

[文章编号] 1007-3949(2002)10-06-0491-04

•实验研究•

溶血卵磷脂对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠腹腔巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流的影响

冯翔, 凌文华, 郑琳

(中山大学公共卫生学院医学营养系, 广东省广州市 510089)

[主题词] 溶血卵磷脂; 载脂蛋白 E; 巨噬细胞; 胆固醇

[摘要] 以载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠腹腔巨噬细胞源泡沫细胞为研究对象, 观察溶血卵磷脂对泡沫细胞胆固醇外流的影响以及初步探讨其机制。分离正常及载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠腹腔巨噬细胞, 以乙酰化低密度脂蛋白负载形成巨噬细胞源泡沫细胞, 分别以溶血卵磷脂及载脂蛋白 AI 作为诱导物, 观察其胆固醇外流情况。结果发现, 溶血卵磷脂能引起正常组小鼠腹腔巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流, 且呈剂量效应关系, 但载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠组未见明显胆固醇外流; 载脂蛋白 AI 能引起两组胆固醇外流, 且外流量显著高于溶血卵磷脂。结果提示, 溶血卵磷脂能促进巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流, 可能主要是通过载脂蛋白 E 途径来进行。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Effects of Lysophosphatidylcholine on Cholesterol Efflux from Apolipoprotein E Gene Deficient Mouse Peritoneal Macrophage-Driven Foam Cells

FENG Xiang, LING Wen-Hua, and ZHENG Lin

(School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

[MeSH] Lysophosphatidylcholine; Apolipoprotein E; Macrophages; Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of lysophosphatidylcholine (LPC) on cholesterol efflux from apolipoprotein E (apo E) gene deficient mouse peritoneal macrophage foam cells. **Methods** Cholesterol efflux induced by LPC and apo A iv from macrophage foam cells separated from normal and apo E gene deficient mice (E^0) mouse loaded with acLDL were measured by enzymatic fluorometry assay. **Results** LPC could promote cholesterol efflux from macrophage foam cells in relation to both dosage and time. When LPC was incubated with E^0 mouse macrophage foam cells, the released free cholesterol mass was significantly lower than that of normal mouse macrophage foam cells. It was also found that cholesterol efflux induced by apo A iv normally occurred in E^0 mouse macrophage foam cells. **Conclusion** LPC could induce cholesterol efflux from macrophage foam cells, which may occur via apo E pathway.

巨噬细胞是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成过程中最重要的细胞之一, 在 As 斑块形成的各个阶段都十分重要。在巨噬细胞源泡沫细胞中富集过量的胆固醇, 因此泡沫细胞中胆固醇如何转归对阐明 As 形成的机制有重要意义。溶血卵磷脂(lysophosphatidylcholine, LPC)来源于卵磷脂水解或低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化过程, 在 As 的发生过程中所起的作用并未完全阐明。有研究发现, LPC 能促进巨噬细胞源泡沫细胞的胆固醇外流, 这种效应可以在无高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)或载脂蛋白 A iv 存在的情况下

发生, 并且外流胆固醇是以脂蛋白的形式存在, 可能是含载脂蛋白 E 的脂蛋白^[1]。藉于此, 本研究采用正常小鼠和载脂蛋白 E 基因缺陷(apolipoprotein E gene deficient, E^0)小鼠对比观察 LPC 引起的胆固醇外流情况, 从而判断 LPC 是否诱导以载脂蛋白 E 作为载体的胆固醇外流。

1 材料与方法

1.1 主要材料

实验用正常 C57BL/6J 小鼠由本校实验动物中心提供, 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠(品系为 C57BL/6J)由美国 Jackson 实验室提供。新鲜健康人血浆购自广州市中心血站。DMEM 培养基和双抗购自 Gibco, LPC、载脂蛋白 A iv、Lowry's 法蛋白定量试剂盒及酶学荧光法检测胆固醇试剂均购自 Sigma。

1.2 低密度脂蛋白的分离、修饰和鉴定

[收稿日期] 2002-07-11 [修回日期] 2002-11-19

[基金项目] 广东省自然科学基金(990090)资助, 部分经费来源于中华医学基金会(CMB)。

[作者简介] 冯翔, 男, 1969 年出生, 浙江义乌人, 硕士, 讲师。凌文华, 男, 1955 年出生, 安徽合肥人, 博士, 教授, 博士研究生导师。郑琳, 女, 1972 年出生, 广东广州人, 技师。

1.2.1 低密度脂蛋白的分离 正常人新鲜血浆经密度梯度超速离心(50 000 r/min, 4 °C, 5 h), 所得 LDL 在含 200 μ mol/L EDTA 的 PBS 液中 4 °C 透析 24 h, 超滤除菌, 4 °C 保存。

1.2.2 低密度脂蛋白的乙酰化修饰^[2] 在每份含 16 mg 蛋白的 LDL 加入 1 mL 0.15 μ mol/L NaCl, 再加入 1 mL 饱和醋酸钠, 于冰浴中不断搅拌。以小液滴的形式(约 2 μ L/滴)加入冰浴下不断搅拌的 LDL 中, 总量相当于 LDL 蛋白量的 1.5 倍, 1 h 内全量加入, 之后继续搅拌 30 min, 然后在 4 °C 下透析 24 h。

1.2.3 天然及修饰低密度脂蛋白含量测定及其鉴定 蛋白含量测定采用 Lowry's 法, 以 BSA 作为标准。以琼脂糖凝胶电泳鉴定其纯度。

1.3 巨噬细胞的分离和培养

常规分离小鼠腹腔巨噬细胞, 以 3×10^6 /L 接种于 12 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 下培养 2 h 后洗去未贴壁细胞, 重新于每孔加入含 10% FCS 的 DMEM 培养基。

1.4 溶血卵磷脂对巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流的影响

采用从正常 C57BL/6J 小鼠和 E⁰ 小鼠腹腔分离的巨噬细胞作为对象, 贴壁的腹腔巨噬细胞加入含 50 mg/L 乙酰化低密度脂蛋白(acetyl LDL, ac-LDL) 及 10% FCS 的 DMEM, 置于 CO₂ 培养箱孵育 20 h, 用含 0.1% BSA 的 DMEM 洗 2 次, 然后以含 LPC (0、10、20、40 和 80 μ mol/L) 及 0.1% BSA 的 DMEM 培养 24 h~48 h。培养结束后, 分别测定培养基和细胞内胆固醇含量。

1.5 胆固醇含量测定^[3,4]

1.5.1 细胞内胆固醇含量测定 培养结束后, 收集细胞用 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)洗 2 次, 然后每孔加入 500 μ L 磷酸钠缓冲液, 超声破碎 3 次, 每次 10 s。取 0.1 mL 样品分别加入到 0.9 mL 游离胆固醇和总胆固醇分析液中, 37 °C 孵育 1 h, 于荧光分光光度计检测荧光强度, 激发波长 325 nm, 发射波长 410 nm。

1.5.2 培养基内胆固醇含量测定 以氯仿-甲醇方法反复提取胆固醇溶于 200 μ L 无水乙醇中, 用于胆固醇检测。

1.6 统计学处理

所有统计分析均采用 SPSS10.0 软件包进行, EXCEL 制图。不同组之间比较采用单因素方差分析和协方差分析。

2 结果

2.1 溶血卵磷脂对正常组巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流的影响

以不同浓度的 LPC 处理正常组小鼠腹腔巨噬细胞源泡沫细胞 24 h 后, 不同剂量组培养基游离胆固醇含量与空白对照组比较差异有显著性($P < 0.01$), 并且随着 LPC 剂量增加, 胆固醇外流增加, 呈剂量效应关系($r = 0.927$, $P < 0.01$; 图 1, Figure 1)。随着 LPC 剂量增加, 细胞内总胆固醇含量也随之降低(图 2, Figure 2)。

2.2 溶血卵磷脂对 E⁰ 组巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流的影响

以上述相同浓度系列的 LPC 处理 E⁰ 组小鼠腹腔巨噬细胞源泡沫细胞 24 h 后, LPC 引起的胆固醇外流大为减少, 与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$; 图 1, Figure 1)。LPC 虽然也可以引起细胞内总胆固醇含量下降, 但总胆固醇含量下降的程度与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$; 图 2, Figure 2)。

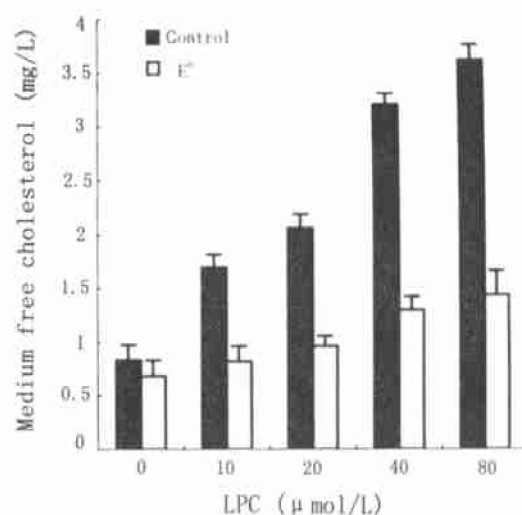


图 1. 加入 LPC 后培养基中游离胆固醇含量。

Figure 1. Content of free cholesterol in medium after incubation with LPC.

2.3 溶血卵磷脂与载脂蛋白 A_{iv}引起的胆固醇外流量比较

5 mg/L 载脂蛋白 A_{iv}与 40 μ mol/L LPC 均引起明显的胆固醇外流, 载脂蛋白 A_{iv}引起的胆固醇外流量显著高于 LPC($P < 0.01$)。在 E⁰ 组, LPC 引起的胆固醇外流显著受阻, 而载脂蛋白 A_{iv}引起的胆固醇外流则未受影响(图 3 和 4, Figure 3 and 4)。

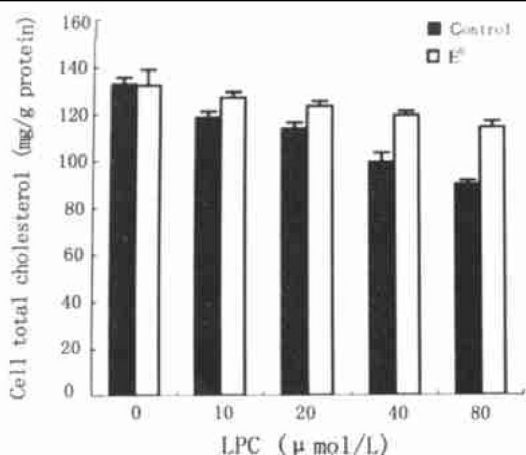


图2. 加入LPC培养后巨噬细胞源泡沫细胞中总胆固醇含量.

Figure 2. Content of total cholesterol in macrophage foam cells after incubation with LPC.

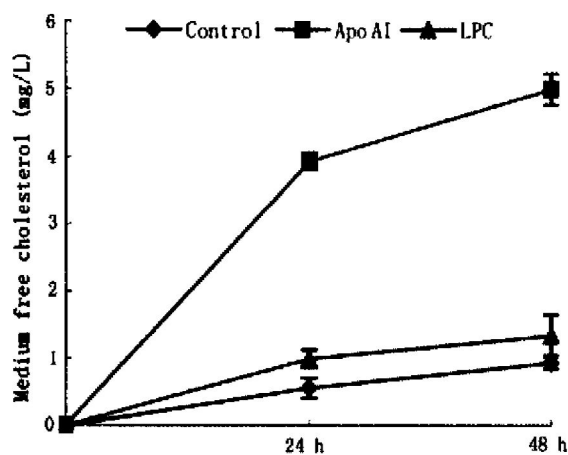


图3. 对照组加入载脂蛋白A iv或LPC后培养基中游离胆固醇含量.

Figure 3. Content of free cholesterol in medium after incubation with apo A iv or LPC in control group.

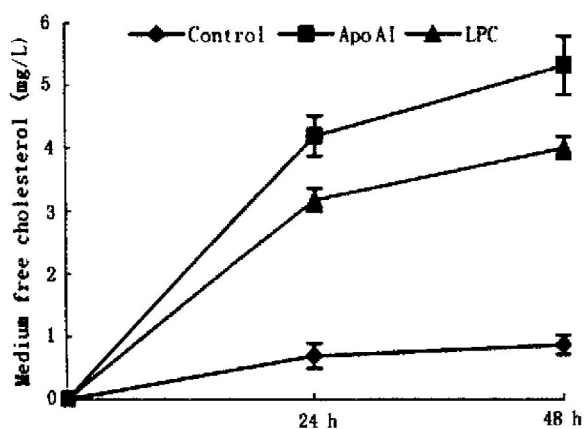


图4. E⁰组加入载脂蛋白A iv或LPC后培养基中游离胆固醇含量.

Figure 4. Content of free cholesterol in medium after incubation with apo A iv or LPC in E⁰ group.

3 讨论

LPC 是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)的主要氧化成分之一,在As的发生发展过程中所起的作用至今尚未完全阐明。研究发现,LPC 能促进单核细胞的化学趋化作用,促进巨噬细胞增殖^[5],抑制内皮源性舒张因子引起的血管舒张^[6]。这些作用被认为是具有致As作用的。另一方面,LPC 能引起内皮依赖性血管舒张,诱导内皮细胞一氧化氮合酶产生^[7],这些作用又是具有拮抗As作用的。本文研究发现,在体外无HDL或载脂蛋白A iv存在的情况下,LPC 能促进巨噬细胞源泡沫细胞中胆固醇外流,且在一定浓度范围存在剂量效应关系。LPC 引起的胆固醇外流主要是游离胆固醇,这一点是与高密度脂蛋白及载脂蛋白A iv引起胆固醇外流的作用类似。本研究所发现的LPC 诱导巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流的效应证实了Hara等^[1]的研究报道,提示LPC 可能具有减少早期As巨噬细胞源泡沫细胞的形成,也为LPC 的抗As作用提供了证据。

LPC 促使泡沫细胞胆固醇外流的机制至今尚不清楚,由于LPC 不能象HDL或载脂蛋白A iv一样本身具有运载胆固醇流出细胞的能力,它必然通过诱导某种载体来把胆固醇运载出细胞。Hara等的研究将含有外流胆固醇的培养基进行超速离心并进行电镜分析,发现由LPC 诱导外流的胆固醇是以脂蛋白的形式存在的。进一步分析发现,LPC 能增加巨噬细胞分泌载脂蛋白E,并且推测LPC 引起的外流胆固醇可能是以含载脂蛋白E的脂蛋白形式存在的。

载脂蛋白E主要存在于乳糜微粒、VLDL和HDL亚型中,在体内胆固醇转运过程中作为脂蛋白配体发挥作用,通过受体介导途径参与机体脂质代谢。据研究报道,巨噬细胞能够合成和分泌载脂蛋白E^[8]。为证实LPC 是否是通过刺激巨噬细胞分泌载脂蛋白E来诱导胆固醇外流的,采用E⁰小鼠作为腹腔巨噬细胞供体,发现与正常组相比,E⁰组巨噬细胞源泡沫细胞由LPC 诱导的胆固醇外流显著减少。该结果说明在载脂蛋白E基因表达缺陷、巨噬细胞无法分泌载脂蛋白E的情况下,由LPC 诱导的胆固醇外流明显受阻,提示LPC 可能主要是通过刺激巨噬细胞源泡沫细胞分泌载脂蛋白E来诱导胆固醇外流的。

LPC 是通过何种机制来刺激载脂蛋白E分泌的,至今尚未研究清楚。研究发现,LPC 能引起细胞

内钙离子浓度升高^[9], 激活细胞内蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)^[10]。LPC 是否通过激活第二信使系统来刺激巨噬细胞源泡沫细胞分泌载脂蛋白 E 目前并不明确, 还需要更深入的研究。本研究还发现载脂蛋白 A iv 引起的胆固醇外流量显著高于 LPC, 而且在 E⁰ 组, LPC 引起的胆固醇外流显著受阻, 而载脂蛋白 A iv 引起的胆固醇外流则未受影响, 提示由 LPC 诱导胆固醇外流的机制与载脂蛋白 A iv 引起的胆固醇外流不同。

巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流在 As 的形成和转归中具有重要的意义, HDL 或载脂蛋白 A iv 能促进巨噬细胞源泡沫细胞胆固醇外流就是其抗 As 的主要表现之一。虽然本研究发现 oxLDL 的主要成分之一 LPC 能诱导胆固醇外流, 但这一条外流途径毕竟不是胆固醇外流的主要途径, 而且 LPC 引起的胆固醇外流效率也不如 HDL 和载脂蛋白 A iv, 所以 LPC 由于诱导胆固醇外流所起的抗 As 作用尚难定论。Hara 等推测 LPC 诱导胆固醇外流的作用可能部分解释 oxLDL 与 acLDL 相比, oxLDL 诱导形成的巨噬细胞源泡沫细胞中胆固醇酯蓄积量相对较少的现象。

[参考文献]

- [1] Hara S, Shike T, Takasu N, et al. Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1 258-266
- [2] Basu SK, Goldstein JL, Anderson RG, et al. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73**: 3 178-182
- [3] Gamble W, Vaughan M, Kruth HS, et al. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *J Lipid Res*, 1978, **19**: 1 068-070
- [4] Liu SX, Zhou mei, Chen Y. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*, 1996, **121**: 55-60
- [5] Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, et al. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 31 430-436
- [6] Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett K, et al. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low density lipoprotein. *Nature*, 1990, **344**: 160-162
- [7] Saito T, Wolf A, Menon NK, et al. Lysolecithins as endothelial-dependent vascular smooth muscle relaxants that differ from endothelial-derived relaxing factor (nitric oxide). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 8 246-252
- [8] Swertfeger DK, Hui DY. Apolipoprotein E: a cholesterol transport protein with lipid transport-independent cell signaling properties. *Front-Biosci*, 2001, **1** (6): 526-535
- [9] Yu LP, Netticadan T, Xu YJ, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine induced increase in intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **286**: 1-6
- [10] Matsumura T, Sakai M, Kobori, et al. Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low density lipoprotein induced macrophage growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 3 013-018

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

关于在中国科技论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊中引用我刊文章获赠我刊次年杂志的告示(1)

本刊编辑部

论文被引用是发表的论文具有价值的体现。自创刊以来, 我刊一直重视此项工作, 极力鼓励作者引用中文文献, 鼓励作者引用自己发表了论文, 鼓励其他作者引用发表在我刊的论文。郑重许诺: “凡在中国科学技术论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了本刊的文章者, 凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。”在 2002 年内, 经作者申报和编辑部查实, 第一批有下列作者获赠 2003 年全年杂志一份:

夏 昱, 郑州市第三人民医院神经内科;
陈亚红, 北京大学第三医院呼吸科;
王关嵩, 第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所;

喻 红, 武汉大学医学院生物化学教研室;
任国庆, 镇江医学院附属医院心内科;
齐 峰, 成都军区昆明总医院心内科;
王锦生, 上海市闸北区临汾医院心血管内科。