

• 论 著 •

轻度修饰低密度脂蛋白对小鼠肝脾中
清道夫受体 mRNA 表达的影响

姜传仓 陈 兵 范乐明 邵莉君 蔡海江

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

Effects of Mildly Modified Low Density Lipoprotein on the Expression of Scavenger Receptor mRNA in Mouse Liver and Spleen

JIANG Chuan-Cang, CHEN Bing, FAN Le-Ming, SHAO Li-Jun and CAI Hai-Jiang

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Compared with giving native low density lipoprotein (LDL) intravenously, scavenger receptor (SR) mRNA levels in liver and spleen of the mice given mildly modified LDL (mm-LDL) intravenously increased 2.0 times ($P < 0.05$) and 5.9 times ($P < 0.01$), respectively; and macrophage colony-stimulating factor (MCSF) mRNA levels also increased 3.2 times ($P < 0.01$) and 3.0 times ($P < 0.01$) respectively. Giving MCSF intravenously to mice increased SR mRNA levels in liver and spleen by 3.6 times ($P < 0.05$) and 3.0 times ($P < 0.01$), respectively, and showed some dose-effect relationship. It suggests that giving mm-LDL intravenously might directly induce the expression of SR mRNA in liver and spleen, or indirectly stimulate the expression of MCSF, which in turn induces SR mRNA expression. The significance of these phenomena for local atherogenesis is discussed.

KEY WORDS Mildly modified low density lipoprotein; Macrophage colony-stimulating factor; Scavenger receptor; mRNA expression

摘要 小鼠静脉注射轻度修饰低密度脂蛋白 (mildly modified low density lipoprotein, mm-LDL)

可使其肝、脾清道夫受体 (scavenger receptor, SR) mRNA 水平分别比静脉注射天然 LDL 小鼠增加 2.0 倍 ($P < 0.05$) 及 5.9 倍 ($P < 0.01$); 巨噬细胞克隆刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, MCSF) mRNA 水平亦分别增加 3.2 倍 ($P < 0.01$) 和 3.0 倍 ($P < 0.01$)。而静脉注射 MCSF 时又可使其肝脾 SR mRNA 分别增高 3.6 倍 ($P < 0.05$) 及 3.0 倍 ($P < 0.01$), 并有一定的量效关系。首次报道了 mm-LDL 静脉注射可直接诱导肝脾中 SR mRNA 表达, 或间接通过刺激 MCSF 表达, 进而诱导 SR mRNA 表达, 并讨论了此现象在全身及局部动脉粥样硬化形成中的意义。

关键词 轻度修饰低密度脂蛋白; 巨噬细胞克隆刺激因子; 清道夫受体; mRNA 表达

轻度修饰低密度脂蛋白 (mildly modified low density lipoprotein, mm-LDL) 对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的作用已引起众多学者的注意^[1~3], 发现其除了有蓄积 LDL 作用外还有很强的生物学活性, 可在培养细胞及动物体内诱导 MCSF 等多种生物活性物质的表达^[4,5]。本实验室在离体实验曾发现 mm-LDL 与 MCSF 在促进细胞脂质蓄积、泡沫细胞形成方面有协同作用^[6]; 还发现氧化 LDL 有刺激单核巨噬细胞 SR 活性的作用 (待发表资料)。本文拟在小鼠静脉注射 mm-LDL 后, 进一步从整体观察其肝脾中有无 SR mRNA 表达增强, 并分析此作用与 MCSF 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

异硫氰酸胍和焦碳酸二乙酯系 Sigma 公司产品, sarcosyl 及 SDS 为进口分装产品, [α -P] dCTP

由北京亚辉生物医学工程公司提供, Prime- α Gene Labeling System 购自 Promega 公司, Hybond 尼龙膜购自 Amersham 公司。MCSF 由南京大学秦俊川教授提供, 其活性为 $2 \times 10^3 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$, 小鼠 I 型 SR cDNA 由 Kreiger 博士惠赠, 人 MCSF cDNA 由 Chiron 公司赠送。其余试剂均为国产分析纯。

L8-8 OM 超速离心机及 Ti80 转头系 Beckman 公司产品, CS-930 双波长色谱扫描仪为 Shimadzu 公司产品。

1.2 LDL 制备

天然 LDL (native LDL, NLDL) 制备用我室常规方法, 即分离新鲜健康人空腹血浆, EDTA 抗凝, 密度梯度超速离心分离 LDL ($1.019 < d < 1.063$), 用充 N_2 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 充分透析, 以防氧化。mm-LDL 的制备为 Fe^{2+} 轻度氧化法^[7], 将 NLDL 置透析液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4$, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, pH 7.2~8.0) 中于 4°C 透析 48~72 h, mm-LDL 相对于 NLDL 的琼脂糖凝胶电泳迁移率为 1.7, 硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 值 $< 5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白。

1.3 实验程序

BALB/C 小鼠购自江苏省实验动物中心, 12 周龄。分两次实验。第一次, 12 只小鼠随机分成 2 组, 每组 6 只, 分别于尾静脉注射 NLDL 或 mm-LDL ($60 \mu\text{g}$ LDL 蛋白/鼠), 5 h 后取肝及脾置液氮冻存备用。第二次, 15 只小鼠随机分成 3 组, 每组 5 只, 第 1、2 组分别于尾静脉注射 MCSF 每日每只鼠 $100 \mu\text{g}$ (低浓度) 及 $400 \mu\text{g}$ (高浓度), 第 3 组注射生理盐水, 连续给药 7 天后取肝、脾置液氮冻存备用。

1.4 斑点印迹杂交

鼠肝及脾总 RNA 的制备参照酸性异硫氰酸胍一酚一氯仿一步法^[8], 所得 RNA 经紫外定量、甲醛变性后点样到尼龙膜上。随机引物法标记 MCSF 探针, SR cDNA 探针 $\alpha^{32}\text{P}$ 标记的 dCTP 掺入率 $> 50\%$ 。磷酸盐杂交系统^[9]杂交, 放射自显影后用 CS-930 扫描仪扫描定量。

1.5 统计方法

两样本均数比较的 t 检验法

2 结果

实验 1 结果 (Table 1, Figure) 表明, 静脉注射 mm-LDL 的小鼠肝、脾 SR mRNA 水平明显高于静脉注射 NLDL 小鼠, 分别为后者的 2.0 倍 ($P < 0.05$) 和 5.9 倍 ($P < 0.01$);

肝脾中 MCSF mRNA 水平亦显著增高, 分别为注射 NLDL 小鼠的 3.2 倍 ($P < 0.01$) 和 3.0 倍 ($P < 0.01$); 此外, 两组中脾 MCSF mRNA 明显高于肝脏, 为后者 8~10 倍 (数据略)。

Table 1. Effects of mm-LDL on the levels of SR mRNA in liver and spleen of mice (the levels of NLDL group are 100% ($\bar{x} \pm s$)).

| Group | SR mRNA (%) | | MCSF mRNA | |
|--------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | liver | spleen | liver | spleen |
| NLDL | 100 ± 45 (3) | 100 ± 25 (6) | 100 ± 33 (6) | 100 ± 24 (6) |
| mm-LDL | $201 \pm 13^*$ (3) | $591 \pm 102^{**}$ (6) | $321 \pm 40^{**}$ (6) | $302 \pm 48^{**}$ (6) |

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with NLDL group; (n) number of samples.

实验 I 结果 (Table 2, Figure) 显示, 静脉注射低浓度 MCSF 的小鼠其肝 SR mRNA 水平为对照组的 3.6 倍 ($P < 0.05$), 注射高浓度 MCSF 组 SR mRNA 水平分别为对照组的 3.0 倍 ($P < 0.01$) 和 3.4 倍 ($P < 0.01$)。

Table 2. Effects of MCSF on SR mRNA levels in liver and spleen of mice (the levels of control group are 100% ($\bar{x} \pm s$)).

| Group | SR mRNA in liver | SR mRNA in spleen |
|---|---------------------------|--------------------------|
| control | 100 ± 36 (5) | 100 ± 28 (5) |
| MCSF ($100 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) | $361 \pm 104^*$ (5) | $297 \pm 24^{**}$ (4) |
| MCSF ($400 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) | $453 \pm 112^{**}$ (5) | $338 \pm 46^{**}$ (5) |

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control; (n) number of samples.

3 讨论

从上述结果可以看出, 静脉注射 mm-LDL 可使小鼠肝及脾中的 SR mRNA 及 MCSF mRNA 均较静脉注射 NLDL 增加约 2~6 倍, 差别显著。mm-LDL 静脉注射使小鼠血浆 MCSF 活性增高已见报道^[5], 我们首次报道静脉注射 mm-LDL 可使小鼠肝脾中 SR mRNA 明显增高。

SR mRNA 表达增高的机理可能是 mm-LDL 的生物活性直接刺激了大量存在于肝、脾等处的单核巨噬细胞系统; 但由于 mm-

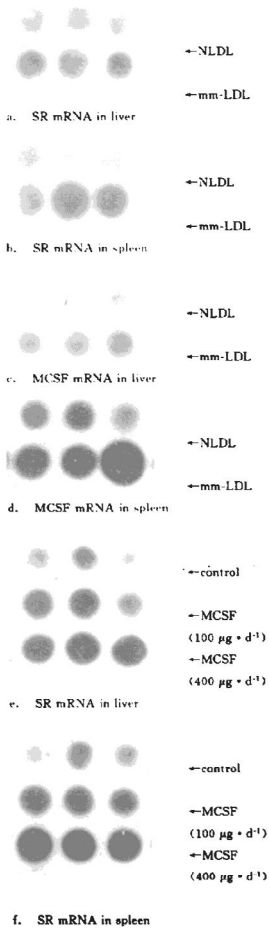


Figure. Effects of giving mm-LDL or MCSF intravenously on the expressions of SR mRNA MCSF mRNA in liver and spleen of mice.

LDL 同时又刺激了 MCSF mRNA 表达增加,而 Shimano 等^[10]及 Ishibashi 等^[11]均报道过 MCSF 可诱导 LDL 受体及 SR 活性增加;我们的研究进一步证明小鼠静脉注射 MCSF 时在肝、脾组织中 SR mRNA 表达增高,且有一定的量效关系;因此,SR mRNA 表达增高的机理也有可能是先通过 mm-LDL 对 MCSF 的刺激作用,再由后者对 SR 起作用;或者两种机理均存在。

氧化 LDL 在血液中的存在目前尚有争议^[3]。一般认为由于血浆中有大量抗氧化系统,且组织中大量的单核巨噬细胞能迅速摄取及降解异种抗原—氧化 LDL,所以血浆中即使存在氧化 LDL 或 mm-LDL,其量也是较小的。我们的研究证明 mm-LDL 一旦较大量出现在血浆中就能直接或间接刺激 MCSF 及 SR 基因表达,促使单核巨噬细胞系统增殖,SR 数目增加及活性加强。MCSF 表达增加尚可能诱导 LDL 受体活性增加^[10],从而使血液中的氧化 LDL 或 mm-LDL 得到有效清除,使其含量降低。这一结果无论是从消除异物抗原或降低血脂角度考虑,都是有保护意义的。Motoyoshi^[12]发现在用 MCSF 治疗慢性中性粒细胞减少症患者时伴有血胆固醇下降可作为进一步的佐证。

此反应如果发生在动脉壁局部,对于 As 病灶的影响又将如何呢?Rajavashisth 等^[4]曾报道 mm-LDL 能诱导内皮细胞表达 MCSF。我们在用氧化 LDL 孵育鼠或人单核巨噬细胞促进其形成泡沫细胞的过程中,发现在培养液中添加 MCSF 能增加细胞中脂质蓄积及促进泡沫细胞早日形成,因而认为 MCSF 对 As 的发生有促进作用^[6]。继而又发现氧化 LDL 能使起源于人单核细胞系 (THP 1) 的巨噬细胞在转化为泡沫细胞过程中,其 SR 功能活性逐渐增加,Scatchard 作图证明系 SR 数目增加所致,与本研究发现的 mm-LDL 使 SR 基因 mRNA 表达增加的结果一致,相互印证。Yla-Herttuala 等^[2]用原位杂交技术也发现 As 病灶中 SR mRNA 表达增加。所以

从 As 病灶局部考虑 mm-LDL 通过 MCSF 或直接作用于 SR 是有促进单核巨噬细胞增殖及 SR 数目增加,从而加速泡沫细胞形成及 As 发展作用的。

mm-LDL 这种全身与局部作用看似矛盾的现象,其实是完全可以解释的,因为即使是在动脉壁局部,mm-LDL 所引起的仍然是一种清除异物有害作用的防御反应,即通过巨噬细胞增殖及 SR 表达增加而清除组织中的氧化 LDL。mm-LDL 的这种生物学效应原是有保护意义的,只是动脉壁内膜的引流不畅以及其他一些局部结构因素,不能使堆积的泡沫细胞被清除而表现出相反的结果而已。

参考文献

- 1 Leake DA. Effects of mildly oxidized low-density lipoprotein on endothelial cell function. *Cur Opin Lipidol*, 1991, 2: 301~305.
- 2 Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy, et al. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest*, 1991, 87: 1146~1152.
- 3 Avogaro P, Cazzolato G, Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis*, 1991, 91: 163~171.
- 4 Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*, 1990, 344: 254~257.
- 5 Liao F, Berliner JA, Mebrabian M, et al. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest*, 1991, 87: 2253~2257.
- 6 朱 宇, 蔡海江, 范乐明, et al. mm-LDL 与 MCSF 对动脉壁细胞胆固醇酯蓄积的协同作用. *中国动脉硬化杂志*, 1993, 1(1): 40~45.
- 7 Kogsugi K, Morel DM, Corleto PE, et al. Toxicity of oxidized LDL to cultured fibroblasts is selective for S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol*, 1987, 130: 311~320.
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RBA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chorx-form extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156~159.
- 9 Biothwell A, Yancopoulos GD, Ait FW. Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1990; 235
- 10 Shimano H, Yamada N, Ishibashi S, et al. Human monocyte colony-stimulating factor enhances the clearance of lipoproteins containing apolipoprotein B100 via both low density lipoprotein receptor-dependent and-independent pathways in rabbits. *J Biol Chem*, 1990, 265(22): 12869~12875.
- 11 Ishibashi S, Inaba T, Shimano H, et al. Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte derived macrophages. *J Biol Chem*, 1990, 265(24): 14109~14117.
- 12 Motoyoshi M. Serum cholesterol lowering activity of human monocytic colony stimulating factor. *Lancet*, 1989, 326~327.

(本文 1994-11-29 收到)