

天然和氧化型极低密度脂蛋白对巨噬细胞胞内游离钙浓度的影响

王国平 邓仲端 倪娟

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

The Effects of Native and Oxidized Very Low Density Lipoprotein on Intracellular Free Calcium Concentration in Macrophages

WANG Guo-Ping, DENG Zhong-Duan and NI Juan
(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim To well understand the mechanism of native and oxidized very low density lipoprotein (VLDL and OVLDL) in the atherogenesis, we investigated the influences of VLDL and OVLDL on intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$).

Methods Very low density lipoprotein was isolated from normal blood donors by density gradient ultracentrifugation, and oxidized by $CuCl_2$ with a final concentration of $10 \mu mol/L$. Rabbit peritoneal exudate macrophages were collected. For determination of $[Ca^{2+}]_i$, fura-2 fluorescence and microfluorimetry were used.

Results Both VLDL and OVLDL significantly increased $[Ca^{2+}]_i$ in macrophages. VLDL induced an increase of 57% in $[Ca^{2+}]_i$, where as OVLDL induced an increase of 115% in $[Ca^{2+}]_i$.

Conclusions It suggests that VLDL and OVLDL induce many biological functions by stimulating increase of $[Ca^{2+}]_i$ in macrophages, but the latter are more stronger than the former. This corresponds to the fact that OVLDL induces stronger biological functions including migration and secreting cytokines.

KEY WORDS Very low density lipoprotein; Calcium; Macrophages; Atherosclerosis

摘要 为了更好地阐明极低密度脂蛋白,尤其是氧化型极低密度脂蛋白在动脉粥样硬化发病过程中的作用机制,本文利用双波长显微分光光度计,检测了天然和氧化型极低密度脂蛋白对巨噬细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的影响。结果显示,极低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白均能刺激巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。极低密度脂蛋白可增加巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的57%,而氧化型极低密度脂蛋白则增加巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的115%。这表明极低密度脂蛋白和氧化型极低密度脂蛋白均可通过引起巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高而介导细胞的一系列生物学功能,但后者的作用比前者更强。这与氧化型极低密度脂蛋白能明显促进巨噬细胞的生物学功能,包括迁移和分泌细胞因子相一致。

关键词 极低密度脂蛋白; 钙; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化

大量的研究资料表明,高脂蛋白血症与动脉粥样硬化的发生有着极为密切的关系。血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)浓度升高是动脉粥样硬化的重要危险因素之一。LDL与动脉粥样硬化之间的关系已有较多的报道。但极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)与动脉粥样硬化之间关系的报道甚少。由于目前中国人的膳食仍以碳水化合物为主,在我国高脂血症病人中,高甘油三酯血症较多,Ⅳ型高脂蛋白血症占高脂蛋白血症的60%。因而在中国研究极低密度脂蛋白,尤其是氧化型极低密度脂蛋白在动脉粥样硬化中的作用具有极为重要的实际意义。

Rapp 等^[1]研究发现,在人动脉粥样硬化斑

块中可分离出 VLDL 及其分解产物,并认为它们在人动脉粥样硬化的发病过程中发挥了直接的作用。有报道,氧化型 LDL(oxidized LDL, OLDL)与单核巨噬细胞的相互作用可能是粥样斑块中泡沫细胞形成的重要机制^[2]。VLDL 和 OVLDL 与巨噬细胞之间有何作用?作者近期的研究表明,OVLDL 能明显地诱导巨噬细胞表达单核细胞趋化蛋白-1 mRNA。细胞内游离钙浓度是细胞内极为重要的第二信使,它直接关系到细胞的许多生理和生物化学反应及其细胞的生物学功能。因而研究 VLDL 和 OVLDL 对巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响是研究 VLDL 和 OVLDL 对巨噬细胞生物活性影响的重要基础,它有助于人们深入地探讨 VLDL 和 OVLDL 在动脉粥样硬化的发生发展过程中的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 脂蛋白的分离和氧化

用超速离心法从正常人外周血中分离 VLDL^[3],在琼脂糖凝胶电泳上显示单一的蛋白条带。将分离的 VLDL 置于 0.9% NaCl 溶液于 4℃ 下透析 24 h,其蛋白含量用 Lowry 方法检测^[4]。然后加入终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuCl_2 ,室温下放置 24 h,使 VLDL 氧化,再在 0.9% NaCl 溶液中 4℃ 下透析 24 h。VLDL 的硫代巴比妥酸反应物质的值为 1.2~3.2 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白,而 OVLDL 的硫代巴比妥酸反应物质的值为 63.0~78.5 $\mu\text{mol/g}$ 蛋白,明显地高于 VLDL。

1.2 巨噬细胞的收集与培养

按本室的方法收集兔腹腔巨噬细胞^[5]。选取健康雄性日本大耳白兔(体重为 2.5 kg~3.0 kg),腹腔注射 3% 无菌可溶性淀粉 150~200 ml,饲养 4 天,用含肝素(10 000 u/L)的 PBS 灌注腹腔(200 ml/次)收集巨噬细胞悬液。离心(1 000 r/min) 10 min,弃上清,加入含 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco 公司)的 DMEM (Sigma 公司)培养液,制成细胞悬液置 37℃、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,使之附壁,然后弃去培养液,以温 PBS 轻洗 2~3 次,用台蓝拒染试验,检测细胞活性在 95% 以上。加入 RPMI 1640 (Gibco 公司)培养液(含 2 mmol/L L-glutamine, 50 mg/L gentamicin)培养。将上述方法收集的巨噬细胞置于底部放有 22 mm×22 mm 大小的盖玻片的培养皿中,置 37℃ 5% CO_2 培养箱中

培养 24 h,然后取出进行 $[Ca^{2+}]_i$ 测定前的处理。

1.3 胞液游离钙浓度的测定

1.3.1 Fura-2/AM 负载 将上述附有巨噬细胞的盖玻片取出置于特定的培养皿中,加入 RPMI 1640 培养液,避光加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM (sigma 公司),在 37℃ 孵育 1 h。然后用 D-Hanks 液轻轻冲洗细胞 3 次以终止孵育。

1.3.2 单个巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定 应用双波长显微分光光度计(美国 SPEX 公司)测定单个附壁细胞荧光强度 F,两个发光波长分别为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 505 nm。根据荧光比值 R ($R = F_{340}/F_{380}$),通过计算机进行计算 $[Ca^{2+}]_i$,其公式如下:

$$[Ca^{2+}]_i = K_{eff}(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

式中 K_{eff} 为有效结合常数, R_{min} 为 Fura-2 游离时形成的最小荧光值,以 4 mmol/L EGTA 测得; R_{max} 为 Fura-2 饱和时产生的最大荧光值,以 10 $\mu\text{mol/L}$ ionomycin 测得。

1.4 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验作统计学分析处理。

2 结果

2.1 极低密度脂蛋白对巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

从 $[Ca^{2+}]_i$ 原始记录(Figure 1A)可以看出,当通过玻璃毛坏加入终浓度为 25 mg/L 的 VLDL 后,可见巨噬细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 开始上升,大约 1 min 后达顶峰水平,但幅度不大,然后开始慢慢下降,大约 2 min 后降到刺激前水平。

2.2 氧化型极低密度脂蛋白对巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响

从 Figure 1B 中可以看出,加入终浓度为 25 mg/L 的 OVLDL 后,可见巨噬细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 开始上升,其上升幅度比 VLDL 刺激后的上升幅度大,大约 1 min 左右上升到顶峰水平,大约 10 s 后 $[Ca^{2+}]_i$ 开始慢慢下降,2~3 min 后恢复到刺激前水平。

2.3 静息时巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的均值与刺激后均值的比较

为了进行统计学处理,在本实验中分别检测了静息状态和利用 VLDL 及 OVLDL 分别刺

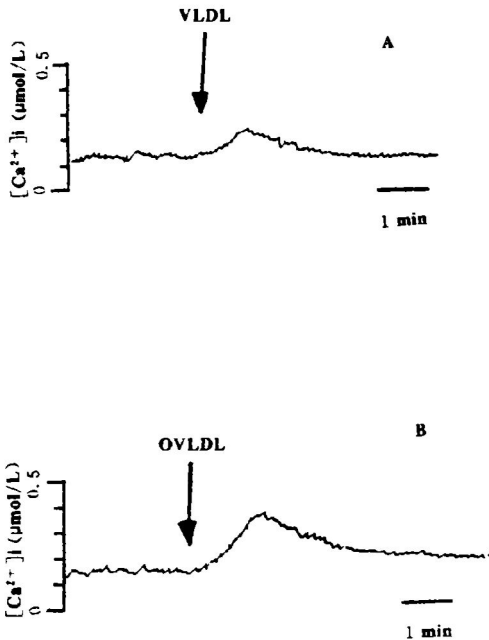


Figure 1. Original tracing of a representative experiment showing the effects of native VLDL(A) and oxidized VLDL(B) on intracellular free calcium concentration in macrophages. Arrows indicate the addition of VLDL and oxidized VLDL (25 mg protein/L)

激巨噬细胞后的 $[Ca^{2+}]_i$,每一组共检测了10个细胞,取得10个数据,然后进行统计学分析。静息时巨噬细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 为 109.0 ± 18.5 nmol/L,而用终浓度为25 mg/L的VLDL和OxLDL刺激后,巨噬细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 分别为 171.1 ± 9.8 nmol/L和 234.3 ± 21.9 nmol/L,后两者与静息时的 $[Ca^{2+}]_i$ 相比,其差异均有显著性意义($P < 0.01$)。但经VLDL刺激巨噬细胞后,巨噬细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 比静息时增加了57%,而经OxLDL刺激后的 $[Ca^{2+}]_i$ 比静息时的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加了115%。显然OxLDL比VLDL的作用更强(Table 1)。

3 讨论

在动脉粥样硬化的发生发展过程中,巨噬细胞发挥了极为重要的作用。它接受外来刺激,分泌许多细胞因子参与血管壁细胞间的相互调控,同时它自身逐步演变为泡沫细胞而构成动

Table 1. $[Ca^{2+}]_i$ in macrophages before and after stimulation with VLDL and OxLDL

Groups	n	$[Ca^{2+}]_i$ ($\bar{x} \pm s$, nmol/L)
Baseline	10	$109.0 \pm 18.5^{\Delta}$
VLDL stimulated PEM	10	$171.1 \pm 9.8^*$
OxLDL stimulated PEM	10	$234.3 \pm 21.9^{**}$

PEM; rabbit peritoneal exudate macrophages. * compared with Δ , $P < 0.01$; ** compared with Δ , $P < 0.01$; ** compared with *, $P < 0.001$.

脉粥样硬化斑块的重要细胞成分。在这一过程中,脂蛋白发挥了何种作用?作者过去的研究表明,脂蛋白尤其是 OxLDL 和 OxVLDL 能明显地促进巨噬细胞表达单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),从而促进对外周血单核细胞的趋化作用,加速动脉粥样硬化的发展。

细胞内游离钙是极为重要的第二信使, $[Ca^{2+}]_i$ 的高低将关系到细胞的增殖、迁移和坏死的过程^[6~8]。本室的早期研究表明,钙离子拮抗剂可抑制动脉粥样硬化斑块的形成^[9],随后的研究表明,在动脉粥样硬化的发病过程中 $[Ca^{2+}]_i$ 发挥了重要的作用^[7]。Lichtlen 等^[10]用血管造影技术检测了冠心病患者在使用钙通道阻滞剂 nifedipine 前后冠状动脉病灶的变化后指出,nifedipine 能明显抑制冠状动脉硬化病灶的发展。因此,无论是基础研究还是临床资料均表明, $[Ca^{2+}]_i$ 在动脉粥样硬化的发病过程中发挥重要的作用。至目前为止,有关脂蛋白与 $[Ca^{2+}]_i$ 的关系及其在动脉粥样硬化发病中的意义的报道甚少。Weisser 等^[11]在平滑肌细胞中研究发现, OxLDL 比 LDL 更能促进平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高,从而解释了 OxLDL 为何比 LDL 具有更强的致动脉粥样硬化作用。

随着 $[Ca^{2+}]_i$ 测定技术的不断完善,在以前工作的基础上^[12],本研究采用先进的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定技术观察了天然和氧化型 VLDL 对巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及其时间过程。结果表明,VLDL 和 OxVLDL 均能刺激巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$

升高,其反应较为迅速,在原始记录图上可见明显的波峰,但两者所致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅度相差甚大。统计结果表明,OVLDL能提高巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的115%,而VLDL仅提高巨噬细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的57%。可见在动脉粥样硬化的发生发展过程中,OVLDL具有更强的致动脉粥样硬化作用,这与我们以前的研究结果一致。至此,我们有理由相信,在动脉粥样硬化的发生发展过程中,OVLDL可通过刺激血管壁细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高,从而改变了细胞的一系列钙依赖性的生理生物化学反应和细胞的生物学功能而发挥其强烈的致动脉粥样硬化作用。

参考文献

- Rapp JH, Harris HW, Hamilton RL, et al. Particle size distribution of lipoproteins from human atherosclerotic plaque. *J Vasc Surg*, 1989, 9(1): 81~88.
- Carew TE. Role of biologically modified low-density lipoprotein in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1989, 64:18G~22G.
- 王厚本,宗义强,吴万生,等. 两步超速离心法分离大量血浆极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白. 同济医科大学学报, 1995, 24(3): 169~171.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measure with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~271.
- 邱红明,邓仲端,武忠弼,等. 巨噬细胞源性生长因子对培养的主动脉平滑肌细胞细胞周期进程的影响. 中华病理学杂志, 1990, 19: 4~9.
- Metcalf TC, Meore JP, Smith CA, et al. Calcium and cell proliferation. *Br Med Bull*, 1986, 42: 405~412.
- 王国平,邓仲端,李丽珠,等. 平滑肌细胞源性趋化因子所致的单核细胞迁移的钙依赖性研究. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(1): 1~5.
- Schanne R, Hane A, Young E, et al. Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*, 1979, 206: 309~319.
- 朱正,邓仲端,徐增媛,等. 汉防己甲素对兔实验性动脉粥样硬化形成的影响. 中国循环杂志, 1991, 6(6): 594~595.
- Lichtlen PR, Hugenholtz PG, Raffinbeul W, et al. Retardation of angiographic progression of coronary artery disease by nifedipine. *Lancet*, 1990, 335: 1109~1113.
- Weisser B, Locher R, Mengden T, et al. Oxidation of low density lipoprotein enhances its potential to increase intracellular free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Arterioscl Thromb*, 1992, 12: 231~236.
- 王国平,邓仲端. 用Fura-2测量单核细胞胞浆游离钙浓度的方法. 中国病理生理杂志, 1993, 9(4): 552. (1996-04-10收到)

名词术语的汉英对照及缩写(I)

血管活性肠多肽	vasoactive intestinal polypeptide
血管硬蛋白	angiotreticulin
血管内血栓形成	intravascular thrombogenesis
多价抗原	polyvalent antigen
多核苷酸	polynucleotide
多核苷酸酶	polynucleotidase
多核细胞	multinucleate cell
多核糖体	polyribosome
多聚甲醛	paraformaldehyde
多发性脑硬化	multiple cerebral sclerosis

(胡必利编写)