

氧化修饰低密度脂蛋白对巨噬细胞 一氧化氮合酶基因表达的影响*

刘尚喜 陈 媛 周 玫 孙曼霁¹⁾

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 氧化修饰 LDL (OX-LDL) 可抑制脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 NO 释放, 而正常 (N-LDL) 和乙酰化 LDL (AC-LDL) 则没有抑制作用. OX-LDL 对 NO 释放的抑制作用随 LDL 修饰程度的升高而增强, 且具有浓度和时间效应. 狭缝杂交结果显示 OX-LDL 处理可使 LPS 诱导的巨噬细胞 NOS mRNA 含量下降, 提示 OX-LDL 对 NO 释放的抑制作用可能发生在转录水平.

关键词 氧化修饰 LDL, 脂多糖, 巨噬细胞, 一氧化氮, 一氧化氮合酶

氧化修饰低密度脂蛋白 (OX-LDL) 与动脉粥样硬化的关系愈来愈引起人们的重视, 原因之一是 OX-LDL 可被巨噬细胞清道夫受体识别, 引起大量吞噬, 导致泡沫细胞的形成^[1,2]. 体外研究表明 OX-LDL 在被巨噬细胞大量吞噬导致泡沫细胞形成的同时, 对巨噬细胞的基因表达还可产生调控作用, 如抑制细胞因子 TNF α , IL β 等的基因表达^[3,4], 从而影响巨噬细胞的生理功能.

NO 是巨噬细胞受到细胞因子或 LPS 等激活后产生的一种重要的生物活性物质, 它是通过诱导巨噬细胞 NO 合酶 (NOS) 的基因表达, 合成大量的 NOS 催化 L-精氨酸氧化而产生的^[5,6]. 激活的巨噬细胞产生的 NO 在杀死外源微生物和肿瘤细胞方面起着重要作用^[7]. 在血管壁, 诱导型 NO 的合成可影响炎症或动脉粥样硬化 (AS) 过程中细胞和细胞之间的相互作用^[8]. 最近的研究发现 AS 斑块中 NOS 的含量和其基因表达的水平下降, 提示 NOS 合成量的下降可能参与了 AS 的发生发展^[9], 但其机制有待阐明. LDL 的氧化修饰是导致 AS 产生的重要因素, 有关 OX-LDL 对 NO 释放的影响虽已有报道^[10,11], 但对 NOS 基因表达的影响未见报道. 本文采用狭缝杂交技术观察到 OX-LDL 对 LPS 诱导的巨噬细胞 NOS 基

因表达具有抑制作用.

1 材料与方法

1.1 LDL 和无脂血清的制备

人血浆 LDL ($\rho = 1.040 \sim 1.063$ g/ml) 和 LPDS ($\rho > 1.25$ g/ml) 采用一次性密度超速离心法制备^[12]. 新鲜人血液购自南方医院血库, 不抗凝, 室温低速离心分离血清, 用 KBr 调密度至 1.30 g/ml, 4℃ 50 000 r/min 5 h, 分别收集 LDL 和 LPDS, 4℃ 于 PBS 中透析 48 h, 超滤除菌后 4℃ 保存.

1.2 LDL 的修饰及修饰程度鉴定

LDL 的氧化修饰采用本室建立的方法^[13], 无 EDTA LDL (1 g/L) 置含 5 μ mol/L Cu²⁺ 的 PBS 中, 37℃ 温育 24 h; 不同氧化修饰程度 LDL 的制备采用 37℃ 温育不同时间. 修饰后的 LDL 置含 200 μ mol/L EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 超滤除菌后 4℃ 保存.

LDL 的乙酰化修饰采用 Basu 等^[14]建立的方法.

修饰程度鉴定采用琼脂糖凝胶电泳法和硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 测定法^[2].

* 国家自然科学基金资助项目 39470191.

¹⁾ 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850.

收稿日期: 1996-03-12, 修回日期: 1996-07-03

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞(MPM)的制备和培养

NIH 小鼠 (20 ± 2) g 购自本校实验动物中心, 拉颈处死, 用 70% 酒精消毒, 往腹腔注射无血清 RPMI 1640 培养基 (GIBCO), 收集腹腔液, 1000 r/min 10 min, 收集细胞, 用含 10% 小牛血清的 1640 调整细胞浓度, 根据需要接种于 96 孔板或 100 ml 培养瓶中, 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养, 2 h 后洗去未贴壁细胞, 根据需要加入含不同成分的培养基继续培养.

1.4 亚硝酸盐测定

参照参考文献 [15] 的方法, 细胞接种于 96 孔板, 经不同的 LDL 处理后, 用 LPS 刺激 24 h, 取上清培养液加入等量的 Greiss 试剂 (1% 对氨基苯磺酸, 0.1% N-萘基二乙胺, 2.5% 磷酸), 室温放置 10 min, 560 nm 比色, 用亚硝酸钠为标准, 求出亚硝酸盐的含量.

1.5 细胞 NOS mRNA 含量分析

细胞接种于 100 ml 培养瓶, 用 OX-LDL (50 mg/L) 处理 24 h, 然后用 LPS (1 mg/L) 刺激 6 h. 细胞总 RNA 用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步提取法提取^[16], mRNA 采用 Oligo-dT 纤维素吸附法提取. 狭缝杂交采用经典方法^[17]. NOS cDNA 探针由美国 Robert 博士赠送^[18], 用地高辛标记 (Boehringer Mannheim 地高辛标记试剂盒). 杂交后用化学发光法检测 (Boehringer Mannheim 地高辛化学发光检测试剂盒). 用 G3PDH 探针第二杂交作为内对照.

1.6 细胞活性测定

OX-LDL 对巨噬细胞的毒性测定采用台盼蓝排法. 细胞经 OX-LDL 处理后, 90% 以上的细胞是活细胞.

2 结 果

2.1 OX-LDL 对 MPM NO 释放的抑制作用

MPM 经正常 LDL (N-LDL)、MDA-LDL、AC-LDL 和 OX-LDL (氧化 24 h) 处理 24 h 后用 LPS 刺激 24 h, 取培养上清液测定亚硝酸盐的含量, 发现 OX-LDL 对 LPS 诱导的 NO 释放具有抑制作用, 而 N-LDL、MDA-LDL 和 AC-LDL 则没有抑制作用 (图 1).

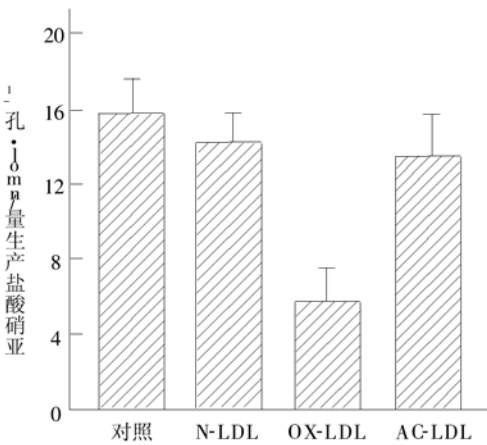


图 1 N-LDL、AC-LDL 和 OX-LDL (50 mg/L) 对 LPS 诱导 MPM NO 释放的影响

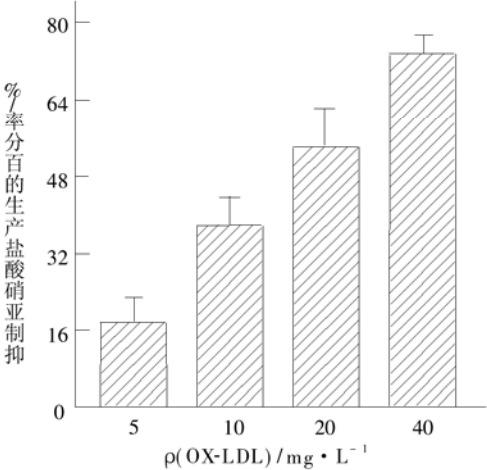


图 2 不同浓度 OX-LDL 对 LPS 诱导的 MPM NO 释放的抑制作用

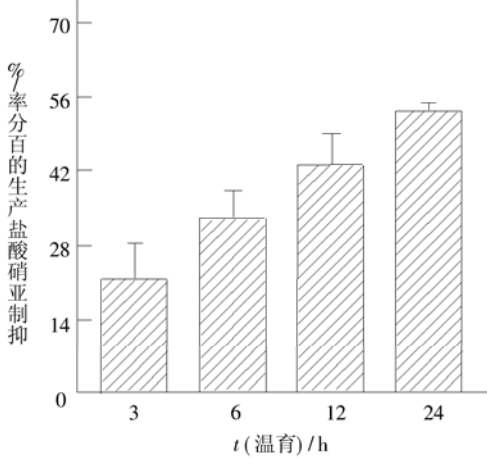


图 3 OX-LDL (40 mg/L) 抑制 LPS 诱导的 MPM NO 释放的时间效应

用不同浓度 OX-LDL 处理细胞及用同一浓度处理不同时间, 发现 OX-LDL 对 NO 释放的抑制具有浓度和时间效应 (图 2, 3)。

用不同氧化修饰程度的 LDL (37℃ 氧化不同时间) 处理 MPM, 发现 OX-LDL 对 NO 释放的抑制作用随修饰程度的升高而增强 (图 4)。

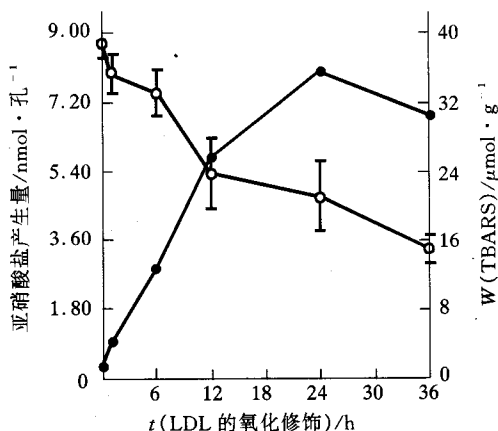


图 4 不同氧化修饰程度 LDL 对 LPS 诱导的 MPM NO 释放的抑制作用

○—○: 亚硝酸盐; ●—●: TBARS.

2.2 OX-LDL 对 MPM NOS 基因表达的影响

MPM 经 OX-LDL 处理后用 LPS 诱导, 提取细胞总 RNA 和 mRNA, 与 NOS 基因探针进行狭缝杂交, 发现 OX-LDL 可以抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NOS 的基因表达 (图 5)。

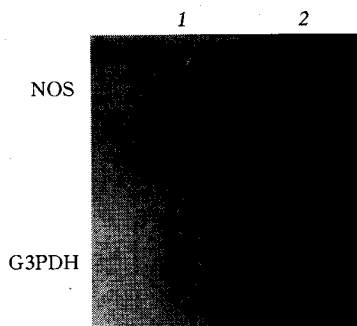


图 5 OX-LDL 对 LPS 诱导的 MPM NOS mRNA 含量的影响

1: 对照组; 2: OX-LDL 处理组.

3 讨 论

OX-LDL 抑制 NO 产生及其生物学功能的研究已有很多报道, 但其机制尚未阐明^[10,11]. Yang 报道 OX-LDL 可能通过抑制 NOS 活性抑制巨噬细胞 NO 的产生^[11], 但 Bolton 等^[10]的研究表明 OX-LDL 对 NOS 活性没有影响. 我们的研究表明 OX-LDL 可能象抑制 TNF 和 IL-1 基因表达那样^[3,4], 通过抑制 NOS 的基因表达抑制 NO 的产生. 这种抑制作用可能不是通过损伤效应产生的, 因为细胞经 OX-LDL 处理 24 h 后, 用台盼蓝染色显示 90% 以上的细胞仍为活细胞, 而且时间效应显示短时间处理就有抑制作用. 不同修饰程度 LDL 抑制作用效果显示抑制作用随修饰程度的升高而增强, 推测 LDL 氧化修饰过程中产生了某种新的成分, 其具有抑制 NOS 基因表达的作用. LDL 氧化修饰后新产生的成分主要有以下几种: 脂质过氧化物, 活性醛类物质, 溶血卵磷脂, 氧化胆固醇等, 其中溶血卵磷脂已被证实没有抑制作用^[11], 其他几种成分究竟哪一种具有抑制作用还有待进一步研究.

诱导型 NO 的合成在维持血管壁舒张平衡, 防止 AS 发生方面起着重要作用^[6,8], 已有研究发现 AS 患者心脑血管壁 NO 的基础和刺激释放量下降^[19], AS 斑块中 NOS 活性及其基因表达量下降^[9], 说明 NO 释放量的下降与 AS 的发生密切相关. OX-LDL 抑制诱导型 NO 的合成可能是其导致 AS 发生的一个重要原因.

参 考 文 献

- 1 陈 媛, 周 玫. 脂质过氧化与动脉粥样硬化. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16 (4): 278~282
- 2 Witztum J L, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest, 1991, 88: 1785~1792
- 3 Hamilton T A, Ma G P, Chisolm G M. Oxidized low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor-α mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. J Immunol, 1990, 144: 2343~2350

4 Fong L G, Fong T A, Coper A D. Inhibition of lipopolysacchride induced interleukin 1 beta mRNA expression in mouse macrophages by oxidized low density lipoprotein. J Lipid Res, 1991, **32**: 1899~ 1910

5 Marletta M A, Yoon P S, Iyengar R *et al.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry, 1988, **27**: 8706~ 8711

6 Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, **43d**: 109~ 142

7 Stuehr D J, Nathan C F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J Exp Med, 1989, **169**: 1543~ 1555

8 Rees D D, Celtek S, Palmer R M J *et al.* Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. Biochem Biophys Res Commun, 1990, **173**: 541~ 547

9 宋良文, 王雪涛, 张秉钧等. 内皮素和一氧化氮合酶在家兔动脉粥样硬化斑块中的表达. 中国动脉硬化杂志, 1994, **2** (1): 18~ 22

10 Bolton E J, Jessup W, Stanley K K *et al.* Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cells and their failure to secrete nitric oxide. Atherosclerosis, 1994, **106**: 213~ 223

11 Yang X, Cai B, Sciacca R S *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. Circulation Res, 1994, **74** (2): 318~ 328

12 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. 生物化学与生物物理学报, 1989, **21** (3): 257 ~ 261

13 刘尚喜, 周玫, 陈瑗. 低密度脂蛋白的氧化修饰和丙二醛修饰的比较研究. 生物化学与生物物理学报, 1992, **24** (6): 569~ 574

14 Basu S K, Goldstein J L, Anderson R G *et al.* Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, **73**: 3178~ 3182

15 Green L C, Wagner S A, Glogowski J *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 1982, **126**: 131~ 138

16 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, **162**: 156~ 159

17 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京:

科学出版社, 1992. 372~ 373

18 Robert B L, William J M, Charles J L *et al.* Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. J Biochem, 1993, **268**: 1908~ 1913

19 Chester A H, O' Neil G S, Moncada S *et al.* Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. The Lancet, 1990, **336**: 897~ 900

Inhibition of Oxidized Low Density Lipoprotein on Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Mouse Peritoneal Macrophages. LIU Shangxi, CHEN Yuan, ZHOU Mei (*Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University of PLA, Guangzhou 510515, China*); SUN Manji (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The effect of N-LDL, AG-LDL and OX-LDL on the production of nitric oxide (NO) and expression of nitric oxide synthase (NOS) in mouse peritoneal macrophages stimulated by LPS was studied by measuring nitrite in media and mRNA for NOS in macrophages. The results showed that OX-LDL could inhibit NO production in macrophages stimulated by LPS, but N-LDL and AG-LDL could not. The inhibitory effect of OX-LDL was enhanced with the increase of the degree of oxidation of LDL and was time and concentration dependent. Results obtained from slot hybridization showed that OX-LDL could decrease the content of mRNA for NOS in macrophages induced by LPS, which implies that inhibition of NO production of OX-LDL was taken place at the level of transcription.

Key Words oxidized low density lipoprotein, mouse peritoneal macrophages, nitric oxide, nitric oxide synthase