

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0556-03

氧化型脂蛋白(a)对人脐静脉内皮细胞 表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的影响

朱铁兵, 杨志健, 王连生, 曹克将, 马文珠

(南京医科大学附属第一医院心内科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 细胞生物学; 氧化型脂蛋白(a)对内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的影响; 细胞酶联免疫; 氧化型脂蛋白(a); 巨噬细胞炎性蛋白 1 α ; 人脐静脉内皮细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨氧化型脂蛋白(a)能否诱导人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 以阐明其在动脉粥样硬化发生中的作用。在内皮细胞培养基中分别加入天然脂蛋白(a)及不同浓度的氧化型脂蛋白(a), 采用细胞酶联免疫检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达, 用一步法提取 RNA, 逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达, 并用单核细胞粘附率试验检测单核细胞粘附。结果发现, 氧化型脂蛋白(a)呈剂量依赖性增加内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达, 5、10 及 20 nmol/L 氧化型脂蛋白(a)分别使巨噬细胞炎性蛋白 1 α 表达明显增加到 121% \pm 8%、163% \pm 13% 及 241% \pm 28%。氧化型脂蛋白(a)促使单核细胞粘附率增加, 并且粘附率与氧化型脂蛋白(a)浓度呈正相关。且氧化型脂蛋白(a)能促使巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达明显增加。结果提示, 氧化型脂蛋白(a)能诱导内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 表达增强, 这可能与脂蛋白(a)致动脉粥样硬化作用机制有关。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Oxidized Lipoprotein(a) Enhanced the Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZHU Tie-Bing, YANG Zhi-Jian, WANG Lian-Sheng, CAO Ke-Jiang, and MA Wen-Zhu

(The Cardiology Department of the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Oxidized Lipoprotein(a); Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Atherosclerosis; Monocyte Adhesion; Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of oxidized lipoprotein (a) [ox-Lp(a)] on the expression of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in cultured human umbilical endothelial cells (hUVEC). **Methods** Native Lp(a) [nr-Lp(a)] and different concentrations of ox-Lp(a) were incubated with hUVEC. Cell ELISA was used to detect the expression of MIP-1 α .

Monocyte adhesion assay was used to detect the Monocyte adhesion. MIP-1 α mRNA expression were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Ox-Lp(a) dramatically enhanced the levels of MIP-1 α in a dose dependent manner, increasing MIP-1 α expression in hUVEC by 121% \pm 8% at 5 nmol/L, 163% \pm 13% at 10 nmol/L and 241% \pm 28% at 20 nmol/L. In addition, 10 nmol/L of ox-Lp(a) for 2 h could significantly increase the amount of monocyte adherence to endothelial cells. Moreover, RT-PCR analysis demonstrated that the amount of MIP-1 α mRNA increased after treatment with ox-Lp(a) for 24 h. **Conclusion** Ox-Lp(a) can induce MIP-1 α expression in hUVEC, which may thereby influence the pathogenesis of atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生最早期的显著标志是循环中的单核细胞粘附于内皮细胞, 而巨噬细胞炎性蛋白 1 是一种主要对巨噬细胞和 T 淋巴细胞具有趋化作用的趋化因子^[1]。脂蛋白(a)已被证明是 As 的独立危险因素, 其在 As 的发病过程中可能发挥重要的作用, 但其作用机制尚不明确。有研究发现脂蛋白(a)的血管内膜下易于被氧化^[2]。

本研究探讨氧化型脂蛋白(a) [oxidized lipoprotein(a), ox-Lp(a)] 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical endothelial cell, hUVEC)表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α) 蛋白和 mRNA 的影响, 旨在阐明氧化型脂蛋白(a)参与 As 的早期发病机制。

1 材料和方法

1.1 人外周血脂蛋白(a)的分离和氧化

筛选血浆脂蛋白(a)浓度大于 900 mg/L 的正常个体, 用不连续密度梯度离心法(Backman L8-80M, VAC 50 rotors)从外周血中分离脂蛋白(a), 采用

[收稿日期] 2003-10-06

[修回日期] 2004-05-10

[作者简介] 朱铁兵, 副教授, 主要研究方向为脂质与冠心病。杨志健, 副教授, 主要研究方向为干细胞治疗缺血性心脏病。王连生, 副教授, 主要研究方向为细胞凋亡与增殖。

Sepharose 6B 层析柱纯化脂蛋白(a)。蛋白含量用 Bradford 方法检测。加入终浓度为 10 μ mol/L CuSO₄ 37℃温育 24 h 使脂蛋白(a)氧化。在 0.01 mol/L PBS 溶液中透析 24 h 后测定丙二醛浓度作为硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)的浓度。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养与处理

人脐静脉内皮细胞细胞系(V304, 武汉大学中国典型物保藏中心提供), 10% 小牛血清-DME 培养基(Gibco)培养, 0.1% 胰蛋白酶消化传代, 待细胞生长至汇合状态时, 换用 D8900 培养基。然后随机分成实验组与对照组, 实验组加入终浓度为 5、10 及 20 nmol/L ox-Lp(a)作用 24 h。不加任何刺激因素作为空白对照组。

1.3 细胞酶联免疫检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达

参考 Pigott 等^[3]的方法, 并加以改良。培养皿弃液、固定、清洗, 小牛血清阻断 2 h 后, 加入鼠抗人巨噬细胞炎性蛋白 1 α 抗体(SZ-51, 苏州医学院血检与止血实验室), 37℃作用 2 h, 清洗 4~6 次后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG(Sigma)。加入过氧化物酶底物邻苯二胺, 显色后加 H₂SO₄ 终止反应。用 Bio-Rad 450 酶标仪测量 492 nm 波长时的光吸收值。将在不加任何处理因素的细胞培养孔中所测得的 A 值定义为 100%, 加入处理因素各孔所测得的 A 值记录为增加的百分率。

1.4 单核细胞趋化试验

按 Fogelman 等^[4]的方法分离人外周血单核细胞, 汇合的内皮细胞分别加入浓度为 5、10 及 20 nmol/L 氧化型脂蛋白(a)作用 2 h 后弃液, 清洗后每孔按 10⁸/L 加入单核细胞, 37℃振荡培养 25 min, 含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 冷 PBS 清洗, 以除去未粘附的单核细胞。以空白对照组单核细胞粘附率作为 100%。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达

用一步法提取各组细胞总 RNA。取每组总 RNA 各 1 μ g, 逆转录合成 cDNA。取该产物 2 μ L 进行 PCR 循环(95℃变性 1 min, 58℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共 30 个循环, 末次 72℃延伸 10 min)。PCR 反应体系总体积为 50 μ L, 包括 1 \times PCR buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 引物各 20 pmol/L, Taq 酶 2u。所用 MIP-1 α 引物序列为: 正链 5'-CTGCCCTTGCTGTCTCCTCTG-3', 负链 5'-CTGCCGCTTCGCTTGGTTA-3', PCR 扩增产物长度为 197 bp。分析内参 GAPDH 引物序列为: 正链 5'-GGGGAGGCAAAAGGCTCATCTTCT-3', 负链 5'-

GAGGGGCCATCCACAGTCCTCT-3', 扩增产物长度为 235 bp。反应后取终产物 10 μ L 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分析, 紫外线照像, 用 SQ9636 扫描系统及图像分析系统测出目的基因及 GAPDH 的积分吸光度(A)值, 并计算二者的比值, 以此比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理

多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 脂质过氧化测定

天然脂蛋白(a) [native-Lp(a), nLp(a)] 的 TBARS 值为 5.32 \pm 3.43 μ mol/g; 而氧化型脂蛋白(a)的 TBARS 值为 44.64 \pm 3.21 μ mol/g, 明显高于天然脂蛋白(a)。

2.2 不同浓度氧化型脂蛋白(a)对细胞粘附的影响

以空白对照组单核细胞粘附为 100%, 加入天然脂蛋白(a) 10 nmol/L 及氧化型脂蛋白(a)的浓度分别为 5、10 及 20 nmol/L 时, 单核细胞粘附率分别为 105% \pm 7% 及 116.1% \pm 6.4%、122.6% \pm 0.4% 和 129.8% \pm 9.8%, 氧化型脂蛋白(a)组与空白对照比较差异显著(*P* < 0.05)。

2.3 不同脂蛋白对巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达的影响

5、10 及 20 nmol/L 氧化型脂蛋白(a)分别使巨噬细胞炎性蛋白 1 α 表达增加, 天然脂蛋白(a)组表达不明显(表 1, Table 1)。

表 1. 不同脂蛋白对巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达的影响
Table 1. Effects of different lipoproteins on the expression of MIP-1 α

分组	粘附率
空白对照组	100%
nLp(a) 10 nmol/L	105% \pm 7%
ox-Lp(a) 5 nmol/L	121% \pm 8%
10 nmol/L	163% \pm 13%
20 nmol/L	241% \pm 28%

2.4 不同脂蛋白对巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达的影响

天然脂蛋白(a)组巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 的表达增加不明显, 仅为对照组的 1.28 倍。当内皮细胞暴露于 5、10 及 20 nmol/L 氧化型脂蛋白(a) 24

h 后, 巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达明显增加, 分别为对照组的 2.01、3.31 及 3.81 倍。PCR 产物电泳结果见图 1(Figure 1)。

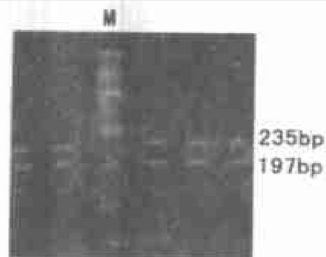


图 1. 聚合酶链反应产物电泳结果 M 为 PCR 标准品, 由上向下分别为 501、404、331、242、190、163、147 及 110 bp。

Figure 1. Electrophoresis analysis of PCR products

3 讨论

脂蛋白(a)被认为是 As 的独立危险因素^[5], 其血中水平与冠状动脉病变程度关系密切^[6], 但其致 As 的机理尚不明。已逐渐认识到脂蛋白(a)易于被氧化, 并且在人类血清及 As 组织中检测到氧化型脂蛋白(a)的存在^[7], 因此推测氧化型脂蛋白(a)具有强烈的致 As 作用^[8,9]。

研究证实 As 发生最早期的显著标志是循环中的单核细胞和 T 淋巴细胞迁入内皮下间隙, 继而中膜平滑肌细胞迁入内膜并增殖, 而巨噬细胞炎性蛋白 1 是一种主要对巨噬细胞和 T 淋巴细胞具是早期表达于内皮细胞上并介导单核粘附的主要分子。此外, 巨噬细胞炎性蛋白 1 还能增加超氧化物生成, 颗粒物质的分泌以及血小板活化因子、白三烯的合成与释放而引起局部的炎症反应。大量实验已证实巨噬细胞炎性蛋白 1 的表达在 As 与炎症反应中起着重要作用。敲除鼠单核细胞趋化因子 1(monocyte chemottractic protein 1, MCP-1)或其受体的基因产生 MCP-1 不能表达的高脂血症鼠模型, 发现即使该鼠的动脉硬化的病灶减少, 但其动脉仍有单核巨噬细胞的浸润及泡沫细胞的形成^[10]。我们的实验结果表明除了 MCP-1 外, 还有其他的趋化因子同样参与单核细胞的招集及泡沫细胞的形成, 即 MCP-1 α 参与这一病理的可能性。Hayes 等^[11]证实 As 病灶内

有 MCP-1 α mRNA 的表达。

本研究证实氧化型脂蛋白(a)在较低浓度时能明显增加内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 的表达, 并且其作用呈剂量依赖性。更重要的是, 本研究发现氧化型脂蛋白(a)能剂量依赖地促使单核细胞粘附率增加, 进一步证实氧化型脂蛋白(a)所诱导表达的巨噬细胞炎性蛋白 1 具有粘附分子的功能。这些结果提示氧化型脂蛋白(a)不仅可通过增强巨噬细胞炎性蛋白 1 的表达调节单核细胞与内皮细胞之间的粘附, 而且能通过巨噬细胞炎性蛋白 1 的作用增强反应部位的炎症发生。因此, 本研究的结果支持氧化型脂蛋白(a)导致动脉粥样斑块炎症反应的假设, 氧化型脂蛋白(a)可能与 As 的发生及炎症所致的动脉粥样斑块的不稳定性均有关。

[参考文献]

- [1] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. Adefinition of initial fatty streak and intermediate lesion of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1994, **14**: 840-856
- [2] Naruszewicz M, Selinger E, Davignon J. Oxidative modification of lipoprotein (a) and the effect of beta-carotene. *Metabolism*. 1992, **41**: 1 215-224
- [3] Pigott R, Neodham LA, Edwards RM, Walker C, Power C, et al. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, 1991, **147**: 130-135
- [4] Fogelman AM, Elahi F, Sykes K, Vanlenten BJ, Territo MC, Berliner JA, et al. Modification of the recalde method for the isolation of human monocytes. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 243
- [5] Ishibashi S. Lipoprotein(a) and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1-2
- [6] 姜德谦, 文丹, 方臻飞, 祁述善. 脂蛋白(a)水平与冠状动脉病变严重程度的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **2** (1): 58-60
- [7] Yamada S, Morishita R, Nakamura S, Ogihara T, Kusumi Y, Sakurai I, et al. Development of antibody against epitope of lipoprotein(a) modified by oxidation: evaluation of new enzyme-linked immunosorbent assay for oxidized lipoprotein (a). *Circulation (Online)*, 2000, **102** (14): 1 639-644
- [8] 林春榕, 洪嘉玲, 汪炳华, 吴学东, 狭勇. 天然及氧化型脂蛋白(a)与巨噬细胞表面结合. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 30-33
- [9] 张春妮, 庄一义, 吉维民, 刘小转, 强红娟. 氧化型脂蛋白(a)对鼠腹腔巨噬细胞增殖的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 305-307
- [10] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot LH, Young SGm, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 773-778
- [11] Hayes IM, Nicola JJ, Sewah T, Towers S, Swith G, Paterson JR, Eamshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors cc chemokines. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1998, **18**: 397-403

(此文编辑 文玉珊)