

糖尿病患者血清低密度脂蛋白在人单核巨噬细胞中代谢异常*

刘克年 刘乃丰 陈日新 张丽容

(南京铁道医学院心血管病研究室 南京 210009)

The Metabolism of Low Density Lipoprotein Isolated from Diabetic Patients in Human Monocyte-derived Macrophages

LIU Ke-Nian LIU Nai-Feng CHEN Ri-Xin ZHANG Li-Rong

(Department of Cardiovascular Disease, Nanjing Railway Medical College, Nanjing, 210009)

ABSTRACT Macrophages are proved to be the precursors of the lipidladen foam cells that characterize early atherosclerotic lesion. Hyperglycemia in diabetic patients lead to the high concentration of glycated low density lipoprotein (LDL) and abnormal metabolism of LDL. In this study, we used radioreceptor assay to compare the metabolic results of LDL from diabetic patients and from non-diabetic control subjects. We found that both uptake and degradation of diabetic LDL were significantly higher than that of control LDL. We also discovered that the total cholesterol content of cultured macrophages incubated with diabetic LDL significantly increased as compared with that incubated with control LDL. This study suggests that interaction between glycated LDL and macrophages accelerates formation of foam cells, and contributes to the accelerated atherosclerosis of diabetes.

KEY WORDS Diabetes; Low density lipoprotein; Glycation; Human macrophage; Atherosclerosis

摘要 近年证实动脉粥样硬化病灶中泡沫细胞来源于单核巨噬细胞, 已发现糖尿病患者糖基化低密度脂蛋白 (LDL) 水平增高, 代谢异常。本文以放射受体分析法比较 12 例糖尿病患者及 12 例年龄、

性别配对的健康人血 LDL 在人外周血巨噬细胞中的代谢, 发现糖尿病患者 LDL 的摄入和降解明显高于对照组, 与其孵育过的巨噬细胞内胆固醇明显增高。提示糖尿病患者 LDL 与巨噬细胞相互作用易形成泡沫细胞, 高血糖引起的 LDL 糖基化及其代谢异常可能是糖尿病人易患动脉粥样硬化的重要机制之一。

关键词 糖尿病; 低密度脂蛋白; 糖基化; 人单核巨噬细胞; 动脉粥样硬化

早有报道, 糖尿病患者易患动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, As), 且已成为主要并发症和死亡原因, 机制尚未完全阐明。国外学者发现, 糖尿病患者高血糖可使 LDL 糖基化, 在多种培养细胞上受体途径代谢受阻, 细胞内脂质含量增加, 可能与糖尿病 As 发生密切相关^[1]。近年来证实, 单核巨噬细胞 (Macrophage, Mφ) 与各种修饰脂蛋白的相互作用是泡沫细胞形成的重要环节。因此, 本文以放射受体分析法观察了 12 例糖尿病血糖未控制者血 LDL 在培养的人 Mφ 中的代谢, 并与 12 例年龄、性别配对正常人比较, 旨在为阐明糖尿病人易患 As 的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Percoll 分离液 (Pharmacia), 1640 培养基 (Scientific), 小牛血清 (杭州四季青奶品厂), 人血清白蛋白 (上海生物制品研究所), 胆固醇醇联试剂 (上海医药工业研究所), 聚乙二醇-6000 (日本进口分装), 无载体 Na¹²⁵I (中国原子能研究院, 比放射性

140 mci/ml), 健康人空腹静脉外周血 (南京中心血站)。

1.2 实验对象

糖尿病组, 共 12 例, 其中 I 型 5 例, II 型 7 例, 均符合 1980 年 WHO 诊断标准。对照组 12 例, 与糖尿病组年龄、性别配对的正常人, 两组的血脂、血糖水平见 Tab 1。

Tab 1. Plasma glucose and lipids in diabetic and control subjects ($\bar{x} \pm s$, mmol. L⁻¹).

groups	n	Plasma glucose	plasma total cholesterol	plasma triglycerides
control	12	4.9 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 1.4	1.1 $\pm$ 0.4
diabetics	12	11.3 $\pm$ 3.1 [※]	6.4 $\pm$ 1.1	2.1 $\pm$ 0.5 [※]

※ compared with control, $P < 0.05$

1.3 实验方法

1.3.1 人血清 LDL 的分离及同位素标记⁽²⁾ 采用垂直转头单个不连续密度梯度超速离心法分离 LDL。分别将两组新鲜血清分离出血清, 用固体溴化钾调密度至 1.30, 上面铺加密度为 1.006 氯化钠溶液, 用 RPV-50T 型垂直转头, 在日立 SCP-85H 型超速离心机上慢加速程序, 10℃, 50 000 rpm 离心 150 min, 分部收集各脂蛋白带, 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度后, 将分离的 LDL 用 PBS (含 0.01% EDTA, pH 7.4) 充分透析, 浓缩, 经微孔过滤除菌, 4℃保存。一氧化碘法分别标记两组 LDL, 使其成为¹²⁵I-LDL; 透析法除去游离碘, 测量标记物游离碘含量及比放射性。

1.3.2 单核巨噬细胞的分离和培养⁽³⁾ 用 Percoll 密度梯度液分离出血液中单个核细胞, 然后利用单核细胞贴壁的性质分离出单核细胞, 在含 30% 自体血清的 1640 培养液中培养 7 天 (37℃, 5% CO₂) 诱导成熟为巨噬细胞, 台盼兰染色证实细胞平均活力为 97%, 瑞氏染色鉴定巨噬细胞纯度为 91%。

1.3.3 细胞内胆固醇含量测定 在直径 35 mm 的培养板孔中, 每孔加入约 1.2×10^7 个单个核细胞, 经纯化培养诱导 7 天, 弃去培养液, 用 1640 培养液清洗细胞一次, 去除残留的人体血清, 然后分别加入浓度均为 150 μ g/ml 的糖尿病患者和对照组的 LDL, 继续培养 20 h。用 PBS 清洗细胞 2 次, 提取细胞内胆固醇, 以胆固醇酶联试剂测量细胞内总胆

固醇。

1.3.4 低密度脂蛋白受体途径代谢过程⁽⁴⁾ 每个培养孔均需单个核细胞 5×10^6 个, 先用含 0.05% 人血清白蛋白的 1640 液培养 12 h 诱导 LDL 受体活性, 清洗细胞 1 次后, 加入指定浓度 (10, 40 μ g/ml) 的糖尿病患者和对照组的 LDL 孵育 12 h, 收集各孔的培养液待测降解值, 细胞移至冰浴中止反应。用预冷至 4℃ 的含 2 mg/ml 小牛血清白蛋白的 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入去离子水 1 ml, 待细胞破碎后, 取 0.5 ml 测 cpm 代表细胞内摄入 LDL 的量, 其余用于测量蛋白含量。向待测降解值的培养液中依次加入三氯乙酸、碘化钾、过氧化氢和氯仿沉淀, 抽提后测定水相中 cpm 值, 代表细胞降解¹²⁵I-LDL 的量。用加过量非标记 LDL 的方法测量受体特异性摄入、降解值。

1.3.5 数据处理 各标本的 cpm 值经过各组的¹²⁵I-LDL 比放射性及相应标本的蛋白含量校正, 表示为 12 h 内 ng LDL/mg 细胞蛋白, 两组数据经方差齐性检验后, 用 t 检验比较两组数据的显著性差异。

2 结果

2.1 糖尿病患者 LDL 增加 M ϕ 细胞内胆固醇含量

糖尿病患者 LDL (150 μ g/ml) 与人 M ϕ 共同培养 20 h 后, 测定细胞内胆固醇含量为 92.04 ± 10.64 μ g/mg 细胞蛋白, 而相同浓度的正常人 LDL 共同培养的 M ϕ 细胞内胆固醇含量为 67.02 ± 12.56 μ g/mg 细胞蛋白, 两者差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 糖尿病患者 LDL 在 M ϕ 中的受体途径代谢

将糖尿病患者的¹²⁵I-LDL 和对照组的¹²⁵I-LDL 分别以两种浓度与人 M ϕ 共同培养 12 h, 发现糖尿病组的¹²⁵I-LDL 在两种浓度下摄入和降解速率均显著高于对照组 LDL ($P < 0.05$, Tab 2)。

3 讨论

自从发现糖尿病患者体内糖基化血红蛋白浓度增高以来, 又相继发现许多功能和结构蛋白质被糖基化, 如白蛋白、纤维蛋白、红细胞膜蛋白、脂蛋白、IgG、晶体等, 且各种

Tab 2. Uptake and degradation of LDL of control

subjects and diabetic patients in human monocyte-derived macrophages for 12 h.

groups	concentration of LDL ($\mu\text{g/ml}$)	uptake degradation (ng LDL/mg cell protein)	
control	10	96.6 $\pm$ 21.4	246.9 $\pm$ 80.4
	40	312.8 $\pm$ 63	417.4 $\pm$ 66.4
diabetics	10	216.6 $\pm$ 107.3*	348.8 $\pm$ 54.9*
	40	409.2 $\pm$ 77.1*	616.8 $\pm$ 129*

* compared with control, $P < 0.05$

糖基化蛋白质浓度都随着血糖浓度增高而增加。糖尿病患者体内蛋白质糖基化是导致糖尿病各种慢性并发症发生的重要因素^[5]。其中, LDL 的糖基化最受重视。据报道, 糖尿病患者体内糖基化 LDL 浓度可比正常人高 3~4 倍, 与血糖水平呈正相关^[6]。正常情况下, LDL 主要通过细胞膜上特异性的 LDL 受体途径代谢, 由于糖基化后 LDL 与受体识别的关键部位—赖氨酸残基被修饰, 与受体的亲和力降低, 使 LDL 受体途径代谢受阻。我们以前的工作表明, 糖基化 LDL 在人成纤维细胞上结合、摄入和降解值明显降低, 但能使细胞内胆固醇含量显著增高^[7], 这是由于无受体途径精密负反馈调节机制的非特异性入胞过程相对增强, 使 LDL 大量进入细胞并积聚。

近年来, 免疫组织化学和超微结构方法证实, 动脉粥样硬化斑块中处于分裂中期的泡沫细胞大多呈抗巨噬细胞单克隆抗体阳性, 而抗平滑肌细胞肌纤维蛋白单抗阴性, 表明泡沫细胞来源于血液中的单核巨噬细胞^[8]。巨噬细胞具有多种脂蛋白受体, 其中清道夫受体可识别多种带负电基因的各种修饰 LDL, 如乙酰 LDL、MDA-LDL 等, 这些修饰脂蛋白与单核巨噬细胞的相互作用, 是泡沫细胞形成的重要机制^[9]。

本文结果表明, 糖尿病患者 LDL 与人单核巨噬细胞共同培育后, 摄入和降解过程明显增强, 细胞内胆固醇含量增高, 提示糖尿

病人 LDL 经单核巨噬细胞代谢异常, 与本室同时观察到的体外糖基化 LDL 在人单核巨噬细胞代谢类似, 这种代谢异常与 LDL 糖基化引起的结构和功能改变有关, 与国外学者的研究结果相同^[10]。至于糖尿病人 LDL 被单核巨噬细胞代谢增强的机制尚不清楚。有报道糖基化 LDL 与清道夫受体途径代谢的乙酰 LDL 无竞争抑制, 故清道夫受体可能不是糖基化 LDL 代谢的主要途径^[5]。Vlas-sara 等在体外将 LDL 与葡萄糖一起孵育 8 周, 可导致糖基化终产物形成, 这种带有糖基化终产物的 LDL 可被单核巨噬细胞大量摄取, 且可被含糖基化终产物的白蛋白所竞争, 说明巨噬细胞膜上可能存在识别、结合糖基化终产物的位点或受体^[11]。但正常情况下, LDL 寿命较短, 不易形成糖基化终产物。此外, 糖基化 LDL 是否通过非特异性途径大量入胞, 目前尚未定论。曾设想, 在巨噬细胞膜上可能存在着一种高效能低亲合力的糖基化 LDL 受体, 类似于 Fogelman 等描述的甲基化 LDL 受体^[10], 单核巨噬细胞可能以此受体大量摄取糖基化 LDL。但此途径无负反馈调节机制, 易使胆固醇在细胞内大量积聚。此外, 糖尿病患者 LDL 还能刺激单核巨噬细胞内胆固醇酯的合成^[5]。

本文直接从糖尿病患者血中分离 LDL, 并从健康人外周血中分离单核细胞, 体外诱导成熟为巨噬细胞, 使其与体内的单核巨噬细胞生物学特性相似, 观察两者的相互作用过程, 将体外实验与临床紧密结合起来, 结果相互印证, 充分证明糖尿病患者 LDL 与单核细胞的相互作用在糖尿病易患动脉粥样硬化的机制中起重要作用。提示积极改善糖代谢有可能减轻 LDL 糖基化及其与单核巨噬细胞的代谢异常, 有利于防治糖尿病人的心血管并发症。

4 参考文献

- 1 Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986, 232:

- 34~36.
- 2 Betteridge DJ. Diabetes, lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Bri Med Bull*, 1989, 45: 285~311.
 - 3 Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*, 1984, 101: 527~537.
 - 4 Diane ED, John BL. Monocytes-to-macrophage transition in vitro; a systematic study using human cells isolated by fractionation on Percoll. *J Immun Methods*, 1989, 118: 9~16.
 - 5 Lopes-Virrelli MF, Klein RL, Lyons IJ et al. Glucosylation of low density lipoprotein enhances cholesterol ester synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes*, 1988, 37: 550~557.
 - 6 Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophages; implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Review Biochem*, 1983, 52: 223~261.
 - 7 刘乃丰, 黄元伟, 楼定安 et al. 糖基化低密度脂蛋白代谢与动脉粥样硬化关系的实验研究. *中华心血管病杂志*, 1990, 18 (6): 353~356.
 - 8 Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW et al. Stimulation of cholesterol ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low density lipoprotein from Type 1 diabetic patients; the influence of nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins. *Diabetologia*, 1987, 30: 916~923.
 - 9 Sasaki J, Cottam GL. Glycosylation of LDL decreases its ability to interact with high-affinity receptors of human fibroblasts in vitro and decreases its clearance from rabbit plasma in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 713: 199~207.
 - 10 Fogelman AM, Hokom MM, Haberland ME et al. Lipoprotein regulation of cholesterol metabolism in macrophages derived from human monocytes. *J Biochem*, 1982, 257: 14081~14086.
 - 11 Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins; a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 5588~5592.