

· 临床研究 ·

氧化型低密度脂蛋白对单核细胞表达尿激酶型纤溶酶原激活物受体的影响

钱 赓*, 陈 未, 陈光辉, 易 军, 陈韵岱

(解放军总医院心血管内科, 北京 100853)

【摘要】 目的 探讨不同浓度的氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)对外周培养单核细胞表达尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uPAR)的影响。方法 采用密度梯度离心法及黏附法分离、提取并纯化健康人外周血单核细胞, 对原代培养的单核细胞分别加入 25, 50, 100 mg/L 浓度的 oxLDL, 分别培养 12, 24, 48 h, 测定单核细胞的 uPAR 蛋白表达量及 uPAR mRNA 的水平变化。药物干预组加入含阿托伐他汀(终浓度为 5.0 μmo/L)和 50 mg/L 的 ox-LDL 的培养液培养 12, 24, 48 h, 同样方法测定单核细胞的 uPAR 蛋白表达量及 uPAR mRNA 的水平变化。结果 与正常组比较, oxLDL 刺激组单核细胞 uPAR 蛋白表达水平有显著升高, 并呈剂量依赖关系; oxLDL 刺激组单核细胞 uPAR mRNA 的合成量被显著上调。阿托伐他汀干预组 uPAR 蛋白的表达水平及 uPAR mRNA 合成量的刺激效果均被显著抑制。结论 oxLDL 刺激单核细胞高表达 uPAR 是通过转录水平的上调来刺激蛋白质合成增加的; 阿托伐他汀对 uPAR 表达的抑制是通过下调 uPAR 转录水平来实现的。

【关键词】 动脉粥样硬化; 单核细胞; 尿纤溶酶原激活物; 受体; 低密度脂蛋白

【中图分类号】 R392.12

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)02-0125-03

Effects of oxidized low density lipoprotein on urokinase type plasminogen activator receptor expressions in monocytes

QIAN Geng*, CHEN Wei, CHEN Guanghui, YI Jun, CHEN Yundai

(Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective To investigate urokinase type plasminogen activator receptor(uPAR) expressions in cultured monocytes after exposure to different concentrations of oxidized low density lipoprotein(oxLDL). **Methods** Monocytes were isolated from healthy volunteers and purified by density gradient centrifugation and adhering assay. The monocytes were incubated with different concentrations of oxLDL (25, 50, and 100 mg/L) for 12, 24 and 48 hours. The expressions of uPAR protein and mRNA were detected with ELISA and RT-PCR respectively. Atorvastatin (5.0 μmo/L) was added to 50 mg/L oxLDL culture. After 12, 24, and 48 hours, the expressions of uPAR protein and mRNA were also detected. **Results** oxLDL stimulated the expressions of uPAR in monocytes in a concentration-dependent manner. The stimulating effects at moderate concentration of oxLDL (50 mg/L) were significantly inhibited by atorvastatin. **Conclusion** OxLDL significantly increases the expression of uPAR protein through upregulating the uPAR mRNA expression, and atorvastatin inhibits the expression of uPAR through downregulating the uPAR mRNA expression.

【Key words】 atherosclerosis; monocytes; urokinase type plasminogen activator; receptor; low density lipoprotein

表达于单核细胞上的尿激酶型纤溶酶原激活物受体(urokinase type plasminogen activator receptor, uPAR)参与介导了单核细胞对细胞外基质的酶解以及单核细胞黏附、浸润和迁移的过程。我们以往的研究发现, 急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者外周血单核细胞上 uPAR 的表达量较正常人有显著升高, 并且在动脉粥样硬化斑块的免疫组化检查中发现了高表达的 uPAR, uPAR 主要表达

于粥样斑块的肩部和脂质池, 与巨噬细胞、泡沫细胞及迁移的平滑肌细胞的分布区域吻合, uPAR 的表达量与动脉粥样硬化病变的严重程度呈正相关。单核细胞上表达的 uPAR 与冠心病本身存在怎样的因果关系有待于进一步研究。单核细胞是粥样斑块内泡沫细胞的唯一来源, 血脂异常是致动脉粥样硬化的重要危险因素。他汀类不仅可降低胆固醇水平, 而且有很多降脂以外的作用, 如改善内皮功能, 抑

制炎症,减少基质金属蛋白酶(MMPs)的合成而增加斑块的稳定性等。有研究证实,终浓度为 5.0 μmol/L 阿托伐他汀可以抑制单核巨噬细胞的黏附及迁移能力,国内外尚无阿托伐他汀对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)刺激单核细胞生成 uPAR 影响的研究。我们试图通过对体外培养的单核细胞分别加入 oxLDL 及阿托伐他汀,研究 oxLDL 对单核细胞表达 uPAR 的影响以及阿托伐他汀的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成人外周血 100 ml,健康志愿人员提供,并签署知情同意书;oxLDL,中国医学科学院基础所生化室提供;uPAR 试剂盒,Assaypro 公司提供;阿托伐他汀原液,由红惠医药有限公司惠赠;CD14-FITC, BD 公司提供;uPAR 引物:上游:5'-CGG GCTCCAATGGTTTCC-3';下游:5'-TTAGCAGGG TGATGGTGAGG-3';产物长度 441 bp。β-actin 引物:上游:5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGC-3';下游:5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACG-3';产物长度 1100 bp。

1.2 单核细胞的分离、培养和鉴定

无菌条件下取健康成人外周血(由志愿人员提供),采用密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞,按 $2 \times 10^5/cm^2$ 的浓度加入至胎牛血清处理的培养板,再加入 RPMI 1640 培养基充分混匀,采用黏附法纯化外周血单核细胞。通过 HE 染色和 CD14-FITC 免疫荧光染色鉴定细胞。

1.3 实验分组测 uPAR 抗原的表达

培养 1 d 后加入刺激物 oxLDL。加入 oxLDL 的终浓度分别为 25, 50, 100 mg/L 三组,同时设置空白对照组(加入同体积、无刺激物的培养基作用同样的条件),各组分别在加入刺激物 12, 24, 48 h 后终止培养,并采用 ELISA 法测单核细胞上 uPAR 抗原的表达,采用半定量 RT-PCR 方法分析 oxLDL 对单核细胞 uPAR mRNA 表达的刺激作用。

1.4 阿托伐他汀干预 oxLDL 对 uPAR 表达的刺激作用

在单核细胞培养过程中加入阿托伐他汀(终浓度为 5.0 μmol/L)和 50 μmg/L 终浓度的 oxLDL 共同作用 12, 24, 48 h, ELISA 法测单核细胞上 uPAR 抗原的表达,采用半定量 RT-PCR 方法分析阿托伐他汀对单

核细胞 uPAR mRNA 表达的干预效果。

1.5 统计学处理

检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析用 SPSS16.0 软件,各组的值进行正态性检验,符合正态分布的组间比较用 *t* 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察与免疫化学鉴定

密度梯度离心法分离的人单核细胞种植于细胞培养板 2 h 后,表现出很强的黏附能力,呈贴壁生长,通过反复用细胞培养液冲洗进一步纯化分离到的单核细胞,分离培养的单核细胞黏附能力强,72 h 后细胞开始分化成巨噬细胞,表现为由圆形变为不规则的多角形,生出许多板状和丝状伪足,黏附于培养板上,并且多个细胞聚集成团。

单核细胞是体积最大的白细胞,核为肾形、马蹄形,胞浆较淋巴细胞丰富,通过 HE 染色很好辨认。进一步经免疫细胞化学鉴定,培养的单核细胞上可见特异性的 CD14 阳性着色,被 CD14-FITC 染成绿色,证明培养的细胞确为单核细胞。

2.2 oxLDL 刺激单核细胞 uPAR 蛋白水平的变化

空白对照组:uPAR 蛋白表达水平随培养过程缓慢升高,并在 24 h 达到高峰后开始下降。oxLDL 刺激组:在刺激后的 24 h, 48 h, uPAR 水平较正常对照组有显著升高($P < 0.01$)。在培养的 24 h, uPAR 表达量与 oxLDL 刺激浓度有显著相关性,相关系数(*r*)为 0.98($P < 0.01$)。阿托伐他汀干预组:在各时间点较 50 mg/L oxLDL 刺激组的 uPAR 表达水平有显著降低($P < 0.05$)。各指标测定值的变异系数(CV)均小于 15%(表 1)。

表 1 不同浓度 oxLDL 对单核细胞表达 uPAR 水平的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s, \mu g/L$)

组别	刺激时间			
	0 h	12 h	24 h	48 h
对照组	2.24 ± 0.02	2.56 ± 0.04	2.91 ± 0.27	1.73 ± 0.15
oxLDL 25 mg/L 组	2.24 ± 0.02	2.30 ± 0.17	3.34 ± 0.24*	4.64 ± 0.17*
oxLDL 50 mg/L 组	2.24 ± 0.02	3.30 ± 0.19*	4.09 ± 0.25*	4.03 ± 0.39*
oxLDL 100 mg/L 组	2.24 ± 0.02	4.74 ± 0.18*	6.40 ± 0.70*	2.47 ± 0.21
阿托伐他汀 +oxLDL 50 mg/L 组	2.24 ± 0.02	2.09 ± 0.26#	2.10 ± 0.21#	1.32 ± 0.13#

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 oxLDL 50 mg/L 组比较, # $P < 0.05$

2.3 oxLDL 刺激单核细胞 uPAR mRNA 水平变化

oxLDL 刺激组单核细胞的 uPAR mRNA 水平迅速增加, 刺激组在 12, 24 h 显著高于同时间点的空白对照组 ($P < 0.05$)。加入阿托伐他汀后, 各时间点的 uPAR mRNA 水平较单纯刺激组显著降低, oxLDL 引起的 mRNA 升高作用被显著抑制 ($P < 0.05$)。各指标测定值的 CV 均小于 15% (表 2, 图 1)。

表 2 oxLDL 对单核细胞 uPAR mRNA/ β -actin mRNA 相对值比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.89 ± 0.10	1.11 ± 0.12	1.24 ± 0.10	0.92 ± 0.08
oxLDL 50mg/L 组	0.89 ± 0.10	1.38 ± 0.21*	1.47 ± 0.03*	1.02 ± 0.13
阿托伐他汀+ oxLDL 50mg/L 组	0.89 ± 0.10	0.84 ± 0.11#	1.02 ± 0.14#	0.72 ± 0.07#

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 oxLDL 50 mg/L 组比较, # $P < 0.05$

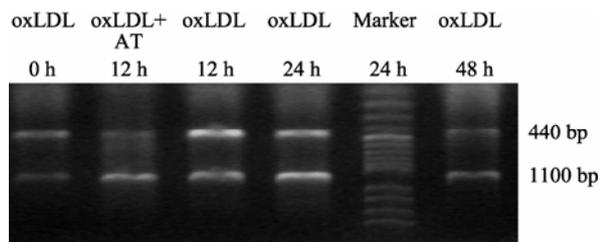


图 1 RT-PCR 检测 oxLDL 对单核细胞 uPAR mRNA 表达水平的影响

3 讨论

血脂异常是诱发动脉粥样硬化的独立危险因素, 已有文献报道单纯高脂血症患者外周血单核细胞上表达 uPAR 的水平较正常对照组增加 2.1 倍, 在校正了各组年龄、体重和超敏 C 反应蛋白后, 上述差异仍然存在^[1]。在对不同阶段的动脉粥样硬化的病理剖也发现, uPAR 表达量随病变严重性逐渐增加, 晚期病变(纤维斑块期)uPAR 水平较早期病变(脂质条纹期)高近 20 倍, uPAR 的表达主要集中于内膜下的单核巨噬泡沫细胞以及迁移至内膜下的平滑肌细胞上, 病变动脉的内膜下约 60% 的单核巨噬细胞有 uPAR 分子。高表达的 uPAR 到底是冠状动脉粥样硬化的因还是果? 有必要进一步探讨作为冠心病高危因素的脂质异常与 uPAR 表达的关系。

我们通过体外刺激干预的方法研究证实, 单核细胞在不加刺激物时表达的 uPAR 量很低, 在贴壁黏附的过程中, uPAR 的表达会缓慢升高, 这可能与单

核细胞向巨噬细胞分化有关。在给予 oxLDL 24h 后 uPAR 的表达水平显著增高, 并呈刺激剂量依赖关系, 作为冠心病的危险因素的 oxLDL 可以显著增加单核细胞表面表达 uPAR, 而且是通过上调转录水平实现的, 这与上述的单纯血脂异常的患者单核细胞高表达 uPAR 分子的临床研究相符。Assmann 等^[2]证实游离脂肪酸也可刺激 uPAR 分子表达, 多不饱和脂肪酸较单不饱和脂肪酸有更强的刺激作用, uPAR mRNA 转录水平的升高依赖的是 p38 MAP 激酶 (MAPKK) 信号传导途径。

高表达 uPAR 的单核细胞更易浸润细胞外基质, 吞噬脂质成为巨噬泡沫细胞, 造成冠脉及外周动脉的粥样硬化狭窄乃至不稳定的粥样斑块, 在冠脉及外周动脉的斑块破裂处已经检出了高表达 uPAR 的单核巨噬细胞^[3,4]。ACS 患者的 uPAR 表达水平较稳定型心绞痛组和健康志愿者组均显著升高, 且与患者的预后有关^[5]。体外和体内的实验基础使我们有理由推测, 体内脂质水平异常可能在冠心病发病之前就已经显著刺激外周血单核细胞表面的 uPAR 的表达, 为单核细胞在高炎症状态下浸润内皮吞噬脂质做好功能上的准备。研究 uPAR 表达水平对于斑块不稳定的预测价值以及如何干预 uPAR 来影响粥样硬化的形成过程, 将丰富和完善动脉粥样硬化机制的研究, 并可能找到粥样硬化治疗新靶点。

【参考文献】

- [1] 陈 未, 陈连凤, 朱文玲. 冠心病危险因素促使人外周血单核细胞高表达尿激酶型纤溶酶原激活物受体的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(2): 167-169.
- [2] Assmann A, Möhlig M, Osterhoff M, et al. Fatty acids differentially modify the expression of urokinase type plasminogen activator receptor in monocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376(1): 196-199.
- [3] Svensson PA, Olson FJ, Hagg DA, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor is associated with macrophages and plaque rupture in symptomatic carotid atherosclerosis[J]. Int J Mol Med, 2008, 22(4): 459-464.
- [4] 陈 未, 陈连凤, 尹洪超, 等. 人股动脉粥样硬化斑块内尿激酶型纤溶酶原激活物受体的表达[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(10): 897-901.
- [5] 钱 赓, 易 军, 陈韵岱. 单核细胞尿激酶型纤溶酶原激活物受体表达水平与冠状动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J]. 中华老年多器官杂志, 2010, 9(2): 123-126.