

[文章编号] 1000-4718(2005)03-0475-04

天然及氧化低密度和极低密度脂蛋白促进动脉平滑肌细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA*

瞿智玲, 阮秋蓉, 朱大和

(华中科技大学同济医学院基础医学院病理学系, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨天然及氧化低密度和极低密度脂蛋白(n-LDL, n-VLDL, ox-LDL, ox-VLDL)是否能促进培养的动脉平滑肌细胞表达巨噬细胞炎性蛋白(MIP) 1 α mRNA。方法: 将培养的兔主动脉平滑肌细胞暴露于上述4种脂蛋白后, 分别用原位分子杂交法及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测其MIP-1 α mRNA的表达。结果: 培养的兔主动脉平滑肌细胞能表达低水平的MIP-1 α mRNA, 4种脂蛋白均能增强平滑肌细胞表达MIP-1 α mRNA, 氧化型脂蛋白作用强于天然型脂蛋白, 其中又以ox-VLDL作用最强, 组间差异有极显著意义($P < 0.01$)。结论: n-LDL, n-VLDL, ox-LDL和ox-VLDL可能通过诱导平滑肌细胞表达MIP-1 α , 从而在动脉粥样硬化早期病变的形成中起重要作用。

[关键词] 脂蛋白类; 巨噬细胞炎性蛋白1; 肌, 平滑; 血管; 动脉硬化

[中图分类号] Q513.5 **[文献标识码]** A

泡沫细胞的形成和动脉中膜平滑肌细胞的增生是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的早期主要病变, 而泡沫细胞又来源于血单核细胞(monocyte, MC)和血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC), 它们共同构成As斑块的细胞成分。在许多细胞外刺激条件下, SMC可通过自分泌、旁分泌产生多种细胞因子, 促进斑块的形成和发展。MIP-1 α 作为CC型趋化因子, 对血液MC和T淋巴细胞有较强的趋化活性, 与As病变的发生、发展密切相关, 特别是最近有关As炎症观点^[1]的再度兴起。已证实高脂血症是As病变的独立危险因素, 血清脂蛋白在As病变中的作用已有广泛研究, 尤其是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 但关于血清中另一脂蛋白主要成分—极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和血管SMC与As关系的研究, 国内外极少报道。因此, 本研究以血浆天然及氧化低密度和极低密度脂蛋白(native low density lipoprotein and very low density lipoprotein, n-LDL, n-VLDL; oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein, ox-LDL, ox-VLDL)作为刺激因子, 用原位分子杂交方法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测SMC的巨噬细胞炎性蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP) 1 α mRNA的表达。

材 料 和 方 法

1 血浆脂蛋白的制备

按王淳本等^[2]的方法进行, 将新鲜正常人血浆经超速离心分得n-LDL和n-VLDL, 加入CuCl₂使之氧化修饰。用硫代巴比妥酸反应物质(thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值对其氧化程度进行鉴定^[3]。经PBS透析后, 4℃避光保存备用。用Lowry法^[4]进行蛋白质定量检测。

2 兔主动脉SMC的培养及实验分组

取1月龄幼兔, 颈动脉放血处死, 在无菌条件下剥离胸主动脉, 切取内、中膜层1/3, 切成表面积1mm×1mm大小的组织块, 均匀贴于培养瓶内。培养基为含10%胎牛血清(美国Gibco公司)的M199(美国Sigma公司)。经3-5d, 从组织块边缘长出零散细胞, 较多时呈放射状生长; 第10-14d进行第1次传代培养, 以后每隔5d左右传代1次。选取3-5代生长状态良好的SMC, 随机分成5组。①对照组: 仅加等体积无血清培养基(DMEM/F12, Gibco公司); ②n-LDL组: 加入含80mg/L n-LDL的等体积无血清培养基; ③n-VLDL组: 加入含80mg/L n-VLDL的等体积无血清培养基; ④ox-LDL组: 加入含80mg/L ox-LDL的等体积无血清培养基; ⑤ox-VLDL组: 加入含80mg/L ox-VLDL的等体积无血清培养基。继续孵育24h, 按检测方法的不同分别收集样品。

[收稿日期] 2003-08-22 [修回日期] 2003-11-19

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 39730220)

Tel: 027-83657832

3 原位分子杂交

在各组培养瓶内预先放置洗净的盖玻片,将传代 SMC 接种于内。待长满时按上述分组加入不含脂蛋白和含 n- LDL、n- VLDL、ox- LDL 及 ox- VLDL 的培养基,孵育 24 h,用 4% 多聚甲醛固定,逐级乙醇脱水, - 70 °C 保存备用。参照地高辛随机引物标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)说明书进行探针标记和杂交,所用探针为 MIP- 1 α cDNA(由黄晓珠博士馈赠)。用 HPIAS- 1000 图像分析系统对各组细胞进行扫描,每组随机检测 60 个细胞,测得其平均吸光度(absorbance, A)值。

4 RT- PCR 检测

用一步法提取细胞总 RNA, 每组取 1- 5 μ g 总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 取该反应产物 2 μ L 进行 PCR 循环: 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 末次延伸为 72 °C 10 min。MIP- 1 α 的引物序列为: 正链 5' - CTGCCCTTGCTGTC-CTCCTCTG- 3', 负链 5' - CTGCCGGCTTCGCTTGTTA- 3', PCR 扩增产物长度为 197 bp; GAPDH 的引物序列为: 正链 5' - GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT- 3', 负链 5' - GAGGGCCATCCACAGTCTTCT- 3',

PCR 扩增产物长度为 235 bp(美国 Gibco- BRL 公司)。取产物 10 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外线拍照, 继用 SQ9636 型扫描系统扫描, HPIAS- 1000 图像分析系统检测各组目的基因及其内参照的积分吸光度值。RT- PCR 重复 3 次。

5 统计学处理

原位分子杂交数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SAS 软件进行方差分析。RT- PCR 取 3 次结果的均值。

结 果

1 原位分子杂交

结果显示, 各组 SMC 均能表达 MIP- 1 α mRNA, 对照组 SMC 仅微弱着色, 天然及氧化脂蛋白组 SMC 着色明显加深, 尤其是 ox- VLDL 组 SMC MIP- 1 α mRNA 表达最强, 呈蓝紫色颗粒表达于胞浆和核内(图 1)。图像扫描结果, 对照组、n- LDL 组、n- VLDL 组、ox- LDL 组及 ox- VLDL 组 SMC 的平均吸光度值分别为 0.0188 \pm 0.0007、0.0379 \pm 0.0183、0.0571 \pm 0.0092、0.0814 \pm 0.0136、0.0971 \pm 0.0125, 方差分析, 组间极显著差异($P < 0.01$)。

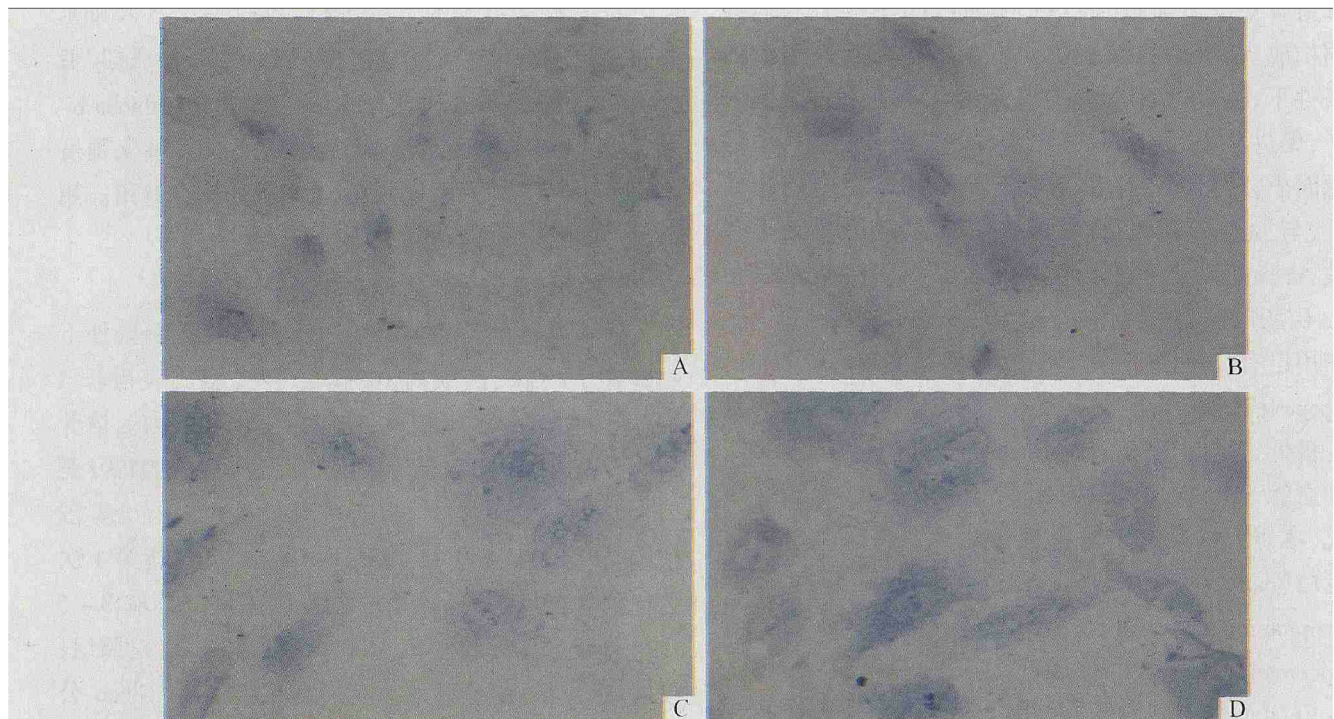


Fig 1 Expression LEVEL of MIP-1 α mRNA in cultured rabbit aortic SMCs blue granules in the cytoplasm and nuclei. A: n-LDL group; B: n-VLDL group; C: ox-LDL group; D: ox-VLDL group (in situ hybridization, 5 \times 10).

图 1 培养的兔主动脉平滑肌细胞 MIP-1 α mRNA 的表达, 胞质及核内紫蓝色颗粒

2 RT- PCR 结果

各组 SMC 的总 RNA 经逆转录成 cDNA 并扩增后, 电泳显示不同的荧光强度(图 2)。图像扫描显示, 对照组、n- LDL 组、n- VLDL 组、ox- LDL 组及 ox-

- VLDL 组泳带的积分吸光度值与相应内参照的积分吸光度值之比分别为 0.1396、0.1665、0.2088、0.2196、0.2526, n- LDL 组、n- VLDL 组、ox- LDL 组及 ox- VLDL 组均高于对照组, 特别是 ox- VLDL 组。

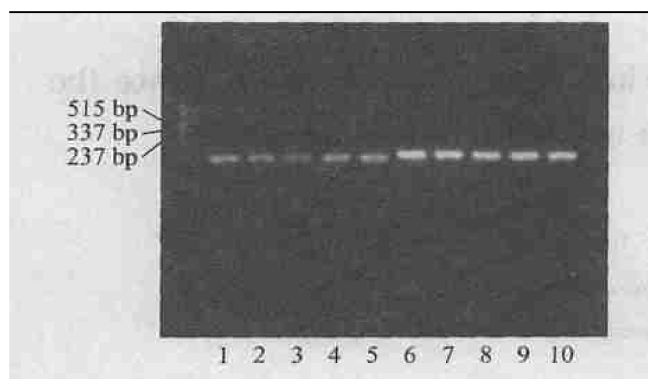


Fig 2 Expression of MIP-1 α mRNA in SMCs. Electrophoretic lands of each group by RT-PCR (land 1, 2, 3, 4, 5: MIP-1 α , 197 bp; land 6, 7, 8, 9, 10: GAPDH, 235 bp). Land 1: ox-LDL; Land 2: n-LDL; Land 3: control; Land 4: n-VLDL; Land 5: ox-VLDL.

图2 平滑肌细胞巨噬细胞炎性蛋白1 α mRNA的表达

讨 论

高脂血症作为As的独立危险因素,其血脂成分在As病变发生发展中的作用已被广泛研究,尤其低密度脂蛋白,国内外学者作了深入的研究。血管内皮细胞、血液单核细胞及其来源的巨噬细胞均可被低密度脂蛋白激活而产生多种趋化因子和粘附分子,而这些细胞因子与As病变的发生发展密切相关。我们以前的研究显示培养的兔主动脉SMC能表达多种细胞因子^[5-7],SMC本身亦能对趋化因子的诱导而产生趋化运动。天然和氧化型脂蛋白能促进血管内皮细胞和单核/巨噬细胞表达MIP-1 α MCP-1^[8-11];亦能刺激血管平滑肌细胞表达MCP-1^[7],并对SMC形态和表型产生影响,使其由“收缩型”向“合成型”转变^[12],而SMC是As斑块主要的细胞成分,“合成型”的SMC缺乏收缩能力,但其移行、增殖和分泌能力均增强,因此认为SMC向“合成型”表型转变有利于As的发生发展,SMC的功能状态与As密切相关。

随着As炎症观点逐渐受到重视,MIP-1 α 与As的关系也受到关注,但脂蛋白是否能诱导血管平滑肌细胞表达MIP-1 α ,目前文献上尚未见报道,特别针对目前我国人群膳食仍以碳水化合物为主,高脂血症亦以甘油三酯升高为多见的实际情况,研究各种脂蛋白尤其含甘油三酯量最高的VLDL在As发病机制中的作用,对我国人群具有更加重要的意义。本研究结果显示n-LDL、n-VLDL、ox-LDL及ox-VLDL均可诱导培养的SMC表达较高水平的MIP-1 α mRNA,同时,给家兔喂以高胆固醇饮食,复制高脂

血症及As模型,在其斑块中的巨噬细胞源性和肌源性泡沫细胞均表达MIP-1 α mRNA^[11],在体实验与体外实验结果基本一致。由此可见,天然及氧化型低密度和极低密度脂蛋白除了能诱导内皮细胞和单核/巨噬细胞表达趋化因子及其他细胞因子外,亦能诱导动脉SMC表达MCP-1及MIP-1 α ,从而在As病变的形成和发展中起重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis— an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115– 126.
- [2] 王淳本,宗义强,吴万生,等. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白[J]. 同济医科大学学报,1995,24(3): 169– 171.
- [3] Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation[J]. Clin Chem, 1989, 34(12): 2433– 2438.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(2): 265– 275.
- [5] 杨仕林,邓仲端,瞿智玲. 平滑肌细胞源性生长因子的部分纯化[J]. 中国动脉硬化杂志,1995,3(4): 291– 295.
- [6] 邓仲端,瞿智玲. 平滑肌细胞源性趋化因子的研究[J]. 中国动脉硬化杂志,1993,1(1): 9– 12.
- [7] Ruan QR, Deng ZD, Song JX. Very low density lipoprotein and oxidized very low density lipoprotein induce monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit aortic smooth muscle cells[J]. Chinese Med J, 1996, 109(3): 206– 209.
- [8] 瞿智玲,邓仲端,倪娟. 天然及氧化型极低密度脂蛋白诱导培养的人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白1 α [J]. 中国动脉硬化杂志,2002,10(1): 13– 15.
- [9] 王国平,邓仲端,瞿智玲. 氧化修饰极低密度脂蛋白对单核和巨噬细胞单核细胞趋化蛋白1 mRNA表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,1997,13(2): 114– 117.
- [10] Wang GP, Deng ZD, NJ, et al. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages[J]. Atherosclerosis, 1997, 133(1): 31– 36.
- [11] 张旭明,邓仲端,瞿智玲,等. 氧化型低密度和极低密度脂蛋白诱导人血单核细胞表达巨噬细胞炎性蛋白-1 α [J]. 中国动脉硬化杂志,2001,9(3): 198– 201.
- [12] 汪浩川,刘秉文,傅明德. 天然和氧化型脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞形态的影响[J]. 华西医科大学学报,1995,26(2): 146– 150.

Native and oxidized low density and very low density lipoprotein enhance the expression of MIP-1 α mRNA in aortic smooth muscle cells

QU Zhi-ling, RUAN Qiu-rong, ZHU Da-he

(Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To understand whether native and oxidized low density and very low density lipoprotein (n-LDL, n-VLDL, ox-LDL, ox-VLDL) enhance the expression of macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α mRNA in cultured aortic smooth muscle cells (SMCs). **METHODS:** Native low density and very low density lipoprotein were isolated from normal blood donors by density gradient ultracentrifugation, and were oxidatively modified by adding CuCl₂. After a 24 h-exposure of the cultured SMCs to n-LDL, n-VLDL, ox-LDL and ox-VLDL, respectively, the expression of MIP-1 α mRNA was determined by *in situ* hybridization and RT-PCR. **RESULTS:** Cultured aortic SMCs expressed MIP-1 α mRNA at low level. N-LDL, n-VLDL, ox-LDL and ox-VLDL enhanced the expression of MIP-1 α mRNA in SMCs, ox-LDL and ox-VLDL showed stronger effect than n-LDL and n-VLDL, respectively. The effect of ox-VLDL was most striking. There was a significant difference between groups ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** N-LDL, n-VLDL, especially ox-LDL and ox-VLDL, may play an important role in the formation of early atherosclerotic lesion by inducing SMCs to express MIP-1 α .

[KEY WORDS] Lipoproteins; Macrophage inflammatory protein-1; Muscle, smooth, vascular; Arteriosclerosis

《中华现代影像学杂志》《中华现代护理学杂志》征稿

《中华现代影像学杂志》《中华现代护理学杂志》为中华临床医药学会主办的医学专业学术刊物。本系列刊物为月刊,具有ISSN/CN标准刊号。现已被中华首席医学网(www.shouxi.net),全文收录。国内外读者可以网上免费阅读杂志全文。两刊贯彻党和国家的卫生工作方针政策,反映我国临床科研工作的重大进展,促进国内外学术交流,刊登影像学、护理学领域的科研成果和临床诊治经验、学术研究、技术改进,以及对临床有指导作用的专家评论,等等。

《中华现代影像学杂志》主要栏目:论著、综述、影像论坛、最新影像动态、影像与妇科疾病、前沿影像探索、影像教育、影像管理、影像与医学伦理、误诊分析、病例报告、经验交流、CT专栏、B超学专栏、肿瘤与影像、影像维修、影像与介入治疗、影像与临床等。

《中华现代护理学杂志》主要栏目:论著、综述、护理研究、康复护理、专科护理、中医护理、基础护理、个案护理、护理教学、调查分析、护理管理、社区护理、心理卫生、精神卫生、健康教育、继续教育、国际交流、经验与革新等。

两刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省/部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

本稿请寄:北京海淀区83-106信箱编辑部收(来稿请注明所投杂志名称) 邮编:100083

电话:010-62228937, 62228935; 传真:010-62221930

电子邮件:《中华现代影像学杂志》 xdyingxiang@sohu.com

《中华现代护理学杂志》 xdhuli@sohu.com