维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0576－04

不同类型氧化型脂蛋白对血管内皮细胞、单核细胞 NFκB 和 PPARs 的作用

黄 颖，陈运贞，王周碧

(重庆医科大学临床学院心内科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨不同类型氧化型脂蛋白作用后内皮细胞、单核细胞 NFκB、IL－6 表达的差异，细胞核转录因子 PPARα、PPARγ、NFκB 活化程度的不同。方法：超速密度梯度离心分离人血清脂蛋白，体外 Cu^{2+} 介导氧化；人脐静脉内皮细胞的原代培养以及 THP－1 细胞株培养：免疫组织化学、胞浆抗原 FITC 标记流式细胞仪法检测不同类型氧化型脂蛋白对内皮细胞、单核细胞 NFκB 表达的影响，ELISA 法检测上清液 IL－6 的表达：氧化型脂蛋白对 PPARα、PPARγ、NFκB 活化后，核移位率的比较。结果：Lp(a)、LDL、VLDL 及 HDL 在相同氧化条件下，对内皮细胞、单核细胞 NFκB 的“核移位”作用及 IL－6 的表达均有差异，oxLp(a)作用最强 ooxLp(a)和 oxLDL 对内皮细胞、单核细胞 NFκB 的活化程度大于 PPARα 和 PPARγ，随作用时间而增强。结论：不同类型的氧化型脂蛋白对细胞核转录因子、炎性因子的激活强度各异。氧化型脂蛋白对核转录因子 PPARα、PPARγ、NFκB 的活化程度不一致。

【关键词】PPARs；NFκB；核转录因子

【中国图书分类法分类号】R544.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－01－24

Study on the expressions of NFκB, IL－6 and PPARs with treatment of different oxidized lipoproteins

HUANG Ying, et al

(*Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the expressions of NFκB and IL－6 in vascular endothelial cells with treatment of different oxidized lipoproteins; the different expressions of PPARα, PPARγ and NFκB when incubated with oxidized lipoproteins. *Methods*: HUVECs were isolated from fresh umbilical cords obtained at normal deliveries. THP－1 cell line was commercially purchased. The lipoproteins were obtained by density－gradient ultracentrifugation and were oxidized through incubation with 15μmol/L $CuSO_4$. The different response extent of transcription factors and cytokine factors among four different oxidized lipoproteins were observed through immunohistochemistry, FACS, and ELISA. The would－be unbalanced expressions of three transcription factors PPARα, PPARγ and NFκB were confirmed by immunohistochemistry and FACS. *Results*: There were some differences among the four kinds of oxidized lipoproteins to activate the transcription factor and inflammatory factors in the EC and THP. oxLp(a) had the strongest effect. The proinflammation transcription factor NFκB has been far more vigorously activated than PPARs when encountered with oxidized lipoproteins. Their expressions were all enhanced with time. *Conclusion*: The different patterns of lipoproteins vary in activating the nuclear transcription factors and the inflammation factors. Unbalanced activation between PPARs and NFκB exists with the incubation of oxidized lipoproteins in vascular endothelial cells.

【Key words】 PPARs; NFκB; Nuclear transcription factor

氧化型脂蛋白在动脉粥样斑块局部可能是重要的致病原。它影响血管壁细胞成分的代谢与功能。近来研究表明各种氧化型脂蛋白均可能具有致动脉粥样硬化作用。过氧化物酶体增殖剂活化受体(peroxisome proliferator－activated receptors, PPARs)和细胞核因子 κB(NFκB)是重要的细胞核转录因子。在转录水平调节诸多炎性因子、活性物质的表达。炎性因子在氧化型脂蛋白侵入血管内皮细胞层的初始化步骤中发挥重要的不利作用。本文

作者介绍：黄 颖(1973－)，男，主治医师，博士，
主要研究方向：高血压，冠心病的基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

拟探讨不同类型氧化型脂蛋白作用后内皮细胞、单核细胞 NFκB、IL－6 表达的差异，细胞核转录因子 PPARα、PPARγ、NFκB 活化程度的不同。

1 材料与方法

1.1 材料

一抗为 PPARα、PPARγ、NFκB、IL－6 多克隆抗体(Santa Cruz)；IL－6ELISA 试剂盒(晶美生物有限公司)；Lp(a)(南京聚力生物有限公司)；THP－1 单核细胞株(上海细胞生物学研究所)；FITC 标记二抗，免疫组化 SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)；FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BectonDickinson)；超速低温离心机(日本)；GM2000－B 真彩色图像分析系统(北航)。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)原代培养 取健康产妇分娩后脐带，脐静脉灌注 0.25% 胶原酶消化法获得血管内皮细胞。CO_2 孵箱中孵育。检测Ⅷ因子相关抗原鉴定。

1.2.2 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白 参照文献报道超速离心法加以改进，获得 VLDL，LDL，HDL。脂蛋白的体外 Cu^{2+} 氧化：将 Cu^{2+} 调节至 15μmol/L，脂蛋白调节至蛋白为 0.5g/L。CO_2 培养箱内进行氧化 24h。TBARS 法检测氧化后丙二醛的含量。

1.2.3 胞浆抗原荧光标记抗体间接法流式细胞仪检测 参照相关文献[1]，修改后步骤如下：收集细胞，Triton－PBS 及 PFA 固定处理。加入甲醇增加细胞膜通透性。将细胞转移到 2 个 EP 管内，分为对照管和阳性管。阳性管加入一抗 50μl，4℃，5～12h。加入 FITC 标记的二抗，50μl，4℃，5h，PBS 洗涤。对照管不加一抗，余步骤同阳性管。流式细胞仪检测采用 488nm 的激发波长，Cell Quest 软件分析平均荧光强度(average fluorescence intensity，AFI)和相对荧光强度(relative fluorescence intensity，RFI)。RFI＝测定管 AFI÷对照管 AFI。

1.2.4 IL－6 ELISA 试剂盒检测和细胞免疫组织化学化检测 ELISA 法检测细胞上清液 IL－6 的含量参照试剂盒说明进行。采用 CurveExpert 软件绘制标准曲线，查出样本的浓度。细胞免疫组织化学方法按试剂盒说明进行。细胞核因子 PPARα、PPARγ、NFκB 活化后可见细胞核部位有棕黄色颗粒。

1.3 细胞分组试验方法

1.3.1 4 种氧化型脂蛋白(oxLp(a)、oxLDL、oxVLDL、oxHDL)对内皮细胞、单核细胞 NFκB、IL－6 表达的影响 单核细胞接种于 24 孔板，2×10^5 细胞/孔。分组如下：oxLp(a)组 3 孔，lp(a)组 2 孔；oxLDL 组 3 孔，LDL 组 2 孔；oxVLDL3 孔，VLDL2 孔；oxHDL3 孔，HDL2 孔。正常对照组 4 孔。上述脂蛋白的终浓度均为 250μg/ml。HUVEC 则待细胞完全融合后更换培养液再按上述方法进行。CO_2 孵箱中作用 12h 后，取细胞上清检测 IL－6 以及荧光标记 NFκB 行流式细胞仪检测和细胞免疫组化分析。流式细胞仪分析其 RFI。细胞免疫组化分析其“核移位率”。采用阳性指数(PI，%)指标，是指在随机 4 个高倍视野(×400)中发生“核移位”的细胞数占总细胞数的百分比。

1.3.2 氧化型脂蛋白对 PPARα、PPARγ、NFκB 活化强度的比较 单核细胞接种于 24 孔板，2×10^5 细胞/孔。oxLp(a)、oxLDL 的终浓度均为 250μg/ml。oxLp(a)作用 6、12、18、24h。每组重复 3 孔。oxLDL 组 12h。重复 3 孔。内皮细胞待完全融合后，更换培养液再加 oxLp(a)作用 6、12、18、24、30h。每组重复 3 孔。oxLDL 组 12h。重复 3 孔。作用终止后，制备细胞片，细胞免疫组化检测 PPARα、PPARγ、NFκB 核移位率。

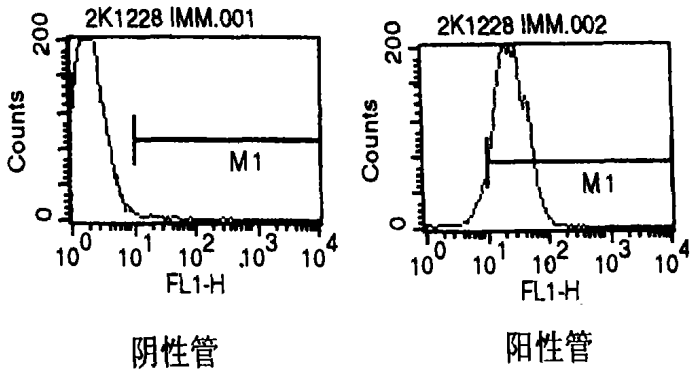
1.4 统计学分析

采用 t 检验，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 4 种不同氧化型脂蛋白促内皮细胞、单核细胞 NFκB、IL－6 的表达强度不同

在同样的氧化条件下(氧化 24h)，脂蛋白浓度相同，造成的表达程度不等，其中 oxLp(a)＞oxLDL＞oxVLDL＞oxHDL，见表 1。未修饰的脂蛋白与正常对照在该时间点上未见显著差别。在氧化型脂蛋白的作用下，NFκB 在内皮细胞、单核细胞发生“核移位”，细胞核出现棕黄色颗粒。间接法 FITC 标记抗体流式细胞仪分析(FACS)可见在氧化型脂蛋白作用后，NFκB 荧光强度明显增强，阳性管曲线明显右移。典型图示见图 1。ELISA 法检测 IL－6 的分泌增加。



阴性管　　阳性管

图 1 内皮细胞 oxLDL 作用后 NFκB 表达增强，阳性管曲线右移

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 4 种不同氧化型脂蛋白对内皮细胞、单核细胞 NFκB、IL－6 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

	control	oxHDL	oxVLDL	oxLDL	oxLp(a)
EC NFκB PI(%)	4±2	35±2#	37±2	40±2	45±3*
ECNFκB RFI	7±2	10±1#	12±1	13±2	15±1*
EC IL－6(pg/ml)	525±35	724±56#	785±38	895±68	1125±58*
THP NFκB PI(%)	7±2	35±2#	38±7	41±3	47±5
THP NFκB RFI	6.3±2	10±2#	12±1	14±2	16±28
THP IL－6(pg/ml)	250±20	385±40#	405±31	460±27	500±35*

* $P<0.05$,与其他组相比;# $P<0.05$,与对照组相比

表 2 oxLDL 对内皮细胞、单核细胞不同转录因子活化的比较(PI,%)

	PPARαPI	PPARγPI	NFκBPI
EC	35±2	30±2	42±4*
THP	29±2	34±4	40±3*

* $P<0.05$,与 PPARα、PPARγ 组相比

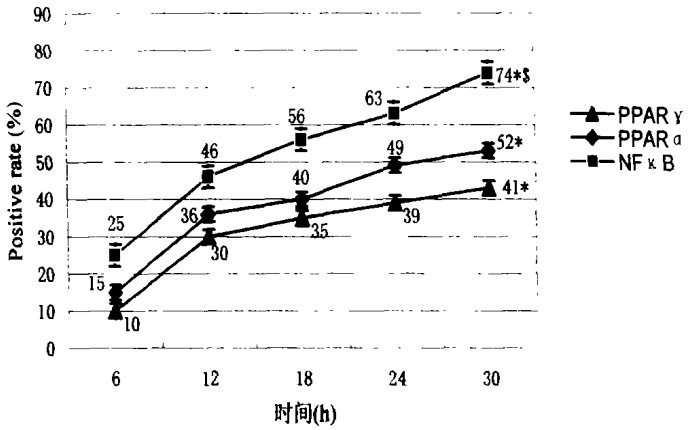


图 2 oxLP(a)作用不同时间对内皮细胞 PPARα,PPARγ 和 NFκB 核移位率的影响

* $P<0.05$,与其他时点相比;$ $P<0.05$,与 PPARα,PPARγ 相比

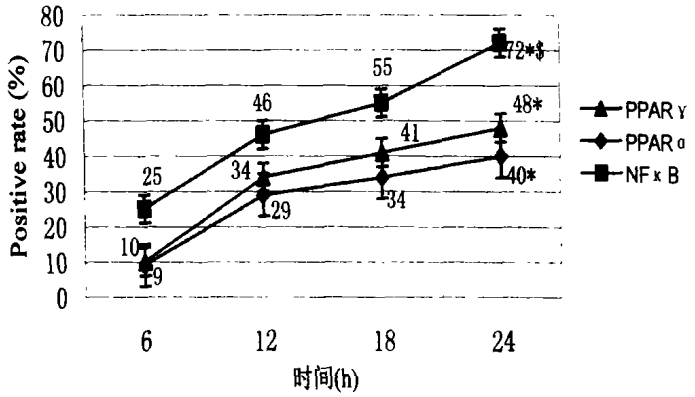


图 3 oxLP(a)作用不同时间对单核细胞 PPARα,PPARγ 和 NFκB 核移位率的影响

* $P<0.05$,与其他时点相比;$ $P<0.05$,与 PPARα,PPARγ 相比

2.2 氧化型脂蛋白对内皮细胞、单核细胞转录因子 PPARα、PPARγ、NFκB 的活化强度不同

oxLDL,250μg/ml,作用 12h,对 NFκB 的活化强于 PPARα 和 PPARγ。它对内皮细胞 NFκB 的活化发生核移位的阳性率为 42%,而 PPARα、PPARγ 仅为 35%与 30%。单核细胞有类似的改变。见表 2。oxLp(a)在不同时间点对 EC、THP 的活化具有时间依赖关系,随着时间的延长,作用增强。它对 PPARα、PPARγ、NFκB 的活化不一致现象与 oxLDL 相同。见图 2～3。在氧化型脂蛋白的作用下,内皮细胞 PPARα、PPARγ 的表达增强,出现核移位现象。

3 讨 论

氧化型脂蛋白在动脉粥样硬化(AS)发生发展过程中发挥重要的作用。它可引发动脉内皮细胞层受损乃至细胞的凋亡,由此导致单核细胞、血小板侵入内皮下组织,触发动脉粥样硬化的进程。氧化脂蛋白,包括 ox－LDL,ox－VLDL,ox－HDL,oxLp(a)等均是重要的致病原。它们均是促炎性因子分泌性转录因子 NFκB 的活化剂,从而可导致其调控的炎性因子 IL－6 表达增加,在动脉粥样硬化"特殊炎症"反应中发挥作用。

本文显示:4 种不同氧化型脂蛋白对内皮细胞、单核细胞所致 NFκB 及 IL－6 的表达程度不一致。oxLp(a)、oxLDL 作用较强。oxHDL 较弱。其原因可能在于不同脂蛋白对氧化的敏感度是不一样的。有文献认为[2]在相同脂质浓度下,LDL 的氧化敏感度高于 VLDL,而 HDL 的氧化敏感度是最低的。本文结果与之相符。Lp(a)的结构类似 LDL,差异仅在于 LDL 中没有 apo(a)载脂蛋白。Lp(a)在人群个体中的浓度差别很大,一些研究提示它可能在动脉粥样硬化的晚期发挥作用[3]。氧化型 Lp(a)也可通过清道夫受体 A(SR－A)进入单核一巨噬细胞,在

维普资讯 http://www.cqvip.com

动脉粥样硬化泡沫细胞形成中发挥作用。尽管各种氧化型脂蛋白效能不同,但均可产生相似的效应,因为它们的脂质过氧化成分都是 NFκB 活化的重要因素。本实验室既往一些研究表明 oxHDL 可以抑制 HUVEC 细胞 NOS 的合成,可以促进 ICAM－1 和 MCP－1 的表达,也可降低单核细胞膜脂的流动性,促进其表面 LFA－1 和 MCP－1 的释放,从而促进单核细胞的趋化以及与内皮的粘附。这些作用与本文 oxHDL 对 NFκB 的活化作用是密切相关的。

PPARs 是配体活化型的转录因子,属于核受体超家族。有 3 种基因型:α、β/δ 和 γ。其中 PPARα 与 PPARγ 研究较多。它们可以在转录水平上直接调节目标基因的表达,也可以通过与 AP－1, STATs, NFκB 信号通路相互作用而抑制目标基因的转录[4]。贝特类调脂药及噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂均是 PPARs 的人工合成配体,由 PPARs 介导的生物学效应与它们的临床药理作用具有直接的相关性。NFκB 在机体免疫和炎性分子表达中发挥广泛而显著的正性调控作用。

本文显示,在相同氧化脂蛋白作用条件下,PPARs 和 NFκB 的活化强度不一致。促炎性因子分泌性转录因子 NFκB 活化大于抑炎性因子分泌性转录因子 PPARs,从而整体上对氧化型脂蛋白的反应仍表现为炎性因子表达增加,呈现"炎性反应"。这为临床应用调脂药物的剂量及时间具有一定的提示作用。PPARs 与 NFκB 间的关系及干预后的变化是我们进一步讨论的课题。

我们观察到正常内皮细胞和单核细胞中 PPARα、PPARγ、NFκB 均有表达,主要定位于细胞浆内,在相应的活化物作用下,就可出现一个在形态学上显著的特点:从细胞浆到细胞核的"核移位"过程。细胞免疫化学染色可见细胞核黄染,这个特征可以间接地反应转录因子的活化。与流式细胞仪的定量指标联合应用可以较好地反映核转录因子的活化强度。在一定范围内是可行的。

参 考 文 献

[1] Su JL, Kilpatrick KE, Champion BR, et al. Fluorescent microtiter screening assay for immunocytochemically reactive antibodies[J]. Bio Techniques, 1997;22(2):320－324.

[2] 史泓浏,陈 琪,蔡海江. 三种血浆脂蛋白氧化繁感度的比较[J]. 南京医科大学学报,1996(1);16:24－27.

[3] Hobbs HH, White AL. Lipoprotein(a): intrigues and insights[J]. Curr Opin Lipidol, 1999;10(2):225－236.

[4] Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging[J]. Curr Opin Lipidol, 1999;10(2):151－159.

(上接第 575 页)

[J]. Dis Colon Rectum, 1997:40(3):322－325.

[6] Zheng X, Hu L, Chen F, et al. Expression of Ki－67 antigen, epidermal growth factor recept Epstein－Barr virus－encoded latent membrane protein(Lmpl) nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur J Cancer Boral Oncol, 1994;30B(5):290－295.

[7] 董 频. P53 基因表达,细胞增殖抗原 Ki－67 与下咽癌关系的探讨[J]. 山东医科大学基础医学院学报,2000;14(6):324－326.

[8] Holt PR. Is Ki－67 a better proliferative marker in colon than proliferating cell nuclear antigen[J]? Cancer Epider moil Biomarkers Prev, 1997;6(2):131.

[9] 向明亮,吴韵芳,王纾宜. 喉非典型增生和鳞癌的 PCNA、P21 表达及其意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998;4(3):148－150.

[10] 张欣欣,徐洪君,郭永清,等. 增殖细胞核抗原在喉粘膜不典型增生及喉癌组织中表达的意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998;4(4):243－245.

[11] Sarac S, Ayhan A, Hosal S, et al. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1998;124(2):1321－1324.