论著

文章编号:1000-5404(2005)11-1086-03

内毒素血症小鼠血浆Ox-LDL的变化及其对LPS致炎效应的影响

周 健[1],蒋建新[2],黄显凯[1],单佑安[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]全军战创伤中心,[2]第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨内毒素血症小鼠血浆氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)的变化规律及其对内毒素(LPS)作用的影响。**方法** 静脉分别注射LPS 1、2.5、5 mg/kg,复制小鼠内毒素血症模型,ELISA法检测血浆Ox-LDL含量;Ox-LDL 0.35、1.4 mg/kg静脉注射预处理小鼠,30 min后注射LPS 1 mg/kg,ELISA法测定血浆TNF-α含量;观察Ox-LDL预处理对内毒素血症小鼠24 h死亡率的影响。**结果** 内毒素血症小鼠血浆Ox-LDL明显升高,LPS注射后0.5~8 h,各剂量组血浆Ox-LDL水平均显著高于正常对照($P<0.01$);不同剂量Ox-LDL预处理小鼠血浆TNF-α水平均显著高于LPS单纯注射组同时相点($P<0.01$),且24 h死亡率增加。**结论** 内毒素血症小鼠血浆Ox-LDL水平明显增高,与LPS呈明显的量效关系;Ox-LDL能增强LPS的致炎效应,这可能与其部分封闭清道夫受体(SR),导致LPS清除减少有关。

关键词: LPS;氧化型低密度脂蛋白;TNF-α;SR;CD14

中图法分类号: R364.5; R446.11; R510.2 **文献标识码:** A

Changes of plasma oxidized low-density lipoprotein in endotoxemia mice and effects on the inflammatory ability of LPS

ZHOU Jian[1], JIANG Jian-xin[2], HUANG Xian-kai[1], SHAN You-an[2] ([1]Trauma Center, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of plasma oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) in endotoxemia mice and its effects on the inflammatory ability of lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Endotoxemia model of 120 mice was duplicated with 1, 2.5 and 5 mg/kg of LPS intravenous injection respectively, and plasma Ox-LDL levels were assayed using ELISA kit at 0.5, 1, 2, 4, 8 h after LPS injection, and another 8 mice without any treatment served as normal control. Another 105 mice were divided into 3 groups pretreated with 0, 0.35 and 1.4 mg/kg of Ox-LDL intravenous injection 30 min before 1 mg/kg of LPS intravenous injection. Plasma TNF-α levels were measured with ELISA at 0, 1, 2, 4, 8 h after the first injection. The effects of Ox-LDL pretreatment on the mortality of another 150 endotoxemia mice 24 h after LPS injection was observed, which were treated with the same methods as 105 mice. **Results** Plasma Ox-LDL levels in endotoxemia mice increased significantly. In 0.5 to 8 h after LPS injection, plasma Ox-LDL levels were significantly higher than that of control group ($P<0.01$). Plasma TNF-α levels in all the Ox-LDL pretreated groups were remarkably higher than that of the only LPS injected group at the same time point ($P<0.01$), and the mortality of mice pretreated with Ox-LDL at 24 h after LPS injection increased. **Conclusion** Plasma Ox-LDL levels of endotoxemia mice increased significantly in a dose-dependent manner. Ox-LDL could remarkably enhance the inflammatory ability of LPS, which may due to blockage of scavenger receptors by Ox-LDL.

Key words: LPS; Ox-LDL; TNF-α; SR; CD14

内毒素血症及其诱发的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是创伤和感染患者死亡的主要原因,而细菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS)刺激巨噬细胞释放TNF-α等炎性介质在其中起着举足轻重的作用。巨噬细胞表面多种蛋白如清道夫受体(scavenger receptor, SR)、CD14等能与LPS结合,分别与LPS的灭活及活化有关[1]。低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在炎症中易氧化成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200),国家自然科学基金资助项目(39770313,39870833),全军杰出中青年基金资助项目(01Q103)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054200), the National Natural Science Foundation of China (39770313, 39870833) and the Military Science Fund for Middle and Young Distinguished Scholars (01Q103)

作者简介:周 健(1964-),男,贵州省大方县人,硕士,主治医师,主要从事危重病救治方面的工作。电话:13883087908,E-mail:dfnozh@sina.com
通讯作者:蒋建新,电话:(023)68757454

收稿日期:2005-02-02;修回日期:2005-04-19

LDL)[2]。Ox-LDL 是 SR-A 的配体,易被巨噬细胞 SR-A 识别和摄取[3],主要通过肝脏 Kupffer 细胞(Kupffer cell, KC)代谢[4]。关于内毒素血症时体内 Ox-LDL 变化规律及其对 LPS 致炎效应的影响尚少见报道。本研究试图通过探讨上述问题,深化对 LPS 致病机制的认识,为内毒素血症的防治提供新思路。

1　材料与方法

1.1　动物分组

昆明种小鼠购自大坪医院野战外科研究所实验动物中心,体质量 20~26 g,雌雄不拘,实验前禁食 12 h,自由饮水。

昆明种小鼠 128 只,随机分为 LPS 1 mg/kg(Ⅰ组,40 只)、2.5 mg/kg(Ⅱ组,40 只)、5 mg/kg(Ⅲ组,40 只)注射组,各组又根据注射后时间分为 0.5、1、2、4、8 h 5 个时相点,每个时相点均为 8 只小鼠;另 8 只小鼠作为共用正常对照(0 h 时相点)。

昆明种小鼠 105 只,随机分为单纯 LPS 注射组(①组:35 只)、Ox-LDL 0.35 mg/kg(②组:35 只)及 1.4 mg/kg 预处理(③组:35 只)复合 LPS 注射组;各组又按 LPS(①组)或 Ox-LDL(②、③组)注射后时间分为 0、1、2、4、8 h 5 小组,每组均为 7 只动物。

昆明种小鼠 150 只,随机分为 3 组:LPS 注射组、Ox-LDL 0.35、1.4 mg/kg 预处理复合 LPS 注射组,每组 50 只。

1.2　模型制备

小鼠经尾静脉注入 1、2.5 mg/kg 或 5 mg/kg 大肠杆菌内毒素 *E. coli* 026:B6 LPS (DIFCO),模拟内毒素血症模型;按分组要求经小鼠尾静脉注入 LPS 或 Ox-LDL + LPS。LPS 剂量均为 1 mg/kg,预处理组 Ox-LDL 先于 LPS 30 min 注射。模型制备同 2.2。

1.3　Ox-LDL 的制备及鉴定

将 LDL (Sigma 公司)溶于 0.01 mmol/L PBS (pH 7.4) 中,避光透析 3 d,透析后加入终浓度为 10 μmol/L 的硫酸铜,在 37 ℃孵育 24 h,终止反应后,去除残余硫酸铜。采用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 Ox-LDL 纯度,硫代巴比妥酸法(TBARS)测定 Ox-LDL 含量。

1.4　标本采集

于预定时相点以 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠,暴露心脏,穿刺抽血 0.5 ml,以 1 000 r/min、4 ℃离心 10 min,分离血浆,4 ℃保存,用 ELISA 试剂盒(上海荣盛生物技术公司)检测血浆 Ox-LDL 水平;于预定时相点以 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠,无菌条件下显露心脏,穿刺取血,将血液以 1 000 r/min 离心 10 min,取血浆 -70 ℃保存,TNF-α 测定采用 ELISA 试剂盒(Diaclone,美国);观察各组动物 24 h 内的死亡数。

1.5　统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析;计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　内毒素血症小鼠血浆 Ox-LDL 的变化

内毒素血症小鼠血浆 Ox-LDL 明显升高,LPS 注射后 0.5~8 h,各剂量组 Ox-LDL 水平显著高于正常对照($P < 0.01$),2.5 mg/kg 及 5.0 mg/kg 组动物血浆 Ox-LDL 含量明显高于 1.0 mg/kg 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。LPS 剂量越大,Ox-LDL 的峰值出现越早,见表 1。

表 1　内毒素血症小鼠血浆 Ox-LDL 的变化(ρ_B/μg·ml^{-1}, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of plasma Ox-LDL content in endotoxemia mice (ρ_B/μg·ml^{-1}, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after LPS injection (t/h)					
	0	0.5	1	2	4	8
Ⅰ	-	8.56±0.47**	11.21±0.87**	15.10±0.48**	13.55±0.58**	7.88±0.54**
Ⅱ	3.00±0.18	14.16±0.77**##	16.70±0.60**##	14.74±0.81**	11.83±0.83**#	8.53±0.54**#
Ⅲ	-	26.60±0.92**##	18.21±1.13**##	15.19±0.73**	12.21±0.58**#	9.50±0.95**#

**: $P < 0.01$, *vs* 0 h, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, *vs* Ⅰ

2.2　自制 Ox-LDL 的鉴定

①纯度检验:琼脂糖电泳 Ox-LDL 只显示 1 条带,其电泳迁移率为天然 LDL 的 2 倍。②Ox-LDL 含量测定:Ox-LDL 产物含量为(5.53±0.24) nmol/mg LDL,LDL 氧化前 Ox-LDL 含量为(0.75±0.02) nmol/mg LDL,说明自制的 Ox-LDL 符合实验要求。

2.3　Ox-LDL 预处理对内毒素血症小鼠血浆 TNF-α 含量的影响

内毒素血症小鼠血浆 TNF-α 水平明显高于正常对照组($P < 0.01$),LPS 注射后 1 h 达到峰值,其后逐渐回落,但 8 h 仍明显高于正常水平($P < 0.01$);注射 0.35 mg/kg 及 1.4 mg/kg Ox-LDL 后 1、2、4、8 h 小鼠血浆 TNF-α 含量与对照相比无明显差别($P > 0.05$,数据未列出),但 Ox-LDL 预处理的内毒素血症小鼠血浆 TNF-α 含量增加,不同剂量预处理组均显著高于 LPS 单纯注射组同时相点($P < 0.01$);不同剂量 Ox-LDL 预处理比较,在 1 h时相点 1.4 mg/kg Ox-LDL 组血浆 TNF-α 显著高于 0.35 mg/kg Ox-LDL 预处理组($P < 0.01$),其他时相点差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2　Ox-LDL 预处理对内毒素血症小鼠血浆 TNF-α 的影响(ρ_B/ng·ml^{-1}, $n = 7$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Effects of Ox-LDL pretreatment on plasma TNF-α content in endotoxemia mice (ρ_B/ng·ml^{-1}, $n = 7$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time after LPS injection (t/h)				
	0	1	2	4	8
①	4.33±0.29	86.60±3.15**	63.70±3.58**	31.29±2.24**	16.57±1.59**
②	4.01±0.36	95.65±1.88**##	70.58±3.29**##	48.04±2.99**##	24.77±2.76**##
③	4.38±0.21	105.88±4.74**##☆☆	71.75±2.75**##	51.35±2.39**##	27.33±1.54**##

**: $P < 0.01$, *vs* 0 h; ##: $P < 0.01$, *vs* ①; ☆☆: $P < 0.01$, *vs* ②

2.4 Ox-LDL预处理对内毒素血症小鼠24 h死亡的影响

LPS注射组动物24 h死亡率为8%，以注射后12～18 h时间段死亡为主；Ox-LDL单独注射未导致动物死亡（数据未列出），但以不同剂量Ox-LDL预处理后再注射LPS，动物24 h死亡率分别为24%及26%，较LPS单独注射明显增高（$P<0.05$）。不同剂量Ox-LDL预处理对动物死亡影响的差别无统计学意义（$P>0.05$），见表3。

表3 Ox-LDL对内毒素血症小鼠死亡的影响

Tab 3 Effects of Ox-LDL on the mortality of endotoxemia mice

Group	n	Death	Mortality (%)	χ^2	P
LPS (1 mg/kg)	50	4	8.00	–	–
0.35 mg/kg Ox-LDL+LPS	50	12	24.00*	4.762	0.029
1.4 mg/kg Ox-LDL+LPS	50	13	26.00*	5.471	0.017
Total	150	29	19.33	–	–

*: $P<0.05$, *vs* LPS injected group

3 讨论

本研究观察了内毒素血症小鼠血浆Ox-LDL的变化规律及其与内毒素的量效关系。结果显示，LPS注射后小鼠血浆Ox-LDL明显升高，注射后8 h各剂量组血浆Ox-LDL仍明显高于正常对照。血浆Ox-LDL水平变化与LPS呈明显的量效关系，LPS剂量愈大，血浆Ox-LDL升高越快、浓度越高。关于内毒素血症时Ox-LDL的产生机制，可能与内毒素血症时体内氧化环境明显增强有关：有研究报道，内毒素血症时参与Ox-LDL形成的酶类如还原型辅酶Ⅱ（NADPH）氧化酶、15-脂氧合酶的水平显著升高[5]；内毒素血症动物血浆LDL的氧化易感性也明显高于对照组[6,7]。此外，内毒素血症时单核-巨噬细胞的活化和聚集也增强了局部和全身的氧化环境。这些变化均可使Ox-LDL的形成增加。

关于Ox-LDL对LPS致炎效应的影响，既往研究多限于离体培养细胞，且由于实验条件和方法不同，所得结论不一：有报道高剂量Ox-LDL长时间刺激能降低巨噬细胞对LPS的反应性者[8]，但也有报道低剂量Ox-LDL短时间刺激能增敏巨噬细胞对LPS的反应性，使细胞因子产生明显增加者[9]，至今少见有关Ox-LDL能否影响动物对LPS反应性的研究报道。

本实验显示，单纯注射Ox-LDL不使小鼠血浆TNF-α升高，也未导致小鼠死亡，但用Ox-LDL预处理后再注射LPS，小鼠血浆TNF-α水平明显高于单纯注射LPS动物，动物病死率也明显上升，提示Ox-LDL预处理能增敏小鼠对LPS的反应性，使全身炎症反应更为剧烈，死亡率也因此而上升。

业已证明，Ox-LDL与SR-A具有较强的结合活性，是SR-A的一种高亲和力非特异性配体，而巨噬细胞表面SR-A和CD14分别是LPS的灭活和激活受体，巨噬细胞可以通过SR-A识别、结合并降解细菌及其毒素，防止感染发生[10,11]。基因敲除实验也证实SR-A在宿主防御中发挥重要保护作用[12]。因此Ox-LDL对LPS的增敏作用可能与病理情况下体内过多的Ox-LDL与LPS竞争结合SR-A，导致LPS清除减少、游离LPS增多，与CD14结合增加，大量激活巨噬细胞从而产生程度更为强烈的生物学效应有关。

参考文献：

[1] De Winther M P, Van Dijk K W, Havekes L M, *et al*. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(2): 290－297.

[2] Yang P Y, Rui Y C. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor expression kinetics in macrophage-derived foam cells [J]. Life Sci, 2003, 74(4): 471－480.

[3] Khan M, Pelengaris M, Cooper M, *et al*. Oxidised lipoproteins may promote inflammation through the selective delay of engulfment but not binding of apoptotic cells by macrophages[J]. Atherosclerosis, 2003, 171(1): 21－29.

[4] Esbach S, Pieters M N, Van der Boom J, *et al*. Visualization of the uptake and processing of oxidized low-density lipoproteins in human and rat liver [J]. Hepatology, 1993, 18(3): 537－545.

[5] Naderi G A, Asgary S, Sarraf Zadegan N, *et al*. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 246(1-2): 193－196.

[6] Memon R A, Staprans I, Noor M, *et al*. Infection and inflammation induce LDL oxidation *in vivo*[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(6): 1536－1542.

[7] Orem A, Yandi Y E, Vanizor B, *et al*. The evaluation of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein (LDL), susceptibility of LDL to oxidation, serum lipids and lipid hydroperoxide levels, total antioxidant status, antioxidant enzyme activities, and endothelial dysfunction in patients with Behcet's disease[J]. Clin Biochem, 2002, 35(3): 217－224.

[8] Hourton D, Stengel D, Chapman M J, *et al*. Oxidized low density lipoproteins downregulate LPS-induced platelet-activating factor receptor expression in human monocyte-derived macrophages: implications for LPS-induced nuclear factor-kappaB binding activity[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(16): 4489－4496.

[9] Ashkenas J, Penman M, Vasile E, *et al*. Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type Ⅰ and type Ⅱ macrophage scavenger receptors[J]. J Lipid Res, 1993, 34(6): 983－1000.

[10] Peiser L, Gough P J, Kodama T, *et al*. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions *in vitro*[J]. Infect Immun, 2000, 68(4): 1953－1963.

[11] Thomas C A, Li Y, Kodama T, *et al*. Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis[J]. J Exp Med, 2000, 191(1): 147－156.

[12] Greaves D R, Gough P J, Gordon S. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence [J]. Curr Opin Lipidol, 1998, 9(5): 425－432.

（编辑 王 红）