[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0129-03 •实验研究•

C 反应蛋白和高密度脂蛋白对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

王 悦, 陈连凤, 王晋峰, 方 全, 严晓伟
(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院心内科, 北京市 100730)

[关键词] 病理学与病理生理学; C 反应蛋白; 高密度脂蛋白; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 巨噬细胞

[摘 要] **目的** 观察 C 反应蛋白和高密度脂蛋白对单核细胞株 THP-1 来源的巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和 mRNA 表达的影响, 以及血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的变化与细胞内胆固醇含量变化的关系。**方法** THP-1 单核细胞株经佛波酯诱导分化为巨噬细胞。用不同浓度 C 反应蛋白或高密度脂蛋白在体外干预巨噬细胞, 测定干预前后巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和 mRNA 表达的变化, 并采用高效液相色谱测定巨噬细胞内胆固醇含量的变化。**结果** 与对照组相比, C 反应蛋白或高密度脂蛋白均可以诱导 THP-1 来源的巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白和 mRNA 表达增加($P<0.05$), C 反应蛋白使巨噬细胞内总胆固醇和胆固醇酯含量显著增加($P<0.01$), 而高密度脂蛋白使细胞内总胆固醇和胆固醇酯显著降低($P<0.01$)。**结论** C 反应蛋白和高密度脂蛋白都能引起 THP-1 来源的巨噬细胞表面血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达上调, 提示血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 并不是介导巨噬细胞参与炎症反应病理生理变化的关键性受体。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

C-Reactive Protein and High Density Lipoprotein Promote Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 Expression on THP-1 Derived Macrophages

WANG Yue, CHEN Lian-Feng, WANG Jin-Feng, FANG Quan, and YAN Xiao-Wei
(*Peking Union Medical College (PUMC) Hospital, PUMC and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing* 100730, *China*)

[**KEY WORDS**] C-Reactive Protein; High Density Lipoprotein; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; Macrophage

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the role of macrophage lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the process of atherosclerosis inflammation, the effects of C-reactive protein (CRP) or high density lipoprotein (HDL) on LOX-1 mRNA and protein expression, and on intracellular cholesterol content in THP-1 derived macrophages were investigated. **Methods** THP-1 cells were differentiated into macrophages with PMA. THP-1 derived macrophages were incubated with CRP or HDL of different concentration in vitro. The expressions of LOX-1 antigen and mRNA were determined by ELISA and RT-PCR. Cellular cholesterol contents were measured before and after CRP or HDL treatments with HPLC. **Results** Compared with control group, both CRP and HDL can increase the expression of LOX-1 protein and mRNA significantly ($P<0.05$) in a dose dependent manner on THP-1 derived macrophages. CRP promoted cellular cholesterol accumulation ($P<0.01$), while HDL decreased intracellular cholesterol content significantly ($P<0.01$). **Conclusions** LOX-1 expression in THP-1 derived macrophages can be promoted by either pro-inflammatory factor CRP or anti-inflammatory factor HDL, which suggested that LOX-1 may not play a critical role in the inflammatory process of macrophages.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症反应, 巨噬细胞中脂质沉积在 As 发生过程中占重要地位。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是在巨噬细胞表面发现的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)受体[1], 可能参与了泡沫细胞的形成及巨噬细胞的炎症过程。C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)作为一种炎性因子, 具有促 As 作用; 而高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)通过抑制多种炎性细胞因子和粘附分子的产生, 减少胞内脂质蓄积, 具有抗 As 作用。本研究观察了 CRP 和 HDL 对巨噬细胞表面 LOX-1 表达的影响, 并测定了细胞内胆固醇含量的变化, 旨在了解细胞内胆固醇含量的变化与 LOX-1 表达变化的相关性, 以及 LOX-1 在巨噬细胞泡沫化过程中所

[收稿日期] 2007-08-13 [修回日期] 2008-01-02
[作者简介] 王悦, 博士研究生。陈连凤, 主管技师, 主要从事分子生物学和细胞生物学研究。**通讯作者严晓伟**, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂质代谢异常和动脉粥样硬化机制研究, E-mail 为 xswy-pumc@yahoo.com.cn。

起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核/巨噬细胞株 THP-1 细胞购自中科院基础研究所细胞中心，rhCRP 为 Calbiochem 公司产品；HDL 购自中科院基础研究所生化室；山羊抗人 LOX-1 多克隆抗体购自 R&D 公司；山羊、兔 IgG 和亲和素—生物素—辣根过氧化物酶复合物（简称酶联物）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；佛波酯购自 Sigma 公司；RIPA 裂解液购自碧云天生物技术有限公司。Trizol RNA 抽提试剂购自 Gibco-BRL 公司，逆转录试剂盒购自 Promega 公司，PCR 试剂盒由泽星科技有限公司提供。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。液相色谱仪为美国 Waters 公司产品。

1.2 THP-1 细胞培养和诱导分化

THP-1 细胞用 20% 胎牛血清-1640 培养基，置 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养。待静置后细胞基本铺满培养瓶底面时传代。3～4 代后细胞用于实验。诱导分化时，调整培养液中佛波酯浓度为 160 nmol/L，48 h 后用无血清培养液充分洗涤，置于无佛波酯的培养液中 12 h，再进行后续实验。

1.3 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的检测

细胞生长于 24 孔板上，分别加入 CRP（3、5、10 和 25 mg/L）和 HDL（10、50、100 和 200 mg/L），与空白对照组一起培养 24 h 后收集细胞，进行 LOX-1 mRNA 半定量 RT-PCR 检测，实验重复 3 次。以 Trizol 常规提取细胞总 RNA，经氯仿处理，异丙醇沉淀，乙醇洗涤后，略干燥，溶于 DEPC 处理水。经核酸紫外分析仪检测样品中 RNA 纯度（A_{260}/A_{280} = 1.60～1.80）和含量。逆转录反应：20 μL 反应体系中含 1 μg 总 RNA，20 mg/L 随机引物，1 mmol/L dTNPs，20 u Rnase inhibitor，1 × reaction buffer，200 u M-MuLv 逆转录酶。于 PCR 仪上 42 ℃反应 60 min，72 ℃灭活 10 min，置冰浴。PCR 反应体积 20 μL，含 1 × MasterMix，上下游引物各 3 pmol，逆转录产物 4 μL。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 40 s → 60 ℃退火 1 min → 72 ℃延伸 1 min，LOX-1 扩增 35 个循环，β-actin 扩增 25 个循环，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。LOX-1 引物上游 5′-CCA GGT GTC TGA CCT CCT AAC-3′，下游 5′-CTC CAT GCC AGA TCCAGT CTT-3′，扩增产物 278 bp；β-actin 引物上游 5′-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG C-3′，下游 5′- CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC G-3′，扩增产物 1 128 bp。取 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶板稳压电泳，数码凝胶图像定量分析系统成像、条带密度扫描，以 β-actin 为内参照，测定各样本 LOX-1 mRNA 的相对表达量。

1.4 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的检测

参考 Pigott 等[2] 的方法。生长在 96 孔板上的 THP-1 细胞经诱导转化，收集细胞，经多聚甲醛固定、脱脂奶粉封闭、0.5 mg/L 山羊抗人 LOX-1 多克隆抗体作用后，再加入 1∶500 生物素化兔抗山羊 IgG，经酶联物作用、TMB 显色、终止反应后用 450 nm 酶标仪读取 OD 值。以 OD450 值表示细胞 LOX-1 蛋白表达水平。每个观察值设 3 个复孔，实验重复 3 次。

1.5 细胞内胆固醇含量的检测

将诱导分化后的细胞置于 20% 胎牛血清-1640 培养基，分别用 CRP（10 mg/L）或 HDL（100 mg/L）处理 24 h，用 RIPA 裂解液溶解细胞，用 BCA 法测定总蛋白，使蛋白含量达到 100～150 mg/L，取 2 份各 100 μL，按照文献[3, 4] 提供方法，采用高效液相色谱法测定细胞内总胆固醇（total cholesterol, TC）和游离胆固醇（free cholesterol, FC），TC 含量与 FC 含量的差值为胆固醇酯（cholesterol ester, CE）含量。

1.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 C 反应蛋白对巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

巨噬细胞 LOX-1 蛋白的表达量随着 CRP 干预浓度的增加而显著增加（$P < 0.05$）；CRP 干预浓度为 3、5、10 及 25 mg/L 时，LOX-1 mRNA 的表达量分别是对照组的 1.57 倍、1.65倍、2.20 倍及 2.30 倍（$P < 0.01$；表 1）。

表 1. 不同浓度 C 反应蛋白对巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

分 组	蛋白（n= 12）	mRNA（n= 3）
对照组	1.1940 ± 0.1333	0.423 ± 0.113
CRP		
3 mg/L	1.3008 ± 0.1019[a]	0.665 ± 0.117[b]
5 mg/L	1.3180 ± 0.1325[a]	0.698 ± 0.141[b]
10 mg/L	1.3719 ± 0.1028[a]	0.932 ± 0.119[b]
25 mg/L	1.3768 ± 0.1240[a]	0.971 ± 0.104[b]

a 为 $P < 0.05$，b 为 $P < 0.01$，与对照组比较。

2.2 高密度脂蛋白对巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

与对照组相比，巨噬细胞 LOX-1 蛋白的表达量随着 HDL 干预浓度的增加而显著增加（$P<0.05$）。HDL 干预浓度为 10、50、100 及 200 mg/L 时，LOX-1 mRNA 的表达量分别为对照组的 1.29 倍、1.62 倍、2.14 倍及 2.51 倍（$P<0.01$；表 2）。

表 2. 不同浓度高密度脂蛋白对巨噬细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 表达的影响

分　组	蛋白（$n=12$）	mRNA（$n=3$）
对照组	1.1940±0.1333	0.384±0.100
HDL		
10 mg/L	1.2859±0.0944[a]	0.497±0.068[b]
50 mg/L	1.3436±0.0774[a]	0.621±0.087[b]
100 mg/L	1.3695±0.0946[a]	0.820±0.086[b]
200 mg/L	1.4348±0.0958[a]	0.965±0.142[b]

a 为 $P<0.05$，b 为 $P<0.01$，与对照组比较。

2.3 C 反应蛋白和高密度脂蛋白对巨噬细胞内胆固醇含量的影响

与对照组比较，CRP 作用后巨噬细胞内 TC 和 CE 明显增加，CE/TC 比值增高（$P<0.01$），FC 变化不明显；HDL 作用后 TC 和 CE 减少，FC 增多，CE/TC 比值下降（$P<0.01$；表 3）。

表 3. C 反应蛋白和高密度脂蛋白对巨噬细胞内胆固醇含量的影响

分　组	FC（mg/g）	CE（mg/g）	TC（mg/g）	CE/TC
对照组	2.89±0.11	9.24±0.65	12.13±0.64	0.76±0.016
10 mg/L CRP	2.43±0.64	46.04±1.96[a]	48.47±2.35[a]	0.95±0.012[a]
100 mg/L HDL	4.42±0.26[a]	4.25±0.46[a]	8.67±0.32[a]	0.49±0.041[a]

a 为 $P<0.01$，与对照组比较。

3 讨 论

单核细胞分化为巨噬细胞时，细胞表面出现 LOX-1 表达，可能与细胞摄取 ox-LDL 有关。体外研究发现，一些氧化刺激因子和炎性因子均可诱导巨噬细胞 LOX-1 表达，提示 LOX-1 可能影响泡沫细胞的形成，在 As 形成过程中起一定作用。CRP 能刺激单核细胞释放白细胞介素 1β、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等炎症因子，通过影响巨噬细胞活性氧自由基产生，促进 ox-LDL 形成和被吞噬，从而加速巨噬细胞泡沫化[5]。HDL 参与胆固醇逆转运，具有抑制巨噬细胞内胆固醇沉积，抑制 As 斑块形成及促进斑块消退的作用[6]。HDL 还可以抑制 As 炎症反应[7]。本研究结果发现，CRP 和 HDL 在体外均可显著增加 THP-1 来源的巨噬细胞 LOX-1 蛋白和 mRNA 的表达，但对细胞内胆固醇含量的影响截然相反，表现为 CRP 促进细胞内胆固醇酯沉积，而 HDL 抑制细胞内胆固醇沉积。提示巨噬细胞表面 LOX-1 表达的增加与 CRP 的促细胞内胆固醇酯沉积或 HDL 抗细胞内胆固醇沉积作用无关，因此，巨噬细胞 LOX-1 受体可能并非是巨噬细胞摄取低密度脂蛋白的主要受体。巨噬细胞参与摄取 ox-LDL 受体还包括 SR-A、CD36 和 CD68 等。Tsukamoto 等[8]研究发现，ox-LDL 与巨噬细胞作用能刺激 CD36、SR-BI 和 CD68 受体的增加，参与其泡沫化过程，但 LOX-1 表达却显著下降，也提示 LOX-1 可能并不是巨噬细胞摄取脂质的主要工具。Draude 等[9]研究发现，转化生长因子 β1 能下调巨噬细胞 CD36 和 SR-A 的表达，却刺激 LOX-1 表达增加，提示 LOX-1 的表达上调似乎可见于各种病理生理状态，包括截然相反的促 As 和抗 As 炎症反应过程。结合本研究结果，说明 LOX-1 的诱导表达可能并非是介导巨噬细胞炎症反应和泡沫化的主要物质。

本研究存在以下局限性：　所采用的是 THP-1 单核细胞株在体外诱导分化形成的巨噬细胞；④没有定量地观察在 LOX-1 表达变化前后巨噬细胞吞噬 ox-LDL 功能的变化。

[参考文献]

[1] Yoshida H, Kondratenko N, Green S, et al. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor [J]. *Biochem J*, 1998, **334** (Pt 1): 9-13.

[2] Pigott R, Needham LA, Edward RM, et al. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies [J]. *J Immunol*, 1991, **147** (1): 130-135.

[3] Contreras JA, Castro M, Bocos C, et al. Combination of an enzymatic method and HPLC for the quantitation of cholesterol in cultured cells [J]. *J Lipid Res*, 1992, **33** (6): 931-936.

[4] 严晓伟，陈连凤，江　恬. 阿托伐他汀钙和非诺贝特酸对 2 型糖尿病患者泡沫细胞胆固醇外流的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2006, **8** (5): 292-295.

[5] Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis [J]? *Hypertension*, 2004, **44** (1): 6-11.

[6] Han J, Hajjar DP, Zhou X, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (26): 23 582-586.

[7] Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002, **13**: 285-288.

[8] Tsukamoto K, Kinoshita M, Kojima K, et al. Synergically increased expression of CD36, CLA-1 and CD68, but not of SR-A and LOX-1, with the progression to foam cells from macrophage [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2002, **9** (1): 57-64.

[9] Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **278** (4): H1 042-048.

（此文编辑　文玉珊）