人肝癌 SMMC-7721 细胞受体介导内吞高密度脂蛋白-2 的逆向胞饮作用*

陆任云① 魏 强 吴满平 陈佩芳 梅美珍
(上海医科大学药学院生物化学教研室，上海 200032)

Retroendocytosis of Endocytic HDL-2 by Human SMMC-7721 Hepatocarcinoma Cells

LU Ren-Yun, WEI Qiang, WU Man-Ping, CHEN Pei-Fang and MEI Mei-Zhen
(*Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai* 200032, *China*)

ABSTRACT Fluorescein isothiocyanester (FITC)-labelled high density lipoprotein-2 keeps the biological activities of native HDL. After human SMMC-7721 hepatocarcinoma cells were incubated with FITC-apolipoprotein E-free HDL-2 at 37℃ for 3 h, the cell-associated and endocytic fluorescent strength (FS) were 13.5±0.8 and 9.2±0.5 ($\bar{x}\pm s, n=2$) respectively. The cell-released trichloroacetic acid (TCA)-precipitable FS and TCA-soluble FS were 5.1±0.4 and 0.67±0.17 after the cells were incubated further at 37℃ for 2 h. And the cell-released TCA-precipitable FS was 0.41±0.16 at 4℃ for 2 h. These results suggest that: ① cell-internalized doesn't take lysosomal pathway; ② the released of cell-internalized HDL-2-apolipoprotein is a temperature-dependent retroendocytosis.

KEY WORDS Human SMMC-7721 hepatocarcinoma; High density lipoprotein-2; Endocytosis; Retroendocytosis

摘要 荧光素异硫氰酸酯标记高密度脂蛋白-2 保持天然高密度脂蛋白-2 的生物活性。人肝癌 SMMC-7721 细胞与荧光标记无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2 在 37℃培养 3 h 左右，细胞结合与内吞的荧光强度分别为 13.5±0.8 和 9.2±0.5($\bar{x}\pm s$)。细胞进一步在 37℃培养 2 h，细胞释放的三氯醋酸沉淀和三氯醋酸可溶性荧光强度分别为 5.1±0.4 和 0.67±0.17。4 ℃培养 2 h，细胞释放三氯醋酸沉淀荧光强度为 0.41±0.16。结果提示：①细胞内吞高密度脂蛋白-2 没有经过溶酶体分解途径；②细胞释放高密度脂蛋白-2 载脂蛋白是一种取决于温度的逆向胞饮机制。

关键词 人肝癌 SMMC-7721 细胞； 高密度脂蛋白-2； 细胞内吞； 细胞逆向胞饮

高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)与动脉粥样硬化呈负相关。HDL 接受周围组织多余胆固醇并带到肝脏(胆固醇逆向转运)而呈现抗动脉粥样硬化作用[1]。目前国内外实验室均已报道细胞 HDL 受体的存在，这是经 HDL 中载脂蛋白 A I 确认的[2~5]。但对 HDL 与肝细胞受体结合后 HDL 颗粒是否进入细胞内尚有争议[6,7]。本文利用荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanester, FITC)来标记 HDL-2 中载脂蛋白 A I，从而追踪 HDL-2 与肝癌 SMMC-7721 细胞结合后 HDL-2 的代谢命运。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

健康人血由上海市中心血站提供 FITC 系 Flura 产品。RPMI1640 系日本日水制药株式会社产品。人肝癌 SMMC-7721 系上海第二军医大学提供。N-乙酰咪唑系 Sigma 产品。超速离心机和 pH 计系 beckman 公司产品。核酸蛋白析出仪为 LKB 公司产品。CO_2 培养

* 国家自然科学基金(39270158)资助课题

① 进修生，现在镇江医学院生物化学教研室

箱为日本 Tabaiespec 公司产品。细胞培养液：含 15% 小牛血清(或无脂蛋白血清)、100 u/ml 青霉素和卡那霉素的 1.04%RPMI 1640 液。

1.2 无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2 制备

参照本室方法[3]，取超离心 $d=1.063\sim1.125$ kg/L 部分，经肝素-Sepharose-CL-4B 亲和层析纯化。

1.3 无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2 的荧光素异硫氰酸酯标记

参照本室方法[3]，FITC 与无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2 反应后，经 Sephadex G50 分离纯化 FITC-无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2。用三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA)沉淀 FITC-无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白-2，测定沉淀前后荧光强度(fluorescent strength, FS)比值来鉴定 FITC 标记率。

1.4 人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞培养

参照本室方法[3]进行。

1.5 细胞结合内吞高密度脂蛋白-2 试验

取 8 个含 10^6/L 贴壁生长细胞的培养皿，加 100 μg FITC-无载脂蛋白 E-HDL-2，总体积 2 ml，37℃培养 3 h，用无酚红 Hanks 液 1 ml 洗 3 次。取其中 2 个培养皿测定细胞结合和内吞总 FS(激发波长 495 nm，发射波长 519 nm)。剩余 6 个培养皿各加 1 ml 含 0.4%胰蛋白酶的无酚红 Hanks 液，0℃处理 15 min，4℃ 200×g 离心，细胞沉淀洗 2 次后，取其中 2 个培养皿中细胞沉淀，分别测定细胞内吞 FS。

1.6 细胞内吞高密度脂蛋白的逆向胞饮作用

取操作 1.4 中经胰蛋白酶处理后的 4 个细胞培养皿，分成两组。每个培养皿加 2 ml 细胞培养液，分别在 37℃和 4℃培养 2 h，测定细胞释放 FS。

2 结果

Figure 1 结果显示实验使用的纯化无载脂蛋白 E-HDL-2 在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)中仅含一条载脂蛋白 A I 带，符合实验要求。

Table 1 结果显示 HDL 2 的 FITC 标记率高达 99.7%，即 99.7%FITC 的 FS 存在于与 HDL-2-载脂蛋白结合部分。FITC-HDL2 中几乎不含未反应的游离 FITC。

Table 2 and 3 结果表明细胞内吞 HDL-2 (9.2±0.5)在 37℃ 2 h 内有 62.9%重新释放出细胞外，而且主要存在于 TCA 可沉淀部分 (5.1±0.4)。在 4℃时细胞释放 HDL-2-载脂蛋白仅 4.4%(0.41±0.16)。

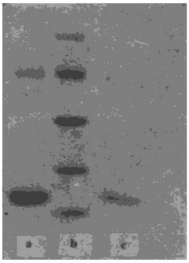

Figure 1. 10% SDS-PAGE of Apo E-free HDL-2. a. HDL-2, b. low molecular weight standards, c. Apo E-free HDL-2.

Table 1. Fluorescent strength (FS) of FITC-Apo E-free-HDL-2 ($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	FS
① TCA-precipitable	2	696.8±15.4
② TCA-soluble	2	2.3±0.5
①/②		0.997

Table 2. Cell-associated and endocytic fluorescent strength (FS) after incubation of hepatocarcinoma with FITC-Apo E-free HDL-2 ($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	FS
Cell-associated	2	13.5±0.8
Cell-endocytic	2	9.2±0.5

Table 3. Cell-released fluorescent strength (FS) after incubation of hepatocarcinoma with FITC-Apo E-free HDL-2 ($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	37℃	4℃
TCA-precipitable	2	5.14±0.39	0.41±0.16
TCA-soluble	2	0.67±0.17	—

3 讨论

由于肝细胞存在载脂蛋白 E 受体，为排除 HDL_2 中载脂蛋白 E 的影响，我们必需排除 HDL_2 中载脂蛋白 E。利用载脂蛋白 E 与肝素的高亲和力，我们采用肝素-Sepharose CL-4B 亲和层析柱去除 HDL_2 中载脂蛋白 E 及混杂的血清白蛋白。

我们以前的实验结果已显示 FITC 标记不影响 HDL 理化特性和 FITC 荧光光谱，并且保持天然 HDL 的生物活性[2,3]。因此我们可利用 FITC 作为示踪剂来研究 HDL_2 中载脂蛋白的代谢命运。此次结果证实 HDL_2 确实进入细胞内。与我们以前利用大鼠肝非实质性细胞的实验结果一致[2]，内吞 HDL_2 在 37℃、2 h 培养后有 62.9%重新释放出胞外，且主要存在于 TCA 可沉淀部分(5.1±0.4)。再次提示内吞 HDL_2 中载脂蛋白没有经过细胞内溶酶体分解途径，与我们以前结果一致[2]，且充分表明细胞通过逆向胞饮途径重新释放内吞 HDL_2-载脂蛋白出细胞外。由此可见 HDL 的细胞内代谢过程与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)有着本质上的差异。在 4℃时细胞释放 FS 仅 4.4%(0.41±0.16)，表明细胞释放内吞 HDL_2-载脂蛋白 E 的逆向胞饮是一种温度依赖性过程。

参考文献

1 Werb Z, Cohn ZA. Cholesterol metabolism in the macrophage I. Alteration of subcellular exchangable cholesterol compartment and exchange in other cell types. *J Exp Med*, 1971, **134**: 1 570.

2 吴满平，陈佩芳，陈其善，等. 大鼠肝非实质性细胞的 *HDL* 非溶酶体途径的细胞内吞. 生物化学与生物物理学报，1993, **25** (5): 543.

3 吴满平，陈佩芳，卜书红，等. 乙酰咪唑修饰对 *HDL* 结合人肝癌 *SMMC*-7721 细胞的影响. 上海医科大学学报，1994, **21** (5): 322.

4 Brinton EA, Oram JF. Apoprotein specificity of HDL receptor on cultured human fibroblasts. *Arteriosclerosis*, 1985, **5**: 536*a*.

5 Oram JF, Brinton EA, Bierman EL, et al. Regulation of HDL receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Chin Invest*, 1983, **72**: 1 611.

6 Pittman RC, Knecht TP, Rosenbaum MS, et al. A nonendocytic mechanism for the selective uptake of HDL associated cholesteryl esters. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 2 443.

7 Delamatre JG, Sarphie TG, Archibold RC, et al. Metabolism of apo E-free HDL in rat hepatoma cells: Evidence for a retroendocytic pathway. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 191.

(1995-08-26 收到，1996-03-10 修回)