DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2005.0126

Ox-LDL诱导血管内皮细胞表达LOX-1

朱惠莲，唐志红，刘 静，迟东升，王 庆，凌文华
（中山大学公共卫生学院，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】探讨血凝素样氧化低密度脂蛋白受体1(LOX-1)作为氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的特异性受体在摄取ox-LDL后对人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)表达LOX-1的影响以及LOX-1在ox-LDL诱导其自身表达中所起的作用。【方法】用天然低密度脂蛋白(n-LDL)、LOX-1的受体阻断剂聚肌苷酸[poly(I)] 250 μg/mL和爱兰苔胶(carrageenan)以及不同质量浓度的ox-LDL (0, 10, 20, 50, 100 μg/mL)与HUVECs作用于不同的时间(0, 6, 12, 24, 36 h)，用Realtime RT-PCR测定LOX-1 mRNA的表达水平，用Western blot测定LOX-1蛋白表达水平，并比较加入LOX-1阻断剂前后LOX-1表达的变化。【结果】在HUVECs中加入不同质量浓度的ox-LDL (0, 10, 20, 50, 100 μg/mL)，各组剂量的ox-LDL都可以增加LOX-1 mRNA和蛋白的表达($P<0.01$)，在10~50 μg/mL的剂量范围内有明显的剂量-效应关系。但n-LDL对LOX-1的表达无影响。随着ox-LDL与HUVECs作用时间的延长，LOX-1 mRNA和蛋白的表达显著升高($P<0.01$)，在6~24 h内呈明显的时间-效应关系($P<0.01$)。HUVECs预先与250 μg/mL的poly(I)或carrageenan作用2 h，然后再加入50 μg/mL的ox-LDL作用24 h。poly(I)和carrageenan都可以显著抑制ox-LDL诱导的LOX-1 mRNA和蛋白的表达($P<0.01$)。【结论】Ox-LDL可以诱导HUVECs LOX-1的表达，该诱导作用可被LOX-1的阻断剂部分拮抗。表明LOX-1不仅特异性地结合ox-LDL，而且介导ox-LDL对LOX-1表达的上调作用。

关键词：氧化低密度脂蛋白；血管内皮细胞；血凝素样氧化低密度脂蛋白受体1
中图分类号：R543.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-3554(2005)06-0612-05

Expression of Lectin Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 in Endothelial Cells Induced by ox-LDL

ZHU Hui-lian, TANG Zhi-hong, LIU Jing, CHI Dong-sheng, WANG Qing, LING Wen-hua
(School of Public Health, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) after its binding and uptaking of ox-LDL. 【Methods】 HUVECs were incubated with native LDL (n-LDL), ox-LDL (0, 10, 20, 50, and 100 μg/mL) at different time points (0, 6, 12, 24, and 36 h) or pre-incubated with 250 μg/mL of poly (I) or carrageenan (the inhibitors of LOX-1 receptor) and then exposed in 50 μg/mL of ox-LDL. LOX-1 mRNA and protein were examined by real time reverse transcription polymerase chain reaction (Realtime RT-PCR) and Western blot analysis, respectively. 【Results】 Ox-LDL increased the expression of LOX-1 (mRNA and protein) in a concentration-dependent manner. In contrast, native LDL (50 μg/mL) did not affect the expression of LOX-1. Incubation of HUVECs with 50 μg/mL ox-LDL at different time points (0, 6, 12, 24, and 36 h) also increased the expression of LOX-1 (mRNA and protein) in a time-dependent manner. Pre-incubation of HUVECs with 250 μg/mL of Poly (I) or carrageenan and addition with 50 μg/mL of ox-LDL could significantly decreased LOX-1 expression induced by ox-LDL ($P<0.01$). 【Conclusion】 Ox-LDL increases LOX-1 expression, which is partially blocked by LOX-1 blockers. The results indicate that LOX-1 is not only the receptor of ox-LDL but also a signal molecule inducing its expression.

Key words: oxidized low density lipoprotein (ox-LDL); vascular endothelial cells; lectin like ox-LDL receptor 1
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(6):712-716]

收稿日期：2005-06-28
基金项目：国家自然科学杰出青年基金资助项目(30025037)
作者简介：朱惠莲(1966)，女，广东南雄人，博士，副教授，主要从事动脉硬化发病机理及营养防治的研究.E-mail：zhuhuilian@21cn.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)以血管内皮细胞内和细胞间大量脂质堆积、单核/巨噬细胞浸润、泡沫细胞形成、血管平滑肌增殖等为特征[1]。较早的研究发现，氧化低密度蛋白 (oxidized low density lipoprotein recepter, ox-LDL)通过巨噬细胞清道夫受体途径被巨噬细胞摄取,继而形成泡沫细胞沉积在血管壁是AS发生的标志[2],但其确切的机制还有待进一步探讨。我们发现[3],血凝素样氧化低密度脂蛋白受体1 (lectin like oxidized low density lipoprotein receptor 1, LOX-1) 是ox-LDL的特异性受体，其介导血管内皮细胞摄取ox-LDL并引起内皮损伤及功能改变。此外,AS早期受损部位及进展期斑块的新生血管内皮、巨噬细胞和平滑肌细胞都高度表达LOX-1[4]。虽然LOX-1可以特异性地摄取并降解ox-LDL，但LOX-1摄取ox-LDL后是否调节它自身的表达,从而促进血管内皮细胞进一步摄取更多的ox-LDL,促进AS的发生和发展还需要进一步的研究。本研究以体外培养的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)为研究对象,探讨ox-LDL影响血管内皮细胞LOX-1的表达作用是否通过LOX-1来介导。

1　材料与方法

1.1　材　料

人脐带来自中山大学附属第一医院健康产妇分娩后的新生儿脐带；羊抗人LOX-1多克隆抗体和辣根过氧化物酶结合鼠抗羊IgG抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司(美国)；TRIzol Reagent购自GIBCOBRL公司 (美国);SuperScritp™ First-Strand反应合成系统试剂盒购自Invitrogen公司(美国)；化学发光试剂盒购自Santa Cruz Biotechnology公司(美国);LOX-1引物和荧光标记的探针由中山大学达安基因工程公司合成;6-carboxy-fluore-scein(FAM)购自PE公司产品(美国),Minor Groove Binder (MGB) 购自上海基康公司;LOX-1受体阻断剂聚肌苷酸(polyinosinic acid, poly(I))和爱兰苔胶(carrageenan))购自Sigma公司(美国)。

1.2　方　法

1.2.1　天然低密度脂蛋白 (native low density lipoprotein,n-LDL)和氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)的制备　采用一次性密度梯度超速离心法分离n-LDL。用Lowry's法测定n-LDL的蛋白含量。把n-LDL在终浓度为5 μmol/L的Cu^{2+}的中,于37 ℃氧化18 h。用0.45 μm微孔滤膜除菌并于4℃避光保存,备用。用琼脂糖凝胶电泳法鉴定n-LDL和ox-LDL的纯度。并用硫代巴比妥酸反应法(TBA法)测定LDL和ox-LDL的丙二醛(MDA)含量以确定其氧化修饰程度。n-LDL和ox-LDL的MDA分别为8.6 μmol/mg和159.1 μmol/mg，表明ox-LDL为中等程度氧化修饰,n-LDL未受到氧化修饰。

1.2.2　HUVECs的培养及分组　将1.25 g/L的胰蛋白酶EDTA消化液(2.5 g/L胰酶：0.2 g/L EDTA=1∶1)注入25 cm左右的新生儿脐静脉中,于37 ℃培养箱内消化13 min，收集消化液,6 000 ×g离心15 min后,接种于培养瓶中,加入5 mL PRMI-1640全培养液 (含体积分数20%胎牛血清、100 μg/mL内皮细胞生长因子、300 mg/mL L-谷氨酰胺、100 μg/mL肝素、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素),置体积分数5%CO_2培养箱中37℃培养,首次10 h换液,以后每两天换液1次,待细胞汇合时进行传代。取第4、5代亚汇合状态的HUVECs分组进行后续实验。

实验分组：①阴性对照组:培养基；②ox-LDL不同剂量组:培养基中分别加入终质量浓度为10、20、50、100 μg/mL的ox-LDL,加样后培养24 h；③ox-LDL不同作用时间组：培养基中加入终质量浓度为50 μg/mL的ox-LDL，分别培养0,6,12,24,36 h;④LOX-1阻断剂组:加入终质量浓度为250 μg/mL的Poly(I)或carrageenan预先培养2 h,然后再加终质量浓度为50 μg/mL的ox-LDL培养24 h。

1.2.3　Realtime RT-PCR检测LOX-1的基因表达　①总RNA提取：采用GIBCOBRL公司的TRIZOL试剂盒,用一步法提取细胞总RNA。提取的总RNA经电泳鉴定未被降解,用BECKMAN COULTER核酸蛋白分析仪测RNA在260 nm和280 nm的吸光度(A)值,所有样品的A_{260}/A_{280}的比值均介于1.9~2.1。并根据260 nm的吸光度值对样品的总RNA进行初步定量。②引物和探针设计:引物设计采用Primer express 2.0软件,LOX-1的上下游引物序列如下：Sense prime:5′-ACCACCAGAATCTGAATCTCCAA-3′(455);antisense prime: 5′-TTGCGGACAAGGAGCTGAAC-3′(480); 扩增片段长度为68 bp。LOX-1的探针序列如下：Probe: (456) 5′-FAM-AAACACTGAAGAGAGTAGC-MGB-3′ (474)，其中5′端标记荧光发光基团FAM (6-carboxy-

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

fluorescein),3′端标记上荧光淬灭基团 MGB(minor groove binder,MGB)。cDNA 合成采用 Qiagen 逆转录试剂盒。③Realtime PCR 扩增: 5×定量 PCR buffer 10 μL,(25 mol/L 上游引物)1 μL;(25 mol/L 下游引物 R)1 μL;(10 mmol/L dNTPs)1 μL;(20 mol/L 荧光探针)1 μL;(2 U/ L *Taq* 酶)2 μL;cDNA 5 μL;ddH_2O 29 μL。同时将定量模板梯度稀释,绘标准曲线,在 PE 7000 全自动实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应条件为:93 ℃ 2 min,然后 93 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,共 40 个循环。反应结束后,用计算机将样本与标准曲线对比得出 LOX-1 基因表达的拷贝数。结果以每微克(μg)总 RNA 所表达的 LOX-1 的拷贝数表示(copies/μg)。

1.2.4 免疫印迹(Western blotting) 将 1.0 mL 预冷的细胞裂解缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCl, 600 mmol/L NaCl, 1 g/L NaN_3, 1 g/L SDS, 5 mg/mL PMSF, 100 μg/mL aprotinin, 4 g/L NP-40 和 5 g/L deoxycholic acid) 加入经过漂洗的细胞单层中,把细胞刮落后用超声细胞破碎仪破碎细胞。用 Bradford[15] 法测定总蛋白的含量。取适量样品,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。电泳时浓缩胶恒压 80 V,分离胶恒压 120 V,电泳约 80 min。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜用甲醇活化 15 s 后,在电转移架上从负极到正极方向依次铺上滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸,恒压 100 V 转移 100 min。PVDF 膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST(在 1 000 mL 含 0.02 mol/L Tris-HCl 和 0.3 mol/L NaCl 的 pH=8.0 的溶液中加入 1 mL Tween-20)于 4 ℃封闭 6 h。然后用 TBST 按 1:200 稀释山羊抗人 LOX-1 和 β-actin 多克隆抗体,与 PVDF 膜于 4℃下孵育过夜,并轻柔摇动。再用 TBST 按 1:5000 稀释鼠抗山羊 IgG 二抗,与 PVDF 膜孵育 1 h,室温轻柔摇动。化学发光法分别检测 PVDF 膜上 LOX-1 和 β-actin 的表达。用 VILBER LOURMAT 凝胶图像分析系统对条带密度扫描,以 β-actin 为内参照,测定各样品的 LOX-1 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

所有实验数据用 SPSS10.0 建立数据库,多组比较如果方差齐同,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验,相关分析采用 Pearson's test,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 不同浓度 ox-LDL 和 n-LDL 对 HUVECs LOX-1 表达的影响

在培养的 HUVECs 中加入不同浓度的 ox-LDL (0, 10, 20, 50, 100 μg/mL) 培养 24 h,用 Realtime RT-PCR 和 Western blot 分别测定 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达。结果表明,各组剂量的 ox-LDL 都可以增加 LOX-1 mRNA(图 1)和蛋白(图 2)的表达,与 0 μg/mL 组相比较,差异有统计学意义(F_{mRNA}=212.6,$F_{蛋白}$=133.0,P 均< 0.01)。在 10~50 μg/mL 的 ox-LDL 剂量范围内呈明显的剂量-效应关系(P< 0.01)。但 n-LDL(50 μg/mL)对 LOX-1 的

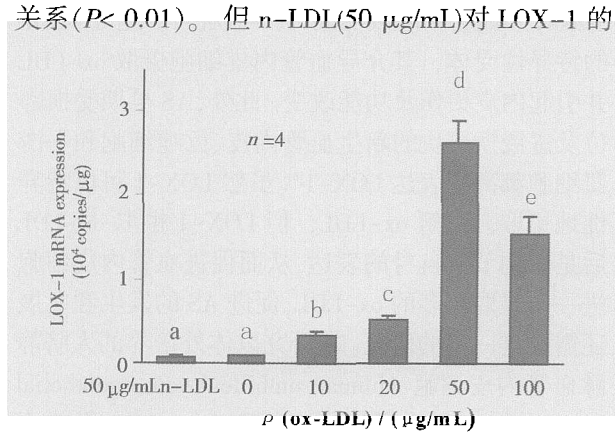

图 1 n-LDL 和 ox-LDL 对培养 HUVECs LOX-1 mRNA 表达的影响

Fig.1 The influence of n-LDL and ox-LDL on LOX-1 mRNA expression in HUVECs.

In the bar chart, different letter on the top of each bar indicates P < 0.01

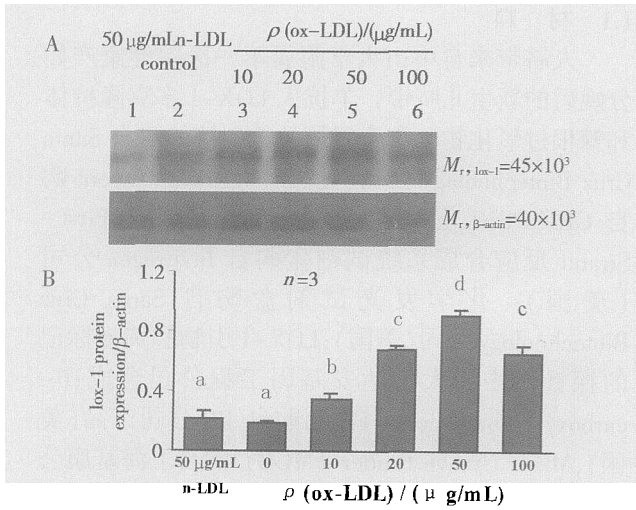

图 2 n-LDL 和 ox-LDL 对培养的 HUVECs LOX-1 蛋白表达的影响

Fig.2 The influence of n-LDL and ox-LDL on LOX-1 protein expression in HUVECs

A showed protein band of LOX-1 and β-actin determined by Western blot. B showed the bar chart of LOX-1 protein expression normalized with β-actin; In the bar chart, different letter on the top of each bar indicates P< 0.01

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表达与 0 μg/mL 组相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 Ox-LDL 不同作用时间对 HUVECs LOX-1 表达的影响

在培养的 HUVECs 中加入 50 μg/mL 的 ox-LDL,分别培养不同的时间(0,6,12,24,36 h)。用 Realtime RT-PCR 和 Western blot 分别测定 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达。结果表明,ox-LDL 与 HUVECs 作用不同时间都能使 LOX-1 mRNA (图 3)和蛋白(图 4)的表达显著升高,与 0 h 组相比,差异有统计学意义 ($F_{mRNA}=287.6$, $F_{蛋白}=322.3$, P 均<0.01)。在 6~24 h 内呈明显的时间-效应关系 ($P<0.01$)。

2.3 聚肌苷酸和爱兰苔胶对 ox-LDL 诱导 HUVECs 表达 LOX-1 的影响

分别在汇合成单层的 HUVECs 中加入 250 μg/mL polyinosonic acid 或 250 μg/mL 的 carrageenan,作用 2 h,然后再加入 50 μg/mL 的 ox-LDL 作用 24 h。用 Realtime RT-PCR 和 Western block 分别测定 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达。结果表明, 两种 LOX-1 受体的化学阻断剂(聚肌苷酸和爱兰苔胶)都可以显著抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA (图

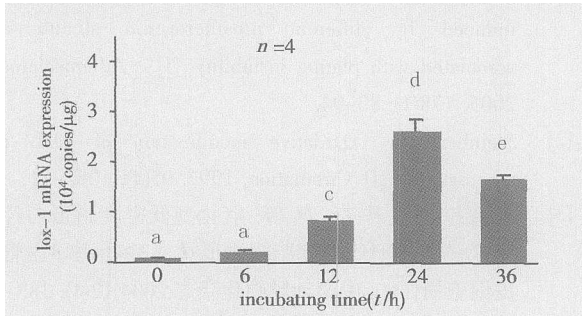

图 3　ox-LD 不同作用时间对 HUVECs LOX-1 mRNA 表达的影响

Fig.3　The influence of incubating time of ox-LDL on LOX-1 mRNA expression in HUVECs

In the bar chart, different letter on the top of each bar indicates $P<0.01$

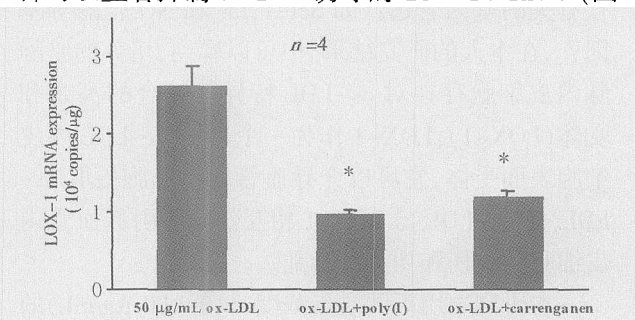

图 5　Polyinosonic acid 和 Carrageenan 对 ox-LDL 诱导 ox-LDL HUVECs 表达 LOX-1 mRNA 的影响

Fig.5　Effects of Polyinosonic acid and Carrageenan on mRNA expression of LOX-1 induced by ox-LDL in HUVECs

* indicated $P<0.01$ compared with group of 50 μg/mL

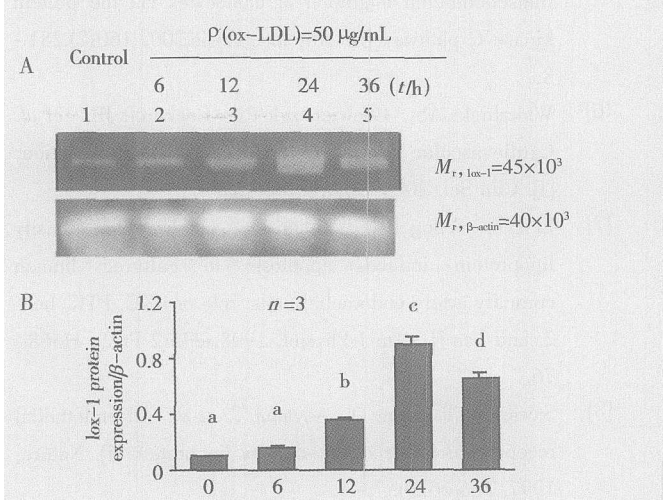

图 4　ox-LDL 不同作用时间对 HUVECs LOX-1 蛋白表达的影响

Fig.4　The influence of incubating time of ox-LDL on LOX-1 protein expression in HUVECs

A Showed the protein band of LOX-1 and β-actin determined by Western blot. B showed the bar chart of LOX-1 protein expression normalized with β-actin. In the bar chart, different letter on the top of each bar indicates $P<0.01$)

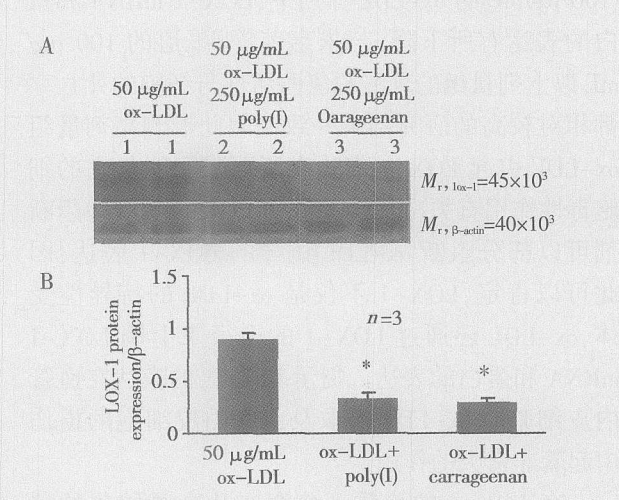

图 6　Polyinosonic acid 和 Carrageenan 对 ox-LDL 诱导 HUVECs 表达 LOX-1 蛋白的影响

Fig.6　Effects of Polyinosonic acid and Carrageenan on protein expression of LOX-1 induced by ox-LDL in HUVECs

A showed the protein band of LOX-1 and β-actin determined by Western blot. B showed the bar chart of LOX-1 protein expression normalized with β-actin. * indicated $P<0.01$ compared with group of 50 μg/mL

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

5)和蛋白的表达(图6),与50 μg/mL组相比,差异有统计学意义(F_{mRNA}=134.2,$F_{蛋白}$=134.6,P均<0.01)。

3 讨 论

Ox-LDL及其脂质成份激活血管内皮细胞是动脉硬化发生和发展的重要环节。Ox-LDL可以降低NO介导的血管舒张功能并促进白细胞向内皮细胞迁移[5],引起血管内皮细胞功能紊乱、凋亡和坏死[6]。此外,ox-LDL还可以改变一些与内皮细胞凋亡有关的基因表达:如bcl-1,fas和NO合酶等基因[7]。在本人的研究结果[3]中可以看到,培养的脐静脉内皮细胞存在对ox-LDL特异性结合的高亲和受体(LOX-1),LOX-1作为一个新的ox-LDL内皮细胞表面受体,它可以介导血管内皮细胞摄取ox-LDL,使ox-LDL与LOX-1相互作用后引起血管内皮细胞的损伤和功能的紊乱。

本研究中用不同质量浓度(10~100 μg/mL)的ox-LDL与HUVECs一起培养,用Realtime RT-PCR和Western blot测得LOX-1的mRNA和蛋白的表达,发现在10~50 μg/mL的剂量范围内,ox-LDL可以上调血管内皮细胞表达LOX-1,并且呈明显的剂量和时间效应关系,但在较高质量浓度(100 μg/mL)的ox-LDL作用下,LOX-1 mRNA和蛋白的表达有所下降,与朱惠莲等[3]报道的100 μg/mL以上剂量组的乳酸脱氢酶活性与细胞的死亡率都相对较高的研究结果一致,因此推测高剂量组ox-LDL引起LOX-1表达有所下降可能与它的细胞毒性作用有关。在本研究中,LOX-1的受体阻断剂可以部分阻断ox-LDL诱导的LOX-1表达,因此可以肯定,LOX-1不仅是ox-LDL的特异性受体,ox-LDL还通过LOX-1的途径来上调LOX-1 mRNA和蛋白的表达,提示LOX-1的表达在血管内皮细胞对ox-LDL摄取及血管内皮细胞的损伤中起着非常大的作用。

在LOX-1的胞质部分存在几个磷酸化的位点:如Thr21、Ser28、Thr2,LOX-1与ox-LDL结合后,这几个磷酸化位点的磷酸化作用可以传递生物信号[8],再通过一系的信号转导通路调节LOX-1自身的表达。Li等[9]研究发现,ox-LDL可以诱导血管内皮细胞P-selectin的表达,而P-selectin与LOX-1有结构上的同源性。提示ox-LDL不仅可以诱导血管内皮细胞LOX-1的表达,而且参与白细胞的募集和迁移到血管壁。LOX-1也不仅仅是一个受体,同时也可能作为一个信号分子传递生物信号,调节其自身或与白细胞募集和迁移有关的粘附分子和趋化因子的表达。

参考文献:

[1] Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, *et al.* The expression of macrophage migration inhibitory factor 1alpha (MIF 1alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability [J]. Atherosclerosis, 2005, 178(1): 83-94.

[2] Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenisis [J]. Circulation, 1997, 95(4): 1062-71.

[3] 朱惠莲,侯孟君,李 燕,等. 氧化型低密度脂蛋白经血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1途径诱导血管内皮细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,2004,12(4): 383-6.

[4] Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, *et al.* Expression of lectinlike oxidized low-Density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions [J]. Circulation, 1999, 99 (24): 3110-7.

[5] Mine S, Tabata T, Wada Y, *et al.* Oxidized low density lipoprotein -induced LFA -1 -dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway [J]. Atherosclerosis,2002,160(2):281-8.

[6] Wierzbicki AS, Chowienczyk PJ, Cockcroft JR, *et al.* Cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction. [J]. Clin Sci, 2004, 107(6): 609-15.

[7] Li DY, Yang BC, Mehta JL. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas [J]. Am J Physiol, 1998, 275(2 Pt 2): H568-76.

[8] Sawanura T, Kume N, Aoyama T, *et al.* An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. Nature, 1997, 386(6620): 73-7.

[9] Li D, Liu L, Chen H, *et al.* LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(5):816-21.

(编辑 张敏瑞)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net