

激素敏感脂酶基因高度表达对泡沫细胞形成的作用

刘国庆* 蔡海江 陈 琪 范乐明 Edward Abdullah*

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心 南京 210029)

Effect of Hormone-sensitive Lipases Over-expression on the Formation of Chinese Hamster Ovary Cell Derived Foam Cell

LIU Guo-Qing* CAI Hai-Jiang CHEN Qi FAN Le-Ming Edward Abdullah*

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, P. R. China. * Molecular Biology Institute, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA)

ABSTRACT A foam cell model was developed by exposure of Chinese Hamster ovary cells to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ β -VLDL. In this foam cell model hormone-sensitive lipase (HSL) activity was overexpressed using adenovirus complexed with the rat HSL gene. Nearly 300 folds increase of intracellular cholesteryl ester hydrolase activity was achieved in transfected cells compared with the control cells. When cells overexpressing HSL were incubated with β -VLDL, cholesteryl ester levels were only 25% of those seen in control cells. Thus, HSL strongly inhibits cholesteryl ester accumulation in this foam cell model.

KEY WORDS Hormone-sensitive lipase; Foam cell; Adenovirus; Transfection

摘要 中国仓鼠卵细胞在给予 β -VLDL 后, 细胞内蓄积胆固醇酯, 形成泡沫样细胞。以腺病毒基因转移方法将激素敏感脂酶基因转染到中国仓鼠卵细胞中, 得到了来自激素敏感脂酶的胆固醇酯水解活性高度表达, 此时, β -VLDL 导致的胆固醇酯蓄积作用被阻断, 提示增加胆固醇酯水解可以防止泡沫细胞形成。

关键词 激素敏感脂酶; 泡沫细胞; 腺病毒; 转染

在动脉粥样硬化早期, 动脉壁中出现了在胞浆中聚积大量胆固醇酯的泡沫细胞。已知在泡沫细胞的形成过程中, 这些细胞除了摄取了过量的修饰低密度脂蛋白, 细胞内胆固醇酯化的增加和胆固醇酯水解的减少也是导致胆固醇酯蓄积的重要因素^[1]。胆固醇的酯化是由脂肪酰辅酶 A-胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 所控制的。而人体内目前所知的两种主要胆固醇酯水解酶, 溶酶体胆固醇酯酶和胰羧基酯酶 (CEL), 则不参与细胞浆中胆固醇酯的水解。有人根据近来在多种细胞中检测到激素敏感脂酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 基因的表达, 以及 HSL 不仅分解甘油三酯, 也有较强的胆固醇酯水解功能, 同时主要分布在细胞浆中, 因而认为 HSL 可能是胞浆中的胆固醇酯水解酶^[2]。目前有不少研究组正在从生理和病理学的角度研究 HSL 在动脉粥样硬化中的作用^[3], 而本研究则应用生物工程的方法, 以腺病毒载体技术将 HSL 基因转移至细胞内, 并得到高度表达, 以观察对细胞胆固醇代谢及泡沫细胞形成的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与细胞

HSL 基因组装在哺乳动物细胞基因表达质粒 pLen 中, 转化大肠杆菌 HB101 后, 经 Triton 溶解和两次氯化铯超速离心提纯质粒 DNA。中国仓鼠卵细胞 (Chinese Hamster ovary cell, CHOC) Pro5 购自 ATCC, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中备用。

1.2 脂蛋白制备

β -VLDL 系自喂饲 1% 胆固醇 3 个月以上的家兔血浆中提取。新鲜血浆上铺 $d=1.006$ 的氯化钠缓冲液后, 在瓦平转头中用 38 000 r/min 离心 18 h, 吸出顶端脂蛋白组分后透析 24 h 待用。

* 美国加州大学洛杉矶分校分子生物学研究所。

1.3 去毒腺病毒介导的基因转移

HSL 基因表达质粒根据 Wgner 的腺病毒-聚赖氨酸方法转移至 CHO 细胞中^[1], 在细胞约 80% 融合时, 以 PBS 洗一遍, 加入 1/4 体积的 HEPES 缓冲液, 其中含生物素标记的腺病毒 (4.5×10^9), 聚赖氨酸-streptavidin, HSL 表达质粒 (3 μ g) 和聚赖氨酸-转铁蛋白 (2.5 μ g), pH 7.4。再加入 3/4 体积不含血清的 DMEM, 37°C, 两小时后洗去腺病毒-DNA 溶液, 加含血清的普通培养液。24 h 后检测胆固醇酯水解活性的表达。为防止腺病毒对细胞的胆固醇水平有任何影响, 对照细胞均采用假转染, 即对照细胞也给以相同的腺病毒复合物溶液, 但其中不含质粒 DNA。

1.4 胆固醇酯水解活性的检测

细胞在含 0.25 mol $\cdot$ L⁻¹ 的蔗糖缓冲液中超声破碎, 经短暂离心后取上清液检测胆固醇酯水解活性。底物为胆固醇-¹⁴C-油酸酯与卵磷脂经超声制成的乳剂。上清液与底物在 37°C 温育 30 min, 提取降解的 ¹⁴C-油酸, 液体闪烁计数器检测放射性^[5]。毫单位的定义是在 37°C 温育过程 60 min 内生成的脂肪酸微摩尔数。

1.5 胆固醇及蛋白检测

细胞在匀浆后以等量氯仿-甲醇抽提, 根据 Gamble 的醇-荧光方法, 分别检测游离和总胆固醇含量^[6]。胆固醇酯的含量则据游离和总胆固醇之差算出。细胞蛋白含量以 Bradford 方法测定^[7]。

1.6 统计学处理

所有数据均以均值士标准误差表示, 组间比较采用双侧 t 检验。

2 结果

2.1 泡沫细胞模型的建立

通过预实验发现, CHO 细胞在给以 β -VLDL 后, 可以导致细胞内出现空泡样颗粒, 经油红 O 染色后证明为脂质颗粒。如 Tab 1 所示, 在向培养液中加了 20 μ g/ml 的 β -VLDL 培养 24 和 48 h 后, 胆固醇酯含量比对照组分别要增高 4 和 8 倍, 均超过总胆固醇的 70%。而游离胆固醇在加 β -VLDL 培养 24 h 后与对照组没有差异, 48 h 则可见轻度增高。根据细胞学定义, 胆固醇酯超过总胆固醇的 50% 就可以视为泡沫细胞^[8], 因此, 本实验中所应用的 CHO 细胞在加 β -VLDL 培养后, 符合泡沫细胞模型的标准。

Tab 1. Changes of cholesterol amount in CHO cells incubated with β -VLDL

	Amounts of cholesterol (μ g/mg cell protein)		
	CE	FC	TC
control CHO cells	14 $\pm$ 3	23 $\pm$ 2	37 $\pm$ 5
CHO cells + β -VLDL (24 h)	61 $\pm$ 4*	26 $\pm$ 4	88 $\pm$ 8*
CHO cells + β -VLDL (48 h)	113 $\pm$ 33*	42 $\pm$ 8*	155 $\pm$ 30*

CE: cholesteryl ester, FC: free cholesterol, TC: total cholesterol.

* $P < 0.05$ as compared with control CHO cells

2.2 腺病毒介导的 HSL 高度表达

在以往的研究中, 我们曾以电转染的方法, 用相同的 HSL 表达质粒, 在含有 SV40T 抗原的 COS 细胞中取得了超过对照组一百倍以上的 HSL 基因高度表达^[5]。但在 CHO 细胞中, 应用电转染、磷酸钙共沉淀和脂质体等常规转染方法, 只能得到低水平的 HSL 基因表达, 不能够满足本实验的要求。因此, 我们采用了腺病毒介导的基因转移技术, 利用腺病毒能有效地进入哺乳动物细胞, 并阻止溶酶体对 DNA 降解的特点, 在泡沫细胞

模型中得到了 HSL 的高度表达。从 Fig 1 可以看出, 对照组 CHO 细胞胆固醇酯降解活性只有几个毫单位, 加了 β -VLDL 对胆固醇酯降解活性也没有明显影响。然而, 在腺病毒介导的 HSL 基因转移后, CHO 细胞胆固醇酯降解活性在 24 h 后达到 1 200 多毫单位, 比对照组增加了三百多倍。表明腺病毒介导的基因转移在 CHO 细胞系是非常有效的。

2.3 HSL 高度表达阻断泡沫细胞的形成

当细胞内的胆固醇酯水解活性大大提高

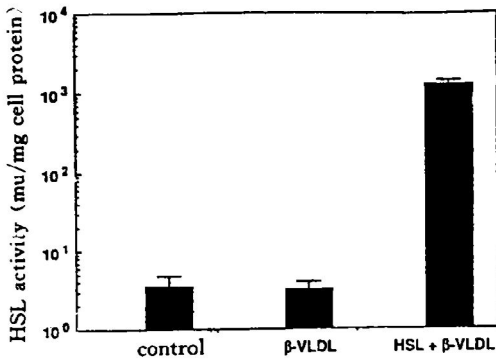


Fig 1. The HSL activity in CHO cells with or without HSL gene transfection

后, CHO 细胞的胆固醇含量发生了明显的改变。如 Fig 2 所示, 对照细胞在加了 β -VLDL 后, 胆固醇酯含量从 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 细胞蛋白增加到 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。而在 HSL 转染后, 尽管给以细胞相同量的 β -VLDL, 细胞胆固醇酯含量却与未加 β -VLDL 的对照相近, 只加对照的四分之一 β -VLDL, 胆固醇酯的蓄积就被阻断了。油红 O 染色也发现转染后的细胞在给以 β -VLDL 后没有脂质颗粒出现。此外, 细胞的游离胆固醇水平在转染后也有所增加, 虽然不象胆固醇酯的改变那样明显, 但亦达到统计学上显著差异的水平。表明 HSL 在细胞内的高度表达有可能是通过胆固醇酯分解的增强所造成的。至于为什么游离胆固醇的增加并不平行于胆固醇酯的减少, 这一点将在讨论中予以进一步分析。由于总胆固醇只是游离胆固醇与胆固醇酯含量之和, 为方便说明, Fig 2 中未列出总胆固醇值。

3 讨论

Goldstein 等在八十年代初就指出, 泡沫细胞中的胆固醇酯是经过持续的水解和酯化, 而且必定是在酯化大于水解的条件下才逐渐蓄积的^[9]。尤其是胆固醇酯不能穿过细胞膜, 只有在水解为游离胆固醇后才可能自细胞中清除。本研究首次以腺病毒基因载体的基因转移至 CHO 细胞中, 得到了细胞内胆固醇酯水解活性的高度表达, 并从实验上证实, 技术将 HSL 胆固醇酯水解的增加可以阻断胆固醇酯的蓄积, 防止泡沫细胞形成。

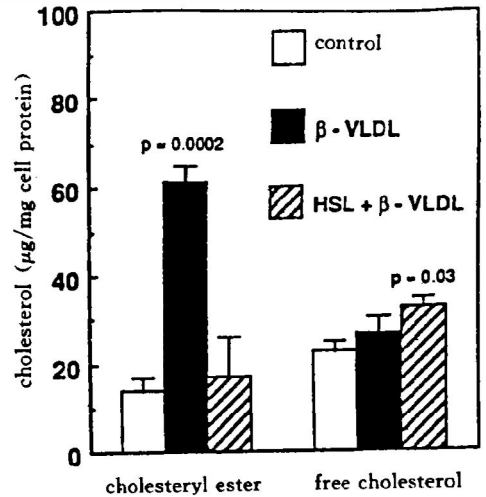


Fig 2. The effect of HSL gene transfection on amounts of cholesterol in CHO cells

CHO 细胞的内源性胆固醇酯水解活性不到十个毫单位, 若以泡沫细胞模型的胆固醇酯含量为 60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白计, 其转换率约为两天左右; 而在 HSL 基因高表达, 胆固醇酯水解的活性达到一千多毫单位时, 同样量的胆固醇酯只需 10 min 就会完全降解, 因此将不会有胆固醇酯的蓄积。当然, 胆固醇酯降解的产物、游离胆固醇和脂肪酸, 也有可能抑制细胞对 β -VLDL 的进一步摄取, 从而减少胆固醇酯的蓄积。例如, 细胞内游离胆固醇增多时就会对低密度脂蛋白受体产生负反馈抑制。但 β -VLDL 据认为是通过另一种不受细胞内游离胆固醇调节的受体, 即低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 所摄取的^[10]。我们的实验也表明, 在给 β -VLDL 48 h 后, 尽管细胞内游离胆固醇含量明显增高, 但胆固醇酯的蓄积并未停止, 说明 β -VLDL 并非主要通过低密度脂蛋白受体摄取的。

动脉粥样硬化病变中的泡沫细胞主要由巨噬细胞和部分平滑肌细胞转化而来。小鼠的腹腔巨噬细胞和其他巨噬细胞株在体外实验时给以修饰 LDL 后, 很容易形成蓄积大量胆固醇酯的典型泡沫细胞。然而巨噬细胞由于降解功能强, 外源性基因很难通过一般的转染方法在巨噬细胞中表达, 即便是腺病毒基因载体技术也没有明显效果, 因此我们选

择 CHO 细胞做为泡沫细胞模型进行研究。尽管 CHO 细胞不具有清道夫受体, 但被摄取的 β -VLDL 在细胞内的代谢途径与巨噬细胞经清道夫受体入胞的修饰脂蛋白相似, 其最终结果都是胆固醇酯在细胞内形成脂肪颗粒。当然, CHO 细胞形成的泡沫细胞模型与巨噬细胞转化的泡沫细胞毕竟不完全相同, 有关的研究还需在后者中进一步开展。

我们的研究虽然表明, HSL 的高表达阻止了细胞内胆固醇酯的蓄积, 然而要真正明确 HSL 在泡沫细胞形成和转化中的作用, 还需要采用其他的方法来进一步研究, 如 HSL 的基因灭活, 反义核苷酸技术等。尽管如此, 对于目前从脂代谢角度防治早期动脉粥样硬化采取的两项主要措施, 降低 LDL 水平和提高 HDL 浓度来说, 本研究从实验上证明, 增强胆固醇酯的水解也是一个重要方面, 这与最近有人发现, HDL 只有在同时给以 cAMP 才能促进泡沫细胞中胆固醇酯的清除^[11]的结果是相一致的。总之, 胆固醇酯水解做为细胞胆固醇清除的第一步, 对于动脉粥样硬化的发生和发展过程是有重要意义的, 值得深入研究。

4 参考文献

- 1 Rothblat GH, Phillips MC. Cholesterol efflux from arterial wall cells. *Curr Opin Lipidol*, 1991, 2: 288
- 2 Small CA, Goodacre JA, Yeaman SJ. Hormone sensitive lipase is responsible for the neutral cholesterol ester lipase activity in macrophages. *FEBS Letters*, 1989, 247: 205
- 3 Ishii I, Oka M, Katto N et al. β -VLDL induced cholesterol ester deposition in macrophages may be regulated by neutral cholesterol esterase activity. *Arterioscl and Thromb*, 1992, 12: 1139
- 4 Wagner E, Zatloukal K, Cotten M et al. Coupling of adenovirus to transferrinpolylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of trasfected genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6099
- 5 刘国庆, 蔡海江, 范乐明 et al. 中性胆固醇水解酶活性在 COS 细胞中的高度表达. 南京医学院学报, 1993, 13: 307
- 6 Gamble W, Vaughan M, Kruth HS et al. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- and nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *J Lipid Res*, 1978, 19: 1068
- 7 Bradford MD. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248
- 8 Fogelman AM, Shechter I, Seager J et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 2214
- 9 Brown M, Goldstein J. Lipoprotein metabolism in macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*, 1983, 52: 233
- 10 Kowal RC, Herz J, Goldstein JL et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apolipoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5810
- 11 Bernard DW, Rodriguez A, Rothblat GH et al. cAMP stimulates cholesteryl ester clearance to high density lipoproteins in J774 macrophages. *J Biol Chem*, 1991, 266: 710