiO_2	$100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SiO_2 pretreatment	45	1.6 ± 0.8	6.7
BCG ^⑥	$1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BCG pretreatment	47	$1.1 \pm 0.8^*$	-26.7

① IOD, integration of optical density indicating relative amount of intracellular lipids; ② AR, alternating rate, $\text{AR} = (\text{IOD of experimental group} - \text{IOD of control group}) / (\text{IOD of control group}) \times 100\%$; ③ LCL, low concentration of lipids; ④ BSA, bovine serum albumin; ⑤ HCLDL, high concentration of LDL; ⑥ BCG, Bacille Calmette-Guerin. *, $P < 0.01$ compared with control group.

3 讨论

氧化型低密度脂蛋白可以在人体内自发产生^[5,6], 并能经清道夫受体途径大量进入巨噬细胞形成泡沫细胞, 这是动脉粥样硬化的重要危险因素^[1,7]。OLDL 摄入胞内后降解, 以胆固醇酯的形式积贮在胞浆中, 经油红 O 染色, 以图像分析仪测定光密度积分可得到相对定量的结果。Goldstein 报道, 清道夫受体无下调机制, 其活性不受细胞内胆固醇含量影响^[8]。因此本实



Figure. Products of oil red O staining indicating intracellular lipids. A, control group; B, OLDL group.

各组胞内油红 O 染色阳性反应产物的光密度积分值见 Table, 与对照组相比较, 除 SiO_2 组外, 其他组胞内平均光密度积分值与对照组相比较, 差异均有极显著性意义 ($P < 0.01$)。其中低脂组和 OLDL 组升高, 而高 LDL 组和卡介苗组降低。表明培养的腹腔巨噬细胞摄取脂质质量与培养条件有关。

验中表现出来的各实验组与对照组之间对 OLDL 摄取能力的极显著性差异, 只能归咎于低脂、高 LDL、OLDL、卡介苗、 SiO_2 等外界培养因素对清道夫受体活性的影响。

本实验提示, 低脂环境能诱导清道夫受体活性而高 LDL 环境则抑制其活性, OLDL 能诱导巨噬细胞对 OLDL 的摄取, 可能与 OLDL 被清道夫受体识别摄入细胞的过程本身某种自我循环加强的因素有关。其机制尚待进一步研究。

卡介苗是巨噬细胞免疫功能的激活剂。曾有 Imber 等^[9]报道皮内注射卡介苗不能激活鼠腹腔巨噬细胞清道夫受体活性。本实验提示卡介苗对培养的巨噬细胞清道夫受体活性有抑制作用。看来巨噬细胞经清道夫受体摄取 OLDL 似乎不属于巨噬细胞免疫吞噬的范畴。

SiO₂ 损伤细胞膜结构,但低浓度 SiO₂ 短时间作用仅导致轻微膜损伤而不会引起细胞死亡。本实验提示轻微膜损伤不影响巨噬细胞清道夫受体活性水平。

细胞图像分析法是结合光学、电学、计算机技术,借助脂质特异染色来进行胞内脂质定量的。与生物化学方法相比,该法把脂质定位、相对定量与细胞形态结构紧密结合起来,更直观、更准确、更方便,所得结果也更能说明问题。笔者在实验中体会到本法的关键还在于染色和制片。染色深浅、片子厚薄、空白本底、细胞本底在各实验组之间要保持一致,仪器在脂质定量过程中也要作进一步校正。

参考文献

- 1 Carew TE. Role of biologically modified low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1989, 64: ~18G~22G.
- 2 Lenz ML, Houghes H, Mitchell JR, et al. Lipid hydroperoxy and hydroxy derivatives in copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1990, 31: 1 043~49.
- 3 Kruth HS. Filipin-positive, oil red O-negative particles in atherosclerotic lesions induced by cholesterol feeding. *Lab Invest*, 1984, 50 (1): 87~93.
- 4 周水云,章锁江. 细胞核形态和 DNA 指数(倍体)分析在大肠癌分级诊断中的应用. *浙江医科大学学报*, 1994, 23 (3): 98~101.
- 5 Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, 1989, 84: 1 086~95.
- 6 Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 1 372~76.
- 7 Leake DS. Oxidized low density lipoproteins and atherogenesis. *Br Heart J*, 1993, 69: 476~478.
- 8 Bates SR, Murphy PL, Feng ZC, et al. Very low density lipoproteins promote triglyceride accumulation in macrophages. *Arteriosclerosis*, 1984, 4 (2): 103~114.
- 9 Imber MJ, Pizzo SV, Johnson WJ, et al. Selective diminution of the binding of mannose by murine macrophages in the late stages of activation. *J Biol Chem*, 1982, 257: 5 135.

(本文 1994-12-06 收到)