

氧化型低密度脂蛋白促进单核细胞-内皮细胞体外粘附反应

李立新 余麟 陈剑雄 廖端芳 曹建国 陈临溪 黄红林 朱炳阳

(衡阳医学院药理学教研室, 衡阳 421001)

Oxidized Low Density Lipoprotein Promotion of Adhesion of Monocytes to Endothelial Cells in Vitro by

LI Li-Xin, YU Lin, CHEN Jian-Xiong, LIAO Duan-Fang, CAO Jian-Guo, CHEN Lin-Xi, HUANG Hong-Lin and ZHU Bing-Yang

(Department of Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim The effect of oxidized low density lipoprotein (LDL) on adhesion of monocytes to cultured pig aortic endothelial cell (EC), expression of granule membrane protein-140(GMP-140) and secretion of prostacyclin (PGI₂) was studied.

Methods Adhesion of monocytes to EC was determined with Terrio's assay. Expression of GMP-140 and secretion of PGI₂ were detected the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results It was found that oxidized low density lipoprotein enhanced the adhesion of monocytes to EC in a dose-dependent and time-relative manner. Adhesion increased with increasing concentration of oxidized low density lipoprotein up to 100 mg protein/L and then levelled off. There was an initial but not significant increase in adhesion seen half an hour after exposure, a obvious rise at 1 h and up to a maximum at 3 h. There after, the adhesion level decreased. Meanwhile, oxidized low density lipoprotein(100 mg/L) enhanced the amount of GMP-140 on EC membrane from 92.8 ± 47.6 to $293.0 \pm 140.7 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$), but a impaired EC secretion in PGI₂ from 84.6 ± 8.7 to $6.0 \pm 3.1 \text{ ng/L}$ ($P < 0.01$).

Conclusions These results indicate that oxidized low

density lipoprotein may enhance th interaction between monocytes and EC via the adhesion molecular, GMP-140.

KEY WORDS Oxidized low density lipoprotein; Granule membrane protein-140; Prostacyclin; Adhesion molecule; Endothelial cell; Monocyte

摘要 体外培养猪胸主动脉内皮细胞,观察氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞-单核细胞体外粘附反应的影响,同时观察氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞表面粘附分子颗粒膜蛋白-140及内皮细胞分泌前列环素的影响。结果发现氧化型低密度脂蛋白(0、50、100和200 mg/L)增加内皮细胞-单核细胞粘附率并呈剂量依赖性,其中以100 mg/L作用最强;氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)与内皮细胞孵育0.5 h,粘附率上升但无显著性,1 h后显著升高,3 h达高峰,48 h回复接近正常水平。同时发现100 mg/L氧化型低密度脂蛋白使内皮细胞表面颗粒膜蛋白-140含量从 92.8 ± 47.6 上升到 $293.0 \pm 140.7 \mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$),内皮细胞分泌前列环素量从 84.6 ± 8.7 降低到 $6.0 \pm 3.1 \text{ ng/L}$ ($P < 0.01$)。结果表明氧化型低密度脂蛋白可显著促进单核细胞-内皮细胞粘附,其作用机制可能同内皮细胞表面粘附分子颗粒膜蛋白-140增加有关。

关键词 氧化型低密度脂蛋白; 颗粒膜蛋白-140; 前列环素; 粘附分子; 内皮细胞; 单核细胞

大量证据表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)早期病变中有单核细胞(monocyte, MC)粘附于内皮,但详尽机制不甚明了。近年普遍认为氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein)是As最重要的致病因子,它通过损伤内皮,使内膜流动性、通透性和代谢功能改变,导致MC粘附、聚集、内移,脂质沉积及泡沫细胞形成。国外研究表明,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、极低密度

脂蛋白(very LDL, VLDL)、轻度修饰 LDL 均促进单核细胞—内皮细胞粘附^[1-3]。氧化型低密度脂蛋白能否影响单核细胞—内皮细胞粘附及其可能的机制如何? 尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 猪胸主动脉内皮细胞培养

取胸主动脉 10 cm 左右, 除去外膜, 纵形剪开血管, D-hank's 液洗净, 用 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化 15 min, 以含 20% 小牛血清的 M199 培养液终止消化, 以小匙轻刮内膜, 收集消化液以 1 000 r/min 离心 10 min, 沉淀的细胞团加培养液制成悬液, 计数, 以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 种植于培养瓶中, 置二氧化碳培养箱, 根据内皮细胞(endothelial cell, EC)贴壁特性, 24 h 后内皮细胞大部分已贴壁, 此时换液 1 次, 冲洗除去未贴壁的内皮细胞及可能混入的其它细胞如平滑肌细胞。以后视细胞形态换液。待内皮细胞汇合, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 第四五代传至 24 孔培养板上供实验用。

1.2 低密度脂蛋白的制备与氧化修饰

取健康人新鲜空腹血浆, 采用二步法超速离心(Hitach 80P-7 超速离心机), 先以 30 000 r/min 除去极低密度脂蛋白, 再以 40 000 r/min 离心 24 h 分出低密度脂蛋白($1.019 < d < 1.063$), 低密度脂蛋白蛋白含量测定按 Bradford^[4]法进行。低密度脂蛋白氧化修饰采用铜离子(Cu^{2+})法。在硫酸铜 $10 \mu\text{mol/L}$ 液中 37℃ 氧化 12 h 后用含二乙四乙酸二钠的磷酸缓冲液透析 24 h(4℃), 超滤除菌, 避光于 4℃ 保存。低密度脂蛋白氧化修饰程度鉴定按硫代巴比妥酸法^[5]进行。氧化型低密度脂蛋白的硫代巴比妥酸反应物质含量是正常 LDL 的 4.3 倍。

1.3 单核细胞分离

取新鲜抗凝人全血, 用磷酸缓冲液等量稀释后用 Hapaque-Ficoll 分离液一次性密度梯度离心^[6], 吸取中层单个核细胞并孵育于用牛血清包被的培养皿中, 根据单核细胞附壁特性分离出单核细胞, 台盼兰拒染试验, 细胞成活率大于 90%。

1.4 内皮细胞+单核细胞粘附率测定

参照 Terrio 法^[2]进行。接种于 24 孔培养板上的内皮细胞(EC)汇合成单层后, 加氧化型低密度脂蛋白温育(见后)完后后用含钙镁的磷酸缓冲液洗一次, 每孔加 1 ml 单核细胞(MC)悬液(即每 1 ml 含 1% 小牛血清的 M199 培养液中含 5.5×10^5 个 MC), 37℃ 下温育 1 h, 在温育期间每隔 15 min 震荡一次。温育完毕用冷

的磷酸缓冲液洗去非粘附细胞, 以氢氧化钠溶解细胞并测每孔细胞蛋白质含量。以不加 MC 的 EC 孔内蛋白质含量为基础, 计算粘附率。公式为:

$$\text{粘附率} = \frac{(\text{EC} + \text{MC}) \text{蛋白量} - \text{EC 蛋白量}}{1 \text{ ml MC 蛋白量}} \times 100\%$$

1.4.1 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对粘附率的影响 用 50、100 和 200 mg/L 氧化型低密度脂蛋白分别加入不同组别的培养孔内与内皮细胞孵育 3 h, 另设一组不加氧化型低密度脂蛋白作为对照。

1.4.2 氧化型低密度脂蛋白与内皮细胞孵育的时间长短对粘附率的影响 在不同组别的培养孔内加入氧化型低密度脂蛋白 100 mg/L, 孵育时间分别为 0.5、1、3、5、7、24 和 48 h, 另设一组不加氧化型低密度脂蛋白作为对照。

1.5 内皮细胞表面粘附分子颗粒膜蛋白-140 测定

采用酶联免疫吸附实验法^[7], 以苏州医学院止血与血栓研究室提供的药盒测定内皮细胞表面粘附分子颗粒膜蛋白-140(granule membrane, protein-140, GMP-140)。

1.6 细胞培养液中前列环素含量测定

从用氧化型低密度脂蛋白处理完毕的每孔细胞液中吸取 0.1 ml, 参照文献^[8], 用苏州医学院止血与血栓研究室提供的酶药盒进行测定。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差分析后进行 t 或 t' 检验。

2 结果

2.1 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞—单核细胞粘附率的影响

正常对照组粘附率为 $11.93\% \pm 0.79\%$, 表明正常内皮细胞对单核细胞存在基础粘附。当用氧化型低密度脂蛋白(50、100 和 200 mg/L)与内皮细胞温育 3 h 后, 其粘附率逐步增高并呈剂量依赖性(Figure 1)。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞—单核细胞粘附率的影响与时间的关系

氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)与内皮细胞作用 30 min, 内皮细胞对单核细胞的粘附率增加不显著(与对照组比较, $P > 0.05$), 作用 1 h 后粘附率显著升高, 3 h 达高峰, 以后渐降低, 24 h 粘附率仍显著高于对照组($P < 0.05$),

而 48 h 已回复到接近对照组水平($P>0.05$), 表明氧化型低密度脂蛋白促进内皮细胞—单核细胞粘附呈时间相关性(Figure 2)。

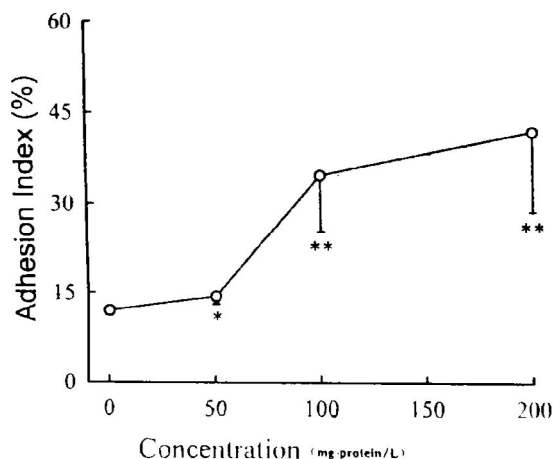


Figure 1. Concentration-response effect of oxidized low density lipoprotein on adhesion of endothelial cells and monocytes. ($n=6\sim8$, compared with control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$).

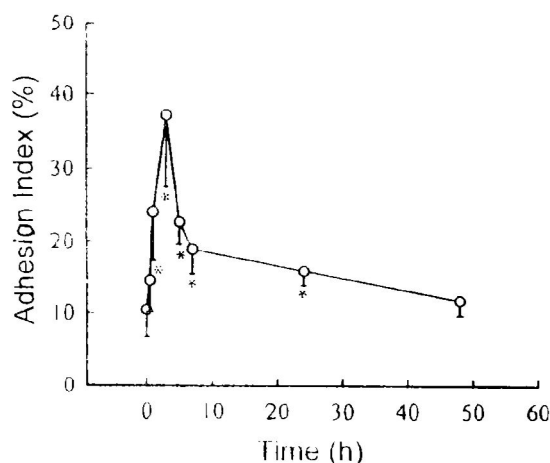


Figure 2. Time course of the effect of oxidized low density lipoprotein on adhesion of endothelial cells and monocytes. *: $P<0.05$, compared with control group, $n=4$.

2.3 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞颗粒膜

蛋白-140 表达和前列环素分泌的影响

用 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与内皮细胞温育 3 h, 内皮细胞表面粘附分子 GMP-140 量显著增加($P<0.05$)。同时, 内皮细胞分泌前列环素显著减少($P<0.01$)。表明氧化型低密度脂蛋白损伤内皮细胞分泌功能的同时也增加了内皮细胞的粘附性(Table 1)。

Table 1. Effect of oxidized low density lipoprotein (LDL) on GMP-140 expression and prostacyclin secretion

Groups	GMP-140($\mu\text{g/L}$)	Prostacyclin(ng/L)
Control	92.8 \pm 47.6	84.6 \pm 18.7
LDL	293.0 \pm 140.7*	6.0 \pm 3.1 ^b

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$; compared with control group.

3 讨论

现已证实氧化型低密度脂蛋白存在于患 As 的机体内^[9,10], 用抗氧化型低密度脂蛋白抗体可在实验兔 As 斑块中检测到氧化型低密度脂蛋白^[10], 提示氧化型低密度脂蛋白在 As 发生中的关键作用。但氧化型低密度脂蛋白致 As 的机制至今尚不十分清楚。本实验发现氧化型低密度脂蛋白与离体猪胸主动脉内皮细胞 (endothelial cell, EC) 共同孵育 3 h, EC-MC 粘附率增加并呈剂量依赖性, 说明氧化型低密度脂蛋白促进 EC 与 MC 粘附, 提示氧化型低密度脂蛋白在启动 As 发生, 即使 MC 粘附到内皮起作用, 并为 MC 进一步迁移到内皮下激活为巨噬细胞创造了条件。

令人感兴趣的是我们在实验中发现氧化型低密度脂蛋白对 EC-MC 粘附率的影响有时间依从性。氧化型低密度脂蛋白 (100 mg/L) 与 EC 温育 3 h, 粘附率达高峰; 3 h 之前粘附率随时间延长而升高; 3 h 后粘附率随时间延长而下降; 48 h 小时回复至接近正常对照组水平, 其机理有待于进一步探讨。

单核细胞—内皮细胞粘附率取决于二者的粘附性。已知氧化型低密度脂蛋白 (非 LDL) 能特异地使 MC 向内皮迁移、粘着, 而对中性粒

细胞无此作用,其原因可能同氧化型低密度脂蛋白脂质过氧化中产生的溶血卵磷脂有关^[11]。本实验首次发现氧化型低密度脂蛋白增加 EC 表面粘附分子颗粒膜蛋白-140(granule membrane protein-140, GMP-140)量。GMP-140 在粘附分子家族中属 P-选择素族(P-selectin),是在粘附反应早期起重要调节作用的粘附分子^[12],它主要介导 EC 与 MC、EC 与血小板的粘附反应,促成 As,抗 GMP-140 抗体可阻断上述粘附过程^[13]。前列环素(prostacyclin, PGI₂)是反映 EC 功能的重要指标之一。目前 PGI₂ 已被公认为具有防止 As 发生的“保护因子”。PGI₂ 通过抗氧自由基及抗脂质过氧化来保护 EC^[14]。本实验发现氧化型低密度脂蛋白能使 EC 分泌 PGI₂ 减少,GMP-140 表达增加。已知氧自由基刺激 EC 表达的是 GMP-140 而非其它粘附分子^[7]。由此推测氧化型低密度脂蛋白使 EC 分泌 PGI₂ 功能受损,减弱了 PGI₂ 对 EC 的保护作用,从而更有利于氧化型低密度脂蛋白对 EC 膜的脂质过氧化攻击,导致 EC 膜上表型改变,增加 EC 膜上粘附分子 GMP-140 表达,即增加了 EC 的粘附性,促进 EC-MC 粘附。

总之,氧化型低密度脂蛋白促进 EC-MC 体外粘附反应并呈剂量依赖性,其作用机制可能与 EC 膜上粘附分子 GMP-140 量增加以及 EC 分泌 PGI₂ 减少有关。

参考文献

- 1 Alderson LM, Endemann DG, Lindesys, et al. LDL enhances monocyte adhesion to endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*, 1986, **123**: 334~342.
- 2 Territo MC, Berliner JA, Almada L, et al. β -very low density lipoprotein pretreatment of endothelial monolayers increase monocyte adhesion. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**: 824~828.
- 3 Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interaction. *J Clin Invest*, 1990, **85**: 1 260~266.
- 4 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (12): 248.
- 5 Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, et al. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1986, **77**: 641~644.
- 6 Fogelman AM, Elahi F, Sykes K, et al. Modification of the recalc method for the isolation of human monocytes. *J Lipid Res*, 1988, **29**: 1 243~246.
- 7 Patal KD, Zimmerman GA, Prescott SM, et al. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140. *J Cell Biol*, 1991, **112**: 740~759.
- 8 王兆敏, 陈德春, 何 扬, 等. 白细胞-内皮细胞体外粘附反应及眼镜蛇毒的影响. *中国病理生理杂志*, 1991, **7**(5): 551~553.
- 9 Palinski W, Michael E, Rosenfeld, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 1 372~376.
- 10 Haberland ME, Fong D, Cheng L. Molondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Science*, 1988, **241**: 215~218.
- 11 Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine, a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in AS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(8): 2 805.
- 12 Masafumi T, Jun-Ichi, Massyama, et al. Suppressive role of endogenous endothelial monocyte chemoattractant protein-1 on monocyte transendothelial migration in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**(5): 629.
- 13 Allan ML, Andrew SW, Michael B. Role of Selectins, a new family of adhesion molecules in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovas Res*, 1994, **28**: 289~294.
- 14 Gryglenski KJ, Szczekok A, Wandzilak M. The effect of six prostaglandins, prostacyclin and iloprost on generation of superoxide anions by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by zymosan or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Pharmacol*, 1987, **36**: 4 909~913.

(1996-09-04 收到, 1996-11-29 修回)