

含载脂蛋白 B 的脂蛋白 对小鼠腹腔巨噬细胞内脂质的影响

刘忠民

张华征^①

(咸宁医学院生物化学教研室, 湖北省咸宁市 437100)

The Effect of Apolipoprotein B-containing Lipoproteins on Lipids Content in Mouse Peritoneal Macrophages

LIU Zhong-Min and ZHANG Hua-Zheng^①

(Department of Biochemistry, Xianning Medical College, Xianning 437100, ①Department of Biochemistry, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT Macrophages were incubated with apolipoprotein B-containing lipoproteins, the complexes of lipoprotein with dextran sulfate (DS) or antibodies (lipoprotein cholesterol 200 mg · L⁻¹, dextran sulfate 0.4 mg or antibodies 0.1 ml) for 24 h. The cholesteryl esters (CE) in macrophages were determined by thinlayer chromatography. The results that native lipoprotein (a) did not give rise to any significant storage of intracellular cholesteryl esters (0.9 mg · g⁻¹ cell protein, $P > 0.05$); low density lipoprotein (LDL) increased CE formation in macrophages (4.0 mg · g⁻¹ cell protein, $P < 0.05$); lipoprotein (a)-DS or LDL-DS complexes caused a significant enhance in CE formation in macrophages, which were 7.7, and 8.7 mg · g⁻¹ cell protein, respectively ($P < 0.01$); similar result were observed when macrophages were incubated with both the complexes of lipoprotein (a) with antibodies against apolipoprotein (a) or apolipoprotein B and LDL with antibodies against apolipoprotein B, which were 19.9, 18.3 and 17.4 mg · g⁻¹ cell protein, respectively ($P < 0.01$). The above data showed that the complexes of apolipoprotein B-containing lipoproteins with DS or antibodies could cause lipid accumulation in macrophages.

KEY WORDS Lipoprotein (a); Low density lipoprotein; Macrophage; Dextran sulfate; Antibody

摘要 将小鼠腹腔巨噬细胞和含载脂蛋白 B 的两种脂蛋白、这两种脂蛋白与硫酸葡聚糖或相应抗体形成的复合物一起培养 24 h 后,用薄层层析法测定巨噬细胞内胆固醇酯的含量。结果发现,天然脂蛋白(a)对巨噬细胞内胆固醇酯含量影响不大(增加 8%, $P > 0.05$);天然低密度脂蛋白具有促进巨噬细胞内脂质蓄积作用(增加 35.4%, $P < 0.05$);上述两种脂蛋白与硫酸葡聚糖一起共同作用,促进巨噬细胞内胆固醇酯蓄积作用明显加强(分别由增加 8% 和 35.4% 提高到增加 68.1% 和 77.0%, $P < 0.01$);将硫酸葡聚糖改为抗载脂蛋白(a)或 B 抗体,再共同培养 24 h,上述两种脂蛋白的这种加强巨噬细胞内胆固醇酯蓄积的作用更加明显(分别提高到增加 154.0%、161.9% 和 176.1%, $P < 0.001$)。以上实验结果表明,含载脂蛋白 B 的脂蛋白与硫酸葡聚糖或相应抗体的复合物能促进巨噬细胞内脂质的蓄积。

关键词 脂蛋白(a); 低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 脂质蓄积作用; 硫酸葡聚糖; 抗体

单核细胞/巨噬细胞是泡沫细胞的主要来源之一,后者的特征是细胞以较低的速率摄取天然低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),在体内这种速率不足以造成胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)的堆积。只有当化学修饰的 LDL、动脉蛋白聚糖与 LDL 形成的复合物与巨噬细胞一起培养时,才能造成胆固醇酯的大量堆积^[1]。

脂蛋白(a)是一种血浆脂蛋白,它的许多理化性质与 LDL 相似,两者的形态和脂质组成几乎一致,并都以载脂蛋白 B 为主要载蛋白。它

①湖北医科大学生物化学教研室,武汉 430071

们最明显的区别是脂蛋白(a)中含有一个独特的抗原——载脂蛋白(a)。脂蛋白有高度的致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用。有实验证明,在动脉粥样硬化病灶中有脂蛋白(a)抗原存在^[2]。在体外,脂蛋白(a)与 LDL 相似可以与硫酸葡聚糖(dextran sulfate, DS)、以及相应的抗体相互作用形成复合物^[3]。因此,我们将 LDL、脂蛋白(a)以及它们与 DS 或相应抗体形成的复合物,与巨噬细胞一起培养,观察它们能否象修饰的 LDL 一样被巨噬细胞摄取,造成脂质的堆积,为阐明脂蛋白(a)和 LDL 的致 As 机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

昆明种小白鼠由湖北医科大学动物室提供,胆固醇和胆固醇酯为上海东风试剂厂产品,小牛血清购于华美生物工程公司,Eagle 氏培养基为 Life Technologies INC 产品,羊抗人载脂蛋白(a)抗血清和羊抗人载脂蛋白 B 抗血清由湖北医科大学生物化学教研室提供,硫酸葡聚糖为军事医学科学院产品,硅胶 G 薄层层析板(规格 10 cm×10 cm)购于烟台化工研究所,其它化学试剂为进口或国产分析纯。

1.2 脂蛋白的制备

脂蛋白的分离和鉴定方法同前^[4]。脂蛋白(a)阳性新鲜血浆先用多价阴离子化合物 $\text{Na}^+\text{pH}7\text{-Mg}^{2+}$ 沉淀包括脂蛋白(a)在内的全部含载脂蛋白 B 的脂蛋白,然后超速离心和经 Sepharose 6B 柱、抗载脂蛋白(a)Ig G Sepharose 4B 免疫亲和柱层析,经聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫扩散鉴定,得到的脂蛋白(a)、LDL 为纯品,用前经 0.45 μm 微孔膜过滤器过滤。

1.3 细胞培养

参照文献[1],从体重为 20~25 g、4~6 周龄雌性或雄性小白鼠体内获取腹腔巨噬细胞。细胞贴壁、稳定后,于实验前用 Eagle 氏培养液洗三次。所用细胞培养液除不同脂蛋白和硫酸葡聚糖或抗体外,均含有 15% 小牛血清、青霉素和链霉素各 10 万单位·L⁻¹、肝素 1 万单位·L⁻¹。

1.4 脂质提取

终止保温后,巨噬细胞用冷磷酸盐缓冲液洗三次,每瓶加 0.1 mol·L⁻¹NaOH 1.0 ml 溶解细胞。取 0.1 ml 细胞溶解液测定蛋白质含量,以示细胞数目。另取 0.4 ml 细胞溶解液用氯仿甲醇混合液(氯仿:甲醇=2

:1)提取脂质^[2]。

1.5 测定方法

1.5.1 巨噬细胞内胆固醇酯测定采用薄层层析法。硅胶 G 薄层层析板先用丙酮洗一次,点样,用正己烷:乙醚:甲醇:乙酸=90:20:3:2 体积比的混合液展层,10%磷酸钼酸乙醇溶液显色后,薄层层析板用岛津双波长色谱扫描仪 CS-930 进行斑点扫描,计算胆固醇酯的含量。

1.5.2 脂蛋白胆固醇测定采用酶法;蛋白质测定采用酚试剂(Folin-Denis)法。

1.6 实验方法

实验共分 8 组:空白对照组、LDL 组、脂蛋白 a 组、LDL-DS 组、脂蛋白(a)-DS 组、LDL-抗载脂蛋白 B 组、脂蛋白(a)-抗载脂蛋白(a)组和脂蛋白(a)-抗载脂蛋白 B 组。空白对照组仅用 Eagle 氏培养液培养;其它各组含脂蛋白胆固醇 200 mg·L⁻¹,硫酸葡聚糖 0.4 mg 或抗体 0.1 ml。37℃培养 24 h 后用薄层层析法测定细胞内胆固醇酯的含量。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白及复合物对巨噬细胞内脂质蓄积的影响

将 LDL 及复合物与小鼠腹腔巨噬细胞一起培养 24 h,测得每克巨噬细胞蛋白内含胆固醇酯的量见 Table 1。与对照组比较,LDL 使巨噬细胞内脂质含量增加 35.4%,差异有显著性意义($P<0.05$);LDL 与硫酸葡聚糖形成的复合物使巨噬细胞内脂质蓄积增加的作用明显,增加 77.0%,差异有极显著性意义($P<0.01$)。将 LDL 与抗载脂蛋白 B 共同加入培养基中,二者形成的复合物具有强烈的促进巨噬细胞蓄脂作用,其细胞内脂质含量是对照组的 2.54 倍;其促进脂质进入巨噬细胞内的作用比单用 LDL($P<0.05$)和 LDL-DS($P<0.001$)都强。

2.2 脂蛋白(a)及复合物对巨噬细胞内脂质蓄积的影响

将脂蛋白(a)及复合物与小鼠腹腔巨噬细胞一起培养 24 h,每克细胞蛋白内脂质含量见 Table 2。可见单用脂蛋白(a),对巨噬细胞内脂质含量并无影响($P>0.05$);加入 DS 后,细胞内脂含量明显增加(增加 68.1%, $P<0.01$)。将抗载脂蛋白(a)或 B 抗体与脂蛋白(a)共同作用

Table 1. The concentration of the cholesteryl ester in macrophages incubated with LDL for 24 h ($\bar{x} \pm s$, mg · g⁻¹ cell protein).

Groups	content	% of increase
control	11.3 ± 0.7	0
LDL	15.3 ± 1.8*	35.4
LDL-DS	20.0 ± 1.8**	77.0
LDL-AaLpB	28.7 ± 4.7***	154.0

① AaLpB: antiapolipoprotein. ② *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ compared with control group.

Table 2. The concentration of the cholesteryl ester in macrophages incubated with lipoprotein (a) for 24 h ($\bar{x} \pm s$, mg · g⁻¹ cell protein)

Groups	content	% of increase
control	11.3 ± 0.7	0
Lp(a)	12.2 ± 1.9*	8.0
Lp(a)-DS	19.0 ± 3.0**	68.1
Lp(a)-AaLpB	29.6 ± 3.3***	161.9
Lp(a)-AaLp(a)	31.2 ± 2.0***	176.1

① AaLpB: antiapolipoprotein B; AaLp(a): antiapolipoprotein (a). ② *: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ compared with control group.

于小鼠腹腔巨噬细胞 24 h 后,细胞内脂质含量分别为对照组的 2.76 倍和 2.62 倍,差异有极显著性统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 脂蛋白(a)和低密度脂蛋白促进巨噬细胞蓄积作用比较

从 Table 1 和 Table 2 中可见,天然 LDL 和脂蛋白(a)对小鼠腹腔巨噬细胞内脂质蓄积的影响有明显的差别,前者增加 35.4%,而后者仅增加 8.0%,两者相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),说明天然 LDL 促进巨噬细胞蓄脂作用比天然脂蛋白(a)强。然而,这两种含载脂蛋白 B 的脂蛋白与 DS 或抗载脂蛋白 B 或(a)形成复合物,其促进小鼠腹腔巨噬细胞蓄脂的作用没有差别(P 均 > 0.05)。

3 讨论

人们普遍认为含载脂蛋白 B 的脂蛋白与

动脉壁中的粘液性物质相互作用是导致脂质沉着和斑块形成的重要因素之一。我们的研究发现,虽然天然脂蛋白(a)对巨噬细胞内胆固醇酯的影响能力仅为低密度脂蛋白的 22.5%,不会造成细胞内胆固醇酯的堆积。但是,脂蛋白(a)—硫酸葡聚糖复合物同低密度脂蛋白—硫酸葡聚糖复合物一样,都能明显地促进巨噬细胞内胆固醇酯的形成,两种脂蛋白—DS 复合物促进胆固醇酯形成的能力之间无明显差异,这说明,脂蛋白—DS 复合物的形成,可能改变了脂蛋白(a)和 LDL 的代谢途径,而通过另一相似的途径被巨噬细胞摄取,引起细胞内胆固醇酯的堆积。硫酸葡聚糖是一种带负电荷的硫酸多糖,它能与乙酰化 LDL 竞争巨噬细胞上的结合点。DS 同 LDL 形成的复合物可被巨噬细胞高度亲和摄取,对细胞内胆固醇的代谢影响同乙酰化 LDL 相似^[5]。由于脂蛋白(a)—DS 复合物和 LDL—DS 复合物都是脂蛋白同 DS 形成的复合物,所以,这两种脂蛋白—硫酸葡聚糖复合物也有可能是通过此途径被细胞摄取,造成细胞内脂质的堆积。有研究资料表明^[6],脂蛋白(a)和 LDL 能同氨基葡聚糖、蛋白聚糖形成复合物,这种复合物的形成不仅部分阻止了脂蛋白与 B/E 受体的结合,而且能导致此复合物经清道夫受体途径进行代谢。在体内,脂蛋白同细胞间质物质的作用则可能保留在内皮细胞下层,形成脂蛋白复合物,这种复合物可被单核细胞/巨噬细胞的清道夫受体摄取,导致泡沫细胞的形成。

大量的研究证明,脂蛋白—抗体复合物在动脉粥样硬化的发生发展过程中是不可低估的危险因素。我们的研究还发现,当脂蛋白(a)和 LDL 在有特异性抗体存在,与巨噬细胞一起培养时,能明显地刺激巨噬细胞内胆固醇酯的形成,且脂蛋白(a)与抗载脂蛋白(a)抗体、以及抗载脂蛋白 B 抗体形成的复合物引起巨噬细胞内胆固醇酯形成的程度同 LDL 与抗载脂蛋白 B 抗体形成的复合物引起胆固醇酯的形成程度相似。这表明,脂蛋白(a)、LDL 与相应抗体形成的免疫复合物,可能以类似的途径被巨噬细

胞表面的泡沫细胞受体摄取,导致细胞内脂质的堆积。体外研究发现,脂蛋白(a)同 LDL 相似,能在 CuCl_2 的介导下氧化修饰,并产生新抗原决定簇^[7]。在体内,脂蛋白(a)的氧化修饰则可能象氧化修饰的 LDL 一样产生相应抗体^[8],形成抗原-抗体免疫复合物,加速巨噬细胞对脂蛋白的摄取和泡沫细胞的形成。

综上所述,脂蛋白(a)和 LDL 与硫酸葡聚糖或相应抗体形成的复合物,能促进巨噬细胞内胆固醇酯的形成,这可能是含载脂蛋白 B 的脂蛋白致动脉粥样硬化的重要因素之一。

参考文献

- 1 Yla-Herttuala S, Jaakkola O, Solakivi T, et al. The effect of proteoglycans, collagen and lysyl oxidase on the metabolism of low density lipoprotein by macrophages. *Atherosclerosis*, 1986, **62**: 73~80.
- 2 Pepin JM. Quantification of apo(a) and apo B in human atherosclerotic lesion. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 317~327.

- 3 Krempler F, Kostner GM, Roscher A, et al. The interaction of human apo B-containing lipoproteins with mouse peritoneal macrophages: a comparison of Lp(a) with LDL. *J Lipid Res*, 1984, **25**: 283~287.
- 4 刘忠民,张华征. 人血浆脂蛋白(a)的分离纯化. 咸宁医学院学报, 1995, **9**: 7~9.
- 5 Basu SK, Brown MS, Ho YK, et al. Degradation of low density lipoprotein-dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. *J Biol Chem*, 1979, **254**: 7 141~46.
- 6 Bihari-Varga M, Gruber E, Rotheneder M, et al. Interaction of lipoprotein(a) and low density lipoprotein with glycosaminoglycans from human dorsa. *Arteriosclerosis*, 1988, **8**: 851~857.
- 7 Jukgens G, Ashy A. Detection of new epitopes formed upon oxidation of low density lipoprotein(a) and very low density lipoprotein. *Biochem J*, 1990, **265**: 605~608.
- 8 Palinski W, Michael E. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 1 372~76.

(本文 1995-05-22 收到, 1995-08-14 修回)