

· 基础研究 ·

低密度脂蛋白免疫复合物对巨噬细胞细胞因子分泌的影响

倪晓晴 朱健华 姜胜华 王忠勇

【摘要】 目的 探讨低密度脂蛋白免疫复合物(LDL-IC)对巨噬细胞细胞因子分泌的影响。方法 设立终浓度均为 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 LDL 组、LDL-IC 组、IgG-IC 组及阴性对照组与细胞孵育相同时间,以 ELISA 法检测比较培养上清 TNF- α 和 IL-1 β 水平。并观察不同 LDL-IC 浓度(0, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$)作用相同时间以及终浓度为 150 $\mu\text{g/ml}$ 的 LDL-IC 与细胞作用不同的时间(0, 3, 6, 12, 24, 36 h),培养上清 TNF- α 和 IL-1 β 水平。结果 LDL-IC 组培养上清 TNF- α 、IL-1 β 水平均明显高于 LDL、IgG-IC 及阴性对照组。TNF- α 、IL-1 β 水平随着 LDL-IC 作用浓度的增加和作用时间的延长而增高。结论 LDL-IC 可以显著增加细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌,具有剂量和时间依赖效应。提示 LDL-IC 能通过增加细胞因子分泌而在动脉粥样硬化中起重要作用。

【关键词】 脂蛋白类, LDL 胆固醇; 抗原抗体复合物; 单核巨噬细胞; 动脉硬化

The effect of LDL-containing immune complexes on the secretion of cytokines in macrophages

NI Xiaoping, ZHU Jianhua, JIANG Shenghua, et al

Department of Geriatric Disease, the First Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, China

【Abstract】 Objective To study the effect of LDL-containing immune complexes (LDL-IC) on the secretion of cytokines in macrophages. Methods Four matched groups were set namely 150 $\mu\text{g/ml}$ of LDL-IC, native LDL, immune complexes of IgG (IgG-IC) and negative control, and incubated with macrophages for the same duration. The concentrations of TNF- α and IL-1 β in the supernatant were determined by enzyme linked immunosorbent assay. Moreover, for investigating the changes of the secretion of the cytokines, the macrophages were incubated with different concentrations of LDL-IC (0, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/ml}$) or with 150 $\mu\text{g/ml}$ LDL-IC for different periods (0, 3, 6, 12, 24, 36 h). Results The TNF- α and IL-1 β levels of the cells treated with LDL-IC were higher than the groups treated with LDL, IgG-IC and negative control ($P < 0.01$). The TNF- α and IL-1 β levels were increased with increasing LDL-IC concentration and prolonging incubation time. Conclusions The secretion of TNF- α and IL-1 β was markedly increased after the cells were incubated with LDL-IC and there were dose-and time-dependent effects. LDL-IC may play an important role in the development of atherosclerosis by interference of cytokine secretion.

【Key words】 lipoproteins, LDL cholesterol; antigen-antibody complex; monocyte-derived macrophage; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一个影响多脏器的多因素疾病。目前已经公认低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在 AS 中起重要致病作用。已知 LDL 有多种氧化及修饰形式,其中低密度脂蛋白免疫复合物(low density lipoprotein containing immune complex, LDL-IC)是 LDL 的一种免疫修饰形式。在临床研究中发现,冠状动脉粥样硬化性心脏病患者不仅抗 LDL 抗体活性增高而且 LDL-IC 水平高于对照组,心肌梗死患者具有较高的循环免疫复合物水平,LDL 更多以抗原的形式包含于其中^[1]。一项前瞻性流行病学在 8 年中

对 98 名糖尿病患者调查研究表明,LDL-IC 的浓度与冠状动脉病变进展有关^[2]。Bing 等^[3]在临床冠心病患者中发现血清 oxLDL 水平与循环 LDL 免疫复合物水平呈正相关。这些提示,在循环和(或)组织中存在的包含低密度脂蛋白的免疫复合物,在 AS 过程中可能扮演了更重要的角色。Huang 等^[4]认为,由人 LDL 与兔抗 LDL 形成的免疫复合物可作为研究 LDL-IC 与巨噬细胞相互作用的模型,常用来体外研究 LDL-IC 的致动脉硬化作用。在 AS 过程中 LDL-IC 对巨噬细胞作用的有关研究国内尚未见报道。我们通过佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导的 THP-1 细胞形成巨噬细胞,观察 LDL-IC 对巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)分泌的作用。

收稿日期:2004-08-23

作者单位:226001 南通市,南通大学第一附属医院老年科

作者简介:倪晓晴,女,1973 年 9 月生,江苏启东人,医学硕士,主治医师。E-mail: nixiao1973@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 材料 单核细胞株 THP-1 来自上海细胞所, LDL 购自美国 Calbiochem 公司, 系人血浆超速离心所得; 抗 LDL 抗体购自上海明华体外诊断公司; RPMI1640 培养基和特级胎牛血清均购自 Gibco 公司, 无脂人白蛋白购自美国 Sigma 公司, 佛波酯购自美国 Alexis 公司, TNF- α 与 IL-1 β ELISA 试剂盒均购自美国 TPI 公司。

1.2 LDL-IC 的制备 100 μ l 抗 LDL 与不同 LDL (5~1000 μ l) 以不同比例混合, 根据抗原抗体反应吸光度曲线, 确定产生最多量沉淀物的比例是 1:10 (wt/wt)。同样用人 IgG 和兔抗人 IgG 制备对照免疫复合物。将免疫复合物 2000 r/min 离心, 沉淀重溶于 0.01 mol/L PBS 溶液, Lowry 法测定 LDL-IC 蛋白含量及对照免疫复合物的蛋白含量。

1.3 细胞培养 THP-1 细胞生长于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 细胞密度在 1.0×10^6 /ml 左右、活力 > 95% 时用于实验。调整各瓶细胞数相等, 加入终浓度为 100 ng/ml 的 PMA 孵育 36 h, 弃悬浮细胞及培养液, 预温 $1 \times$ PBS 轻洗 1 次, 加入等量无血清无脂的 1640 培养基分组实验。

1.4 分组 (1) 分为 LDL 组、LDL-IC 组、阴性对照组、IgG-IC 组共 4 组。除阴性对照组外, 其余物质终浓度均为 150 μ g/ml, 均与细胞作用 36 h。每组重复 3 次。(2) 不同浓度的 LDL-IC 与细胞孵育 36 h: 分别加入终浓度为 0, 50, 100, 150, 200, 250 μ g/ml 的 LDL-IC, 观察培养上清 TNF- α 、IL-1 β 含量的变化。重复实验 3 次。(3) 同一浓度的 LDL-IC 与细胞作用不同时间: 选择终浓度为 150 μ g/ml 的 LDL-IC 分别与细胞孵育 0, 3, 6, 12, 24, 36 h, 观察培养上清 TNF- α 、IL-1 β 含量的变化。重复实验 3 次。(4) 培养上清 TNF- α 的测定: 反应板中分别加入 5 μ l 标准品、5 μ l 样品, 混匀 10 s。每孔加入 200 μ l Biotin anti TNF- α , 37 $^{\circ}$ C 30 min, 洗板, 再加入 150 μ l 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP), 37 $^{\circ}$ C 30 min, 洗板后显色 20 min, 450 nm 处读 OD 值。以不同浓度的标准品所对应的 OD 值绘制标准曲线, 在标准曲线上查出所测样本的浓度。(5) 培养上清 IL-1 β 的测定: 反应板中加入 10 μ l 标准品、10 μ l 样品。每孔加入 50 μ l Anti IL-1 β Biotin 和 50 μ l Anti IL-1 β POD, 混匀 30 s, 室温 45 min, 洗板后显色 20 min。450 nm 处读 OD 值。根据标准品浓度对应的 OD 值绘制标准曲线, 在标准曲线上查出所测样本的浓度。

1.5 统计学处理 各数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数的比较采用单因素方差分析, 方差分析后两两比较用 Scheffe 法。以 $P < 0.05$ 表示差异的显著性意义。

2 结果

2.1 不同组别 TNF 比较 LDL 组 (1685.8 ± 72.4) pg/ml、LDL-IC 组 (2756.7 ± 34.7) pg/ml、IgG-IC 组 (2052.9 ± 22.2) pg/ml 与阴性对照组 (121.9 ± 22.6) pg/ml 比较, TNF- α 均有不同程度的升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其中 LDL-IC 组 TNF- α 的含量最高, 与 LDL 组及 IgG-IC 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。可见, LDL、LDL-IC、IgG-IC 都能显著促进细胞因子 TNF- α 的分泌, 但 LDL-IC 的效应最强 (图 1)。

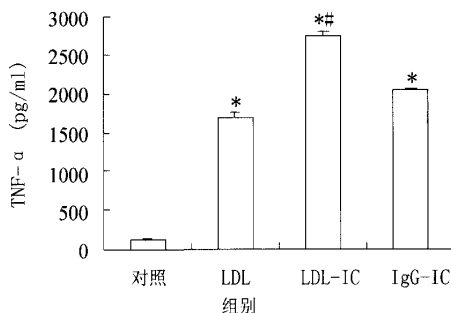


图1 不同组别细胞培养上清 TNF- α 含量比较
与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与 LDL、IgG-IC 组比较, # $P < 0.01$

2.2 不同组别 IL-1 β 的比较 阴性组与 LDL 组的 IL-1 β 含量极低, 不在试剂盒的检测范围内。LDL-IC 组 IL-1 β 含量为 (12.00 ± 0.36) pg/ml, IgG-IC 组为 (1.50 ± 0.50) pg/ml, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。说明 LDL-IC 能较 IgG-IC、LDL 明显增加 IL-1 β 的产生 (图 2)。

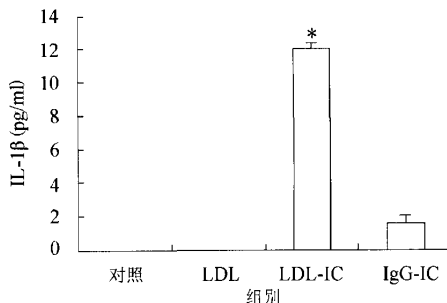


图2 不同组别培养上清 IL-1 β 含量的比较
与 IgG-IC 组比较, * $P < 0.01$

2.3 不同 LDL-IC 浓度对上清细胞因子的影响 (1)

不同 LDL-IC 浓度对 TNF- α 的影响: 随 LDL-IC 浓度增加, TNF- α 的变化呈递增趋势。在 0~150 $\mu\text{g/ml}$ 范围内, TNF- α 的值上升较快, 几乎呈直线上升, 0 $\mu\text{g/ml}$ 时为 (121.9 $\pm$ 22.6) pg/ml, 50 $\mu\text{g/ml}$ 时 (1280.9 $\pm$ 34.4) pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 时 (1862.7 $\pm$ 31.7) pg/ml, 150 $\mu\text{g/ml}$ 时 (2756.7 $\pm$ 34.7) pg/ml; 相邻点间比较, P 均 < 0.01, 当 LDL-IC 浓度继续升高时, TNF- α 的值处于较高水平, 变化趋于平缓, 150 $\mu\text{g/ml}$ 与 200 $\mu\text{g/ml}$ 时 (2687.7 $\pm$ 38.0) pg/ml, 250 $\mu\text{g/ml}$ 时 (2708.2 $\pm$ 22.8) pg/ml, 两两比较 $P > 0.05$; 图 3。(2) 不同浓度 LDL-IC 作用下 IL-1 β 的变化: LDL-IC 浓度 ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ 时, IL-1 β 值较低, 不在试剂盒可检测的线性范围内, 故没有明显上升。在 LDL-IC 浓度达到 150 $\mu\text{g/ml}$ 时, 出现了 IL-1 β 的分泌明显地增加 (12.00 $\pm$ 0.36) pg/ml, 而 LDL-IC 浓度继续增加, IL-1 β 含量处于较高水平, 变化没有统计学意义 ($P > 0.05$; 图 4)。

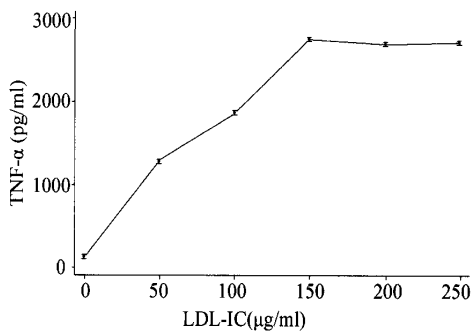


图 3 不同 LDL-IC 浓度孵育 36 h 上清 TNF- α 的变化

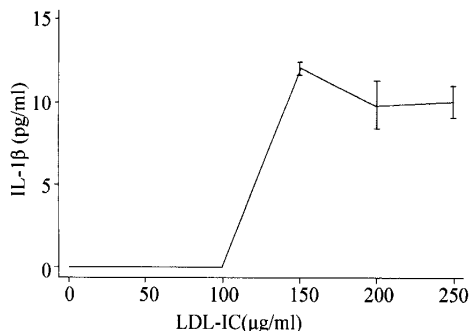


图 4 培养上清 IL-1 β 含量随 LDL-IC 浓度的变化

2.4 不同作用时间对细胞因子的影响 (1)

不同作用时间 TNF- α 的变化: 随着作用时间的延长, TNF- α 亦逐步上升。在 0~24 h 内上升早而迅速, 由 0~3 h

(862.73 $\pm$ 9.67) pg/ml, 6 h (1198.90 $\pm$ 17.32) pg/ml, 12 h (1531.90 $\pm$ 67.85) pg/ml, 24 h (2639.80 $\pm$ 42.65) pg/ml, 相邻两个时间点比较 P 均 < 0.01; 24~36 h (2756.7 $\pm$ 34.7) pg/ml 达到一个稳定而较高的水平 (与 24 h 前各个时间点相比, P 均 < 0.01; 24 h 与 36 h 相比, $P > 0.05$; 图 5)。(2) 不同作用时间 IL-1 β 的变化: 在加入 LDL-IC 最初 6 h, IL-1 β 含量极低, 所以 6 h 内 IL-1 β 的值未观察到可见的变化。作用时间达到 12 h 时 IL-1 β 有所增高 (8.00 $\pm$ 0.30) pg/ml, 24 h (10.00 $\pm$ 0.70) pg/ml, 36 h (12.00 $\pm$ 0.36) pg/ml, 呈稳步上升趋势 (两两比较 $P < 0.01$; 图 6)。

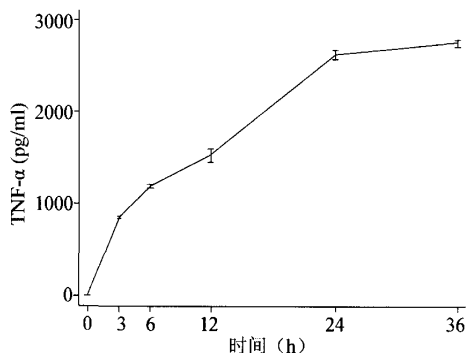


图 5 150 $\mu\text{g/ml}$ LDL-IC 作用下 TNF- α 随时间的变化

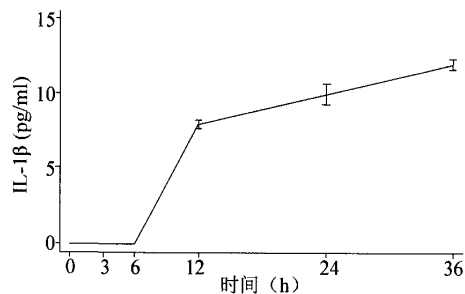


图 6 IL-1 β 含量随 LDL-IC 的作用时间变化

3 讨论

在 AS 的早期阶段, 循环中的单核细胞黏附到血管壁, 继而在局部产生的趋化分子的作用下侵入到内皮下, 进一步分化为巨噬细胞, 在动脉粥样硬化形成过程中起重要作用。

在体内 LDL 被化学修饰后结构发生了变化, 从而具有了免疫原性, 致使体内产生相应的抗体。在循环及 AS 损伤部位可以检测到抗氧化型 LDL 的自身抗体。这些自身抗体与 LDL 发生交叉免疫反应,

形成了免疫复合物^[5]。Kiener等^[6]发现 LDL-IC 较乙酰化 LDL 更能促进活性氧的释放,能促进 LDL 的氧化,LDL-IC 亦能促进清道夫受体的表达,故更能促进 AS 的发生发展。从整体效应上比较氧化型 LDL 与 LDL-IC 致 AS 作用的差别,尚待深入研究。

目前除了脂质紊乱因素外,免疫炎症在 AS 中的作用也日益受到重视。已经证实人 AS 损害部位含有多种细胞因子,包括 TNF- α 及 IL-1。TNF- α 及 IL-1 在血管及其他部位均是局部炎症的强有力的诱导剂,它们又可以进一步激活巨噬细胞,诱导巨噬细胞金属基质蛋白酶 MMP-9 的分泌和增加内皮细胞、平滑肌细胞 MMP 的表达^[7,8],它们可以通过旁路诱导内皮细胞 VCAM-1 的表达,在粥样损伤部位刺激单核细胞的聚集及在内皮下的滞留;它们还能够通过各种复杂和间接的途径影响平滑肌细胞的增殖,在粥样进展中起一定的致病作用。另一方面,它们在代谢方面也有较强的作用,它们是脂蛋白脂酶的强力的抑制剂,可以导致极低密度脂蛋白水平升高及高甘油三酯血症。另外,它们对糖和能量代谢有重要影响。极低水平的 TNF 可以导致代谢的改变,如高甘油三酯血症、脂肪的重分配、胰岛素的敏感性降低^[9,10]。

其中 TNF- α 能诱导细胞表面促凝血因子的表达,促进内皮细胞产生白介素。TNF- α 和白介素活化的内皮细胞可促进白细胞功能相关抗原-1 的表达,从而增强白细胞-内皮细胞间的相互作用。TNF- α 还可以减少一氧化氮的生成、增加血管通透性、诱导 MCP-1 产生^[11],增加 ICAM-1 的表达^[12],对 AS 产生重要影响。

IL-1 可以促进内皮细胞表面促凝血活性和血小板激活因子的合成及表达。后者可增强粒细胞间的相互作用,增加血管通透性,通过正反馈机制诱导内皮细胞释放白介素,诱导血小板源性生长因子-AA,间接通过自分泌生长调节机制引起成纤维细胞和平滑肌细胞增殖。IL-1 也是 T 细胞激活的重要的协同刺激因子。

在此次实验中作者观察到巨噬细胞在 LDL-IC 的作用下表现为被 LDL-IC 激活,促进了炎性介质 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌。通过组间比较,可以看到同样条件下,LDL-IC 更能促进单核细胞源性巨噬细胞细胞因子的分泌,并且呈剂量和时间依赖效应。实验通过设立对照组的研究,观察到 LDL-IC 所产生的诸多效应有别于一般的免疫复合物,也不是单独 LDL 的成分所

致,故可以认为 LDL-IC 是作为一个新的独立成分而在 AS 中发挥作用。这些说明 LDL-IC 可能通过增加细胞因子分泌这一复杂的途径而在 AS 损害中扮演着重要角色。提示 LDL-IC 是 AS 进展过程中的重要因子,这为抗糖化抗氧化治疗以及他汀类等调节免疫、抗炎药物在防治 AS 方面的应用提供了依据,进一步支持了防治 AS 的新的治疗方向。

参考文献

- 1 Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41: 360-370.
- 2 Lopes-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, et al. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol*, 1999, 90:165-172.
- 3 Bing H, Wang J, Zhang C, et al. Positive correlation between *in vivo* oxidized LDL and LDL immune complexes. *Clin Biochem*, 2004, 37:72-75.
- 4 Huang Y, Ghosh MJ, Lopes-Virella MF. Transcriptional and post-transcriptional regulation of LDL receptor gene expression in PMA-treated THP-1 cells by LDL-containing immune complexes. *J Lipid Res*, 1997, 38:110.
- 5 Lopes-Virella MF, Virella G. Atherosclerosis and autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994, 73:155-167.
- 6 Kiener PA, Rankin BM, Davis PM, et al. Immune complexes of LDL induce atherogenic responses in human monocytic cells. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 1995, 15:990-999.
- 7 Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*, 1996, 157: 4159-4165.
- 8 Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*, 1995, 92: 1084-1088.
- 9 Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, et al. Relation between plasma tumor necrosis factor- α and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 1998, 18: 1199-1202.
- 10 Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, et al. Evidence for a role of tumor necrosis factor- α in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism*, 1998, 47: 113-118.
- 11 Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation*, 1997, 95: 693-700.
- 12 Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF- α , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 1998, 98: 699-710.