

# 氧化低密度脂蛋白诱导巨噬细胞活性氧 / 活性氮的动力学

邓同乐 许科帝 张 乐 葛亚坤 郑筱祥\*

(浙江大学生物医学工程系, 杭州 310027)

**摘要** 探讨不同条件下在氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)对U937源巨噬细胞活性氧/活性氮(ROS/RNS)动力学变化的影响。通过观察Ox-LDL急性和慢性作用下细胞内一氧化氮(NO)、超氧阴离子( $O_2^-$ )和ROS等动力学变化,发现Ox-LDL都能显著诱导细胞内NO和 $O_2^-$ 的升高,且在急性刺激时NO的升高显著高于 $O_2^-$ 。此外,还观察到12 h时ROS显著升高( $P<0.01$ ),而在24 h时却明显下降,但仍显著高于对照细胞( $P<0.01$ )。由此表明,在早期泡沫细胞形成的不同时间,调节相应自由基的代谢有助于减轻早期动脉粥样硬化的炎症反应。

**关键词** 巨噬细胞; 氧化低密度脂蛋白; 一氧化氮; 超氧阴离子; 活性氧

动脉粥样硬化被认为是一个十分动态的过程,其发生发展极类似于炎症反应过程,氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)是本病发展过程中主要危险因子之一<sup>[1,2]</sup>。在动脉粥样硬化中,巨噬细胞通过分泌各种细胞因子、自由基、蛋白酶及各种补体参与局部的炎症反应,并通过产生的活性氧和活性氮(ROS/RNS)介导LDL的氧化,同时又吞噬Ox-LDL导致巨噬细胞源泡沫细胞的形成。巨噬细胞源泡沫细胞是早期动脉粥样硬化的典型特征之一<sup>[3-5]</sup>。研究表明,Ox-LDL能提高多种细胞内的ROS/RNS的生成,如内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞等<sup>[6-9]</sup>,提示氧化应激和硝基化应激反应可能参与泡沫细胞的形成。然而,较少见关于动脉粥样硬化过程中巨噬细胞功能紊乱和ROS/RNS动力学变化之间关系的研究。这些问题促使我们进一步探讨了在巨噬细胞源泡沫细胞形成过程中Ox-LDL对ROS/RNS动力学变化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RPMI1640培养基购自Invitrogen公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物材料工程研究所;佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自Sigma公司;DAF-FM DA、dihydroethidium (DHE)、dihydrorhodamine 123(DHR 123)购自Molecular Probes公司。丙二醛测定试剂盒由南京建成

生物工程研究所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 Ox-LDL的制备<sup>[10]</sup>** 正常健康人血清,采用一次性密度梯度超速离心法制备人血浆低密度脂蛋白(LDL,密度1.019~1.063 kg/L),将LDL置于10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ 的PBS中37  $^\circ\text{C}$ 透析12 h,然后在含0.1% EDTA的PBS中透析24 h,0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌4  $^\circ\text{C}$ 备用,用硫代巴比妥酸反应物含量来鉴定LDL氧化程度。以四乙氧基丙烷为标准品,按丙二醛(MDA)测定试剂盒说明书操作,测定氧化后Ox-LDL的丙二醛含量为18 nmol/mg。

**1.2.2 U937细胞的培养及处理** 人急性髓细胞白血病细胞株U937 (human, Caucasian, pleural effusion, lymphoma, histiocytic)由中科院上海生命科学研究院细胞库提供。U937细胞株置于37  $^\circ\text{C}$ 含5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中,在含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养液中悬浮生长,培养液中加青霉素和链霉素各 $1.0 \times 10^5$  IU/L,其倍增时间为:24~48 h。U937细胞使用前用100  $\mu\text{g/ml}$ 的PMA刺激72 h,使其由单核细胞分化为巨噬细胞样细胞,换无PMA的血清培养液继续培养48 h,用无血清培养基或PBS缓冲液去除未黏附细胞<sup>[11]</sup>。

收稿日期:2006-03-02 接受日期:2006-07-24

国家自然科学基金资助项目(No.30470463)

\*通讯作者。Tel: 0571-87951091, Fax: 0571-87951676, E-mail: zxx@mail.hz.zj.cn

### 1.2.3 急性 Ox-LDL 刺激对细胞内 NO 和 $O_2^-$ 动力学的影响

U937 源巨噬细胞以  $1 \times 10^4$  个/ml 接种于内有玻片的培养皿(35 mm)中, 培养细胞用 PBS 清洗两遍后, 加入 50  $\mu$ l PBS 配制的混合新鲜荧光染液, 其中 DAF-FM DA 和 DHE 的终浓度分布为 10  $\mu$ mol/L 和 5  $\mu$ mol/L, 置于培养箱避光温育 30 min。然后用 PBS 清洗 3 遍, 细胞外液为 Hank's 液, 置于激光共聚焦显微镜(Zeiss)下进行检测。细胞先不加任何刺激, 在共聚焦显微镜下进行时间序列扫描作为对照的序列图像。然后在扫描第一幅图像后 15 s 内, 加入终浓度为 100  $\mu$ g/ml 的 Ox-LDL 进行作用。用 Hank's 液作对照实验。用 488 nm 的氩离子激光激发, DAF-FM DA( $\lambda_{ex} = 495$  nm,  $\lambda_{em} = 515$  nm), 505~550 nm BP 过滤器检测; DHE( $\lambda_{ex} = 518$  nm,  $\lambda_{em} = 605$  nm), 大于 560 nm LP 过滤器检测。扫描参数: 分辨率为  $512 \times 512$ , 采用 8 bit, 每隔 15 s 扫描一次, 时间至少 600 s, 一次线平均双向扫描模式。图象及数据的分析经计算机软件(Zeiss)处理。细胞内 NO 和  $O_2^-$  的变化可用荧光染料与 NO 和  $O_2^-$  反应后的荧光强度变化比值表示, 计算公式如下: 荧光强度变化百分比  $F_x/F_0$ ,  $F_x$  为给予刺激后第 x 分钟时荧光复合物的荧光强度,  $F_0$  为 Ox-LDL 刺激前的细胞内荧光复合物荧光强度的基础值。

### 1.2.4 慢性 Ox-LDL 刺激对细胞内 NO、 $O_2^-$ 及 ROS 等的影响

U937 源巨噬细胞( $1 \times 10^6$  个/ml)被接种到 24 孔培养板中, 分别加入无血清 RPMI1640 培养基、含 100  $\mu$ g/ml Ox-LDL 的无血清 RPMI1640 培养基培养 12 h 和 24 h。消化并收集细胞, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS 液冲洗 2 次, 然后加入混合新鲜荧光染液 20  $\mu$ l 避光染色 15 min, 再加入 400  $\mu$ l PBS 置于流式细胞仪下进行检测<sup>[12~13]</sup>。用台盼蓝染色, 活细胞的百分率大于 97%。流式细胞仪(Becton Dickinson)检测, 作流式细胞双色分析, 用 488 nm 的氩离子激光激发, FSC 和 SSC 用线性放大, FL1 和 FL2 用对数放大, FSC 设阈值, 在 FSC/SSC 点图中设门圈定细胞, 样品以不染色的细胞来调节参数, 用单染 DAF-FM 和单染 DHE 的细胞调节 FL1 和 FL2 补偿, 检测发射波长范围分别为 BP(505~550 nm)和 LP(大于 560 nm), 测定细胞数为 5 000~10 000 个, 数据用流式细胞仪的 CellQuest™ 软件进行分析。

ROS 的检测: 加入 20  $\mu$ l 染料(10  $\mu$ mol/L DHR 123), DHR 123 ( $\lambda_{ex} = 507$  nm,  $\lambda_{em} = 529$  nm), 检测发射波长范围为 BP(505~550 nm)。

## 2 结果

### 2.1 急性 Ox-LDL 诱导细胞内 NO 和 $O_2^-$ 的升高

本研究观察到 Ox-LDL 分别诱导了细胞内 NO 和  $O_2^-$  逐步升高(图 1), 同正常对照细胞比有显著性差异( $P < 0.01$ ), 而正常对照细胞在整个过程中则没有变化(图 1, 图 2A、图 2C 和图 2E)。此外, 我们还观察到 NO 和  $O_2^-$  的升高呈时间依赖性, 但在 2 min 后  $O_2^-$  的升高变缓, NO 荧光强度的变化显著高于  $O_2^-$  的变化( $P < 0.01$ ), 提示在 Ox-LDL 急性刺激时细胞内 NO 的升高显著高于  $O_2^-$ 。

### 2.2 慢性 Ox-LDL 诱导细胞内 NO 和 $O_2^-$ 的升高

从慢性 Ox-LDL 刺激对细胞内 NO 影响的直方图可以看出(图 3), 细胞内 NO 的含量在 12 h 和 24 h 时都明显升高(从  $5.8 \pm 0.6$  到  $34.9 \pm 1.6$ ,  $P < 0.01$ ), 同时, 12 h 时 NO 的产量又明显高于正常对照细胞( $5.8 \pm 0.6$  vs  $2.8 \pm 0.3$ ,  $P < 0.01$ )。同样, 从  $O_2^-$  的直方图(图 4)可观察到, 12 h 和 24 h 时细胞内  $O_2^-$  的含量也明显升高(从  $9.7 \pm 1.1$  到  $17.3 \pm 1.9$ ,  $P < 0.01$ ), 且 12 h 时明显高于正常对照细胞( $9.7 \pm 1.1$  vs  $3.8 \pm 0.5$ ,  $P < 0.01$ )。以上结果提示, Ox-LDL 以时间依赖的方式诱导细胞内 NO 和  $O_2^-$  的生成。

### 2.3 慢性 Ox-LDL 诱导细胞内 ROS 的变化

结果如图 5 所示, 细胞内 ROS 在 12 h 时显著高于正常对照细胞( $4.5 \pm 0.3$  vs  $3.2 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ), 同时, 24 h 时的 ROS 也明显比正常对照细胞高( $3.65 \pm 0.03$  vs  $3.2 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ), 但从图中可以明显看出 24 h 时 ROS 含量明显比 12 h 时下降(从  $4.5 \pm 0.3$  到  $3.65 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ), 提示在 12 h~24 h 可能存在 ROS 产生减少或消耗过多, 从而引起 ROS 含量减少, 但在早期 Ox-LDL 刺激时 ROS 含量仍高于正常对照细胞。

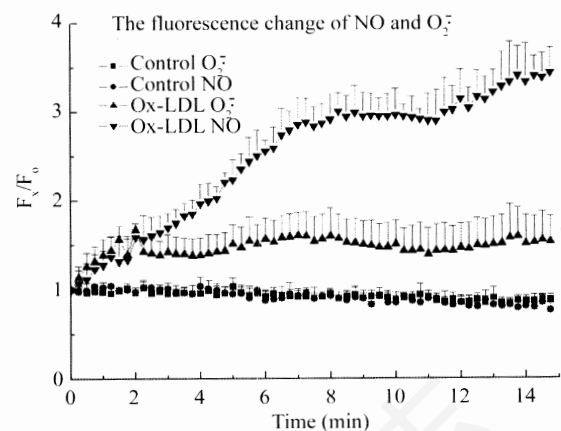
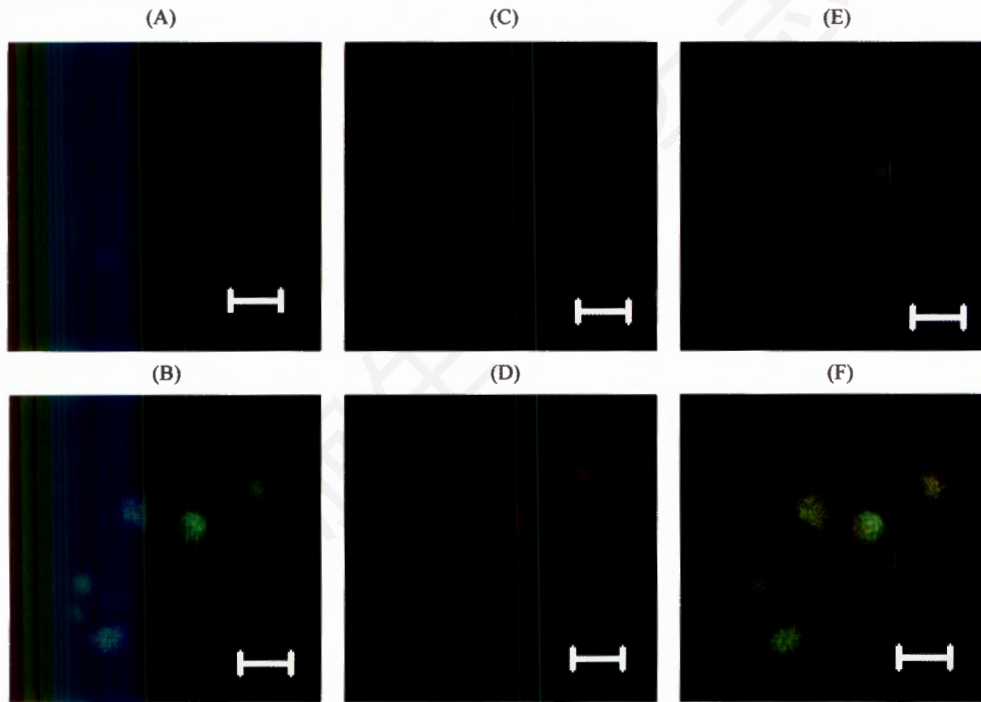
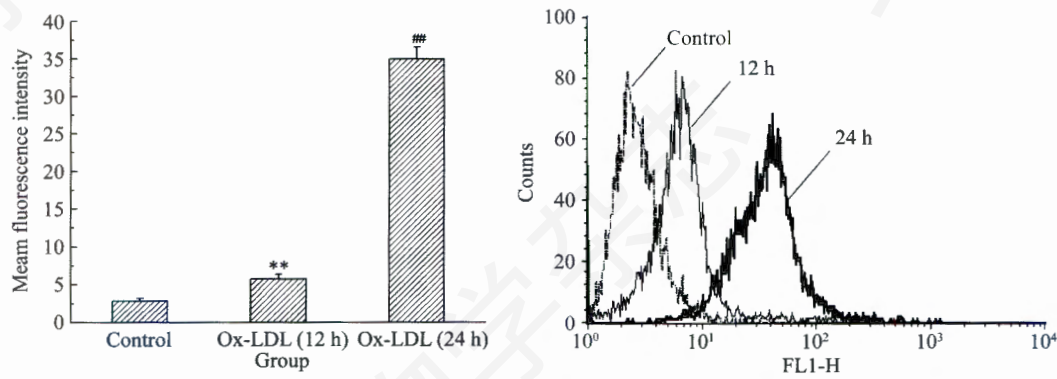


Fig. 1 Effects of Ox-LDL on both intracellular NO and  $O_2^-$  in single U937-derived macrophage ( $n=10$ )



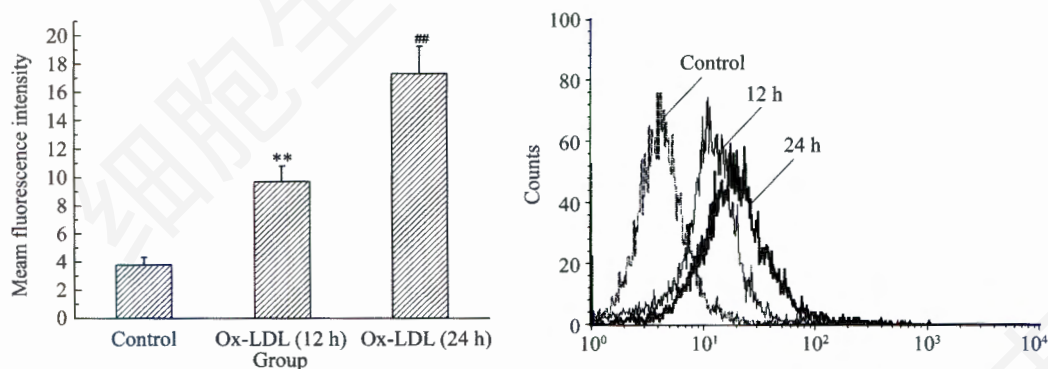
**Fig. 2 Confocal microscopy of cultured U937-derived macrophages**

Cells were double stained for NO with DAF/AM and for  $O_2^-$  with DHE, respectively. A, C and E, normal cells without Ox-LDL is shown; B, D and F show after Ox-LDL treatment. The green channel depicts the NO-dependent DAF/AM fluorescence (A, B), while the red channel shows  $O_2^-$  using DHE staining (C, D). The merged images show the colocalization of the DAF/AM and the DHE signals (E, F). Bar=20  $\mu$ m.



**Fig. 3 Effects of Ox-LDL on intracellular NO in U937-derived macrophages ( $n=7$ )**

Dash line: control cells; Solid line: Ox-LDL-treated cells at 12 h; Broad line: Ox-LDL-treated cells at 24 h. \*\* $P<0.01$ , vs control group; ## $P<0.01$ , vs Ox-LDL (12 h).



**Fig. 4 Effects of Ox-LDL on intracellular  $O_2^-$  in U937-derived macrophages ( $n=7$ )**

Dash line: control cells; Solid line: Ox-LDL-treated cells at 12 h; Broad line: Ox-LDL-treated cells at 24 h. \*\* $P<0.01$ , vs control group; ## $P<0.01$ , vs Ox-LDL (12 h).

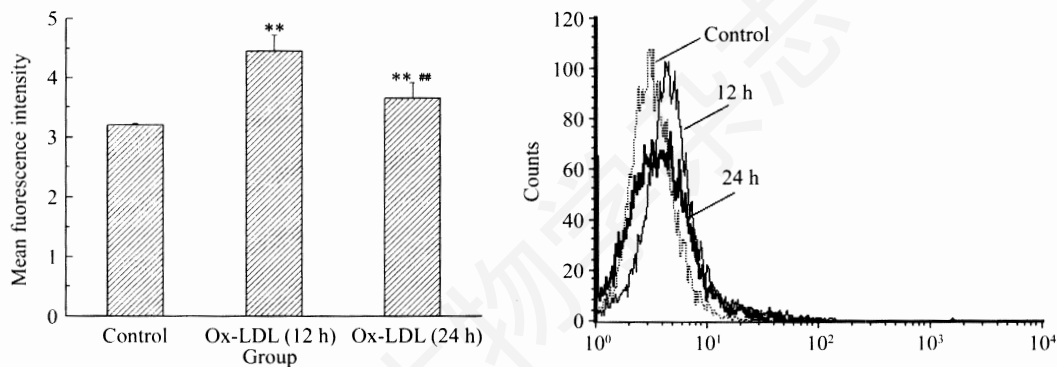


Fig. 5 Effects of Ox-LDL on intracellular ROS in U937-derived macrophages ( $n=8$ )

Dash line: control cells; Solid line: Ox-LDL-treated cells at 12 h; Broad line: Ox-LDL-treated cells at 24 h. \*\* $P<0.01$ , vs control group; \*\*\* $P<0.01$ , vs Ox-LDL (12 h).

### 3 讨论

大量研究表明, ROS/RNS 能介导 LDL 的氧化修饰, 以及泡沫细胞的形成。本研究利用特异性染料 DAF-FM DA 和 DHE 分别检测细胞内 NO 和  $O_2^-$ , 通过观察 Ox-LDL 急性刺激对细胞内 NO 和  $O_2^-$  的影响, 发现细胞内 NO 和  $O_2^-$  同时发生了升高, 表明 Ox-LDL 诱导 NO 和  $O_2^-$  的动态升高是动脉粥样硬化发展中较早出现的细胞事件之一。通过比较 NO 和  $O_2^-$  的时间动力学变化, 还观察到 NO 的升高显著高于  $O_2^-$ , 提示巨噬细胞可能通过表达诱生型 NOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS), 分泌大量 NO 参与局部的炎症反应, 表明炎症状态下, 巨噬细胞是体内 NO 和  $O_2^-$  的主要来源<sup>[14]</sup>。此外, 对慢性刺激的观察, 也发现 Ox-LDL 以时间依赖的方式诱导细胞内 NO 和  $O_2^-$  的生成, 提示细胞内的氧化应激和硝基化应激反应随时间进行性加重。研究已显示, 动脉粥样硬化炎症细胞中的氧化应激和硝基化应激反应, 通过调节细胞内信号途径影响细胞的黏附、迁移、增殖和分化。体内  $O_2^-$  性质极不稳定, 当存在 NO 时, 二者相互作用迅速生成更高活性的过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, ONOO<sup>-</sup>)。ONOO<sup>-</sup> 是一种强氧化剂, 直接损伤脂质和蛋白, 能进一步加剧局部的炎症反应<sup>[15]</sup>。

研究表明, 细胞内产生 ROS 的氧化还原反应是细胞内调节信号转导的重要化学过程之一, 并且产生的 ROS 是心血管疾病中重要的危险因素之一, 参与包括细胞炎症在内的多种病理过程<sup>[16]</sup>。为了进一

步的观察 Ox-LDL 对细胞内多种 ROS 的影响, 本研究应用线粒体特异性染料 DHR 123 标记细胞, 该染料能非特异性地与多种 ROS 反应, 并被氧化成阳离子荧光衍生物 Rh 123, 在线粒体积聚, 故能反映细胞内 ROS 的含量。本研究观察到 12 h 时 Ox-LDL 诱导了 ROS 的显著升高, 但在 24 h 时明显下降, 表明细胞内存在除  $O_2^-$  外的其他 ROS 生成减少或消耗过多的途径, 其具体机制有待进一步探讨。

综上所述, 从 Ox-LDL 诱导的 ROS/RNS 动力学变化来看, 早期细胞内 NO 的生成较为显著, 调节 NO 的代谢或许有利于减轻早期动脉粥样硬化的炎症进程; 细胞内  $O_2^-$  随时间持续性的增加, 提示抗氧化剂的应用也有利于防止动脉粥样硬化的加剧。

### 参考文献 (References)

- [1] Goldstein JL et al. *Ann Rev Biochem*, 1977, **46**: 897
- [2] Ross R. *N Engl J Med*, 1999, **340**: 115
- [3] Patel RP et al. *Free Radic Biol Med*, 2000, **28**: 1780
- [4] Brown MS et al. *Annu Rev Biochem*, 1983, **52**: 223
- [5] Nègre-Salvayre A et al. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1123**: 207
- [6] Morel DW et al. *Arteriosclerosis*, 1984, **4**: 357
- [7] Hiramatsu K et al. *Arteriosclerosis*, 1987, **7**: 55
- [8] Cominacini L et al. *J Hypertens*, 1998, **16**: 1913
- [9] Zmijewski JW et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **289**: H852
- [10] Ares MP et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1584
- [11] Deigner HP et al. *FEBS Lett*, 1996, **385**: 149
- [12] Havenga MJ et al. *Anal Biochem*, 2001, **290**: 283
- [13] Li N et al. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 8516
- [14] Shaw CA et al. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, **100**: 67
- [15] Ischiropoulos H et al. *FEBS Lett*, 1995, **364**: 279
- [16] Abe J et al. *Trends Cardiovasc Med*, 1998, **8**: 59

## Induction of ROS/RNS Dynamics in the Macrophage by Ox-LDL

Tong-Le Deng, Le Zhang, Ya-Kun Ge, Ke-Di Xu, Xiao-Xiang Zheng\*

(Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

**Abstract** Effect of Ox-LDL on kinetic changes of ROS/RNS in U937-derived macrophages was investigated. In the present study, detecting dynamics of intracellular NO,  $O_2^-$  and ROS under the acute and chronic exposure of U937-derived macrophages to Ox-LDL, we found that Ox-LDL significantly induced the increase of intracellular NO and  $O_2^-$  in time-dependent manner, and that increase of intracellular NO was significantly higher than of  $O_2^-$  in the acute exposure. Moreover, in chronic exposure, Ox-LDL significant induced the increase of ROS at 12 h, but at 24 h ROS levels significantly decreased than at 12 h ( $P<0.01$ ) and significantly higher than control cells ( $P<0.01$ ). The findings suggest that modulation of free radicals metabolism may be a potential therapeutic strategy against atherosclerotic inflammation in different phases of early foam cells.

**Key words** macrophages; Ox-LDL; NO;  $O_2^-$ ; ROS

Received: March 2, 2006 Accepted: July 24, 2006

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.30470463)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-87951091, Fax: 86-571-87951676, E-mail: zxx@mail.hz.zj.cn