

· 论 著 ·

北京、广州人群的高脂血清对单核细胞(U937)结合高密度脂蛋白的影响*

梁 平 周梦玲 申 萍 夏人仪 余铭鹏

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院病理室, 北京 100005)

The Effects of Hypercholesterolemia from Beijing and Guangzhou on Monocyte (U937) Binding to High Density Lipoprotein

LIANG Ping, ZHOU Meng-Ling, SHEN Ping, XIA Ren-Yi and SHE Ming-Peng

(Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

ABSTRACT The sera of hypercholesterolemia (HC) from people of Beijing and Guangzhou were incubated with U937 cells respectively for 40 hours, then binding rate between U937 cell and fluorescence-labeled high density lipoprotein (HDL) were detected on cell sorter. The result showed that the binding rate of cells treated with HC from Beijing was significantly higher (2~20 fold) than that from Guangzhou, of which the binding rate of cells was similar to control cells (treated with normal lipid sera). Apolipoprotein E (Apo E) and its receptor pathway did not play an important role in the binding process, HDL₂ is major subclass of HDL which bound to U937 cells. These findings indicated that HC from Beijing has a role to stimulate monocyte cell to take lipids, while HC from Guangzhou doesn't. The difference should exist in plasma component between the masses of Beijing and Guangzhou with HC, which may contribute to high incidence of coronary heart disease in Beijing compared

with that in Guangzhou.

KEY WORDS Hypercholesterolemia; Monocyte; High density lipoprotein

摘要 从北京、广州现场的血脂普查中选出高脂血清,分别作用于体外培养的单核细胞(U937),然后检测U937细胞对高密度脂蛋白的结合率。结果显示经北京高脂血清作用后的U937细胞对高密度脂蛋白的结合率显著增加,高密度脂蛋白中的载脂蛋白E对结合过程无明显影响;广州高脂血清对U937细胞无明显刺激作用,与正常血脂的作用相近。提示北京人群的高血脂可刺激单核细胞摄取脂质,广州高血脂无此作用。北京与广州人群的高血脂可能存在血脂组成与结构性质上的差异,进而影响动脉粥样硬化的发病率。

关键词 高血脂; 单核细胞; 高密度脂蛋白

流行病学资料显示我国心血管病的发病率存在明显的南北差别,无论脑卒中还是急性的心肌梗塞都是北方高于南方。膳食结构和生活方式等因素可能与形成南北差别有关^[1-3]。然而在体内的血脂代谢方面是否也存在差异,还所知甚少。我们结合“八·五”人群高血脂调查课题,分别用北京、广州现场的部分高脂血清(hypercholesterolemic serum, HCS)作用于体外培养的人单核细胞,初步观察比较了其结合高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和高脂血清作用细胞

人单核细胞系(U937)细胞,用含20%小牛血清的

* 本工作为国家“八·五”攻关课题(85-915-03-10)中的一部分

1640 培养液在 37℃、5%CO₂ 条件下培养和增殖。

从北京、广州现场的血清普查标本中,选出总胆固醇>2.5 g/L、载脂蛋白 B>1.0 g/L 的标本各 4 份,分别合并后作为高脂血清,另以总胆固醇<2.0 g/L、载脂蛋白 B<0.8 g/L 的标本作为正常血清。

细胞增殖到足够数量后,合并收集,离心后用无血清 1640 液洗一遍,均分成 4 组,每组新加培养液中,除有 10% 小牛血清外,分别还有:①北京高脂组含 20% 北京高脂血清;②广州高脂组含 20% 广州高脂血清;③正常血脂组含 20% 正常血清;④空白对照组仅含 10% 小牛血清。各组细胞置 37℃ 培养 40 h。

1.2 高密度脂蛋白的分离和荧光标记

健康人全血浆约 120 ml,经密度梯度超速离心分离 HDL($d=1.063\sim 1.21$ kg/L),经浓缩、透析、琼脂糖电泳和油红 O 染色鉴定,为 α -脂蛋白。为了解载脂蛋白 E 及其受体对 HDL 与细胞结合过程的影响,用部分 HDL 按 Lee^[4] 的方法,进行肝素-Sephrose CL-6B 亲和层析,分离出不含载脂蛋白 E 的 HDL,无载脂蛋白 E 的 HDL 占总 HDL 量的 51.4%。

以 HDL 和无载脂蛋白 E 的 HDL 分别进行荧光标记,参照 Takata^[5] 的方法。用异硫氰酸荧光素(Fluorescein-iso-thiocyanat, FITC)在 4℃、碳酸缓冲液(50 mmol/L, pH 9.5)的碱性环境下标记 4 h,然后过 Sephadex G-25 层析柱,分离游离荧光素,测定荧光标记率(F/P 值 = FITC 摩尔数/HDL 摩尔数),HDL-FITC 和无载脂蛋白的 HDL-FITC 荧光标记率(F/P 值)分别为 2.16 和 3.17。

1.3 单核细胞与高密度脂蛋白的结合

经条件培养液作用 40 h 后的 U937 细胞,分别收集、离心,用无血清 1640 液洗一遍。计数后按每毫升 100 万个细胞稀释,分组加至试管中,每管 1 ml (100 万个细胞)。每组按 50、100、150、200 (mg/L) 的终浓度,分别加 HDL-FITC 或无载脂蛋白 E 的 HDL-FITC。另以 30 倍未标记的 HDL 与细胞作用后,再加 HDL-FITC,作为非特异性结合对照。

以上各组试管均置 37℃ 反应,每隔 30 min 轻摇动混匀一次,2 h 后取出置 4℃ 下离心,500×g,5 min,弃上清,用含 2% 牛清蛋白的 1640 液洗一遍,吸尽上清液后,加 1 ml 无血清 1640 液,混匀,用流式细胞仪检测细胞结合 HDL-FITC 的阳性率。

2 结果

非特异性结合阳性率平均为 2.1%,各组

细胞的结合率分别由总阳性率减去非特异性结合阳性率而得。细胞与 HDL-FITC 的结合率见 Figure 1,广州高脂血清组与正常血脂血清组的结合率基本一致,而北京高脂血清组的结合率则显著高于上述两组。不同 HDL 浓度则对结合率没有明显影响。

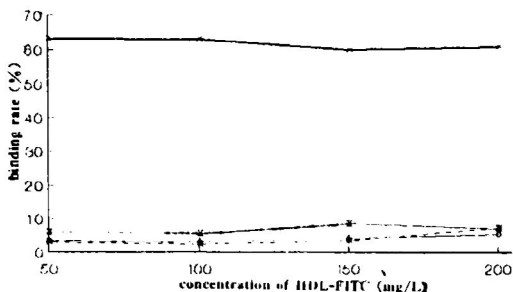


Figure 1. The binding of U937 cells to HDL-FITC. The binding rate of cells treated with Beijing HC (—x—) was higher than that treated with Guangzhou HC (—x—) or normal lipids (—◇—), or calf serum (—*—).

U937 细胞与无载脂蛋白 E 的 HDL-FITC 的结合率见 Figure 2。广州高脂组与正常血脂组的结合率无明显差异,随着 HDL 浓度的增加,两组的结合率也有所增加。只含小牛血清的空白对照组则结合率不依 HDL 浓度而改变。而北京高脂组的结合率仍显著高于其余各组。并且不受 HDL 浓度变化的影响。

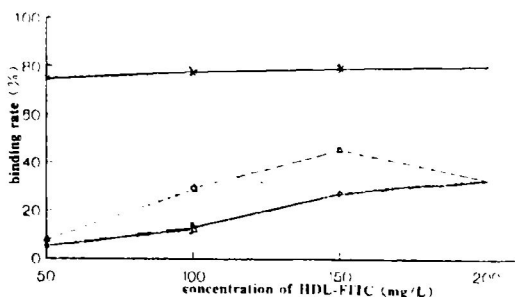


Figure 2. The binding of U937 cells to Apo E free HDL-FITC. The binding rate of cells treated with Beijing HC (—x—) was higher than that treated with Guangzhou HC (—◇—) or normal lipids (—◇—)

比较含载脂蛋白 E 和不含载脂蛋白 E 的 HDL-FITC,显示后者的结合率稍高于前者,在

HDL 浓度为 150 mg/L 时, 差别略明显 (Figure 3), 但总体差异不如北京高血脂组与其它组之间的差异显著。

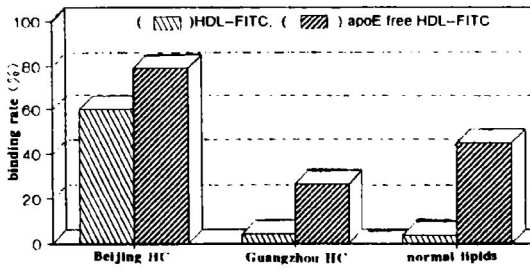


Figure 3. Comparison between HDL-FITC and apo E HDL-FITC binding to U937 cells.

3 讨论

近年来我国心血管病的发病率呈上升趋势, 而北方的发病率又显著高于南方, 在影响发病率的 因素中, 超重、饮酒、膳食结构的不同为主要影响因素^[2,3]。但这些因素在体内如何影响血脂代谢, 以致形成南北发病率的差别, 尚鲜见报道。本实验初步观察到北京人群的高脂血清作用于单核细胞后, 细胞对 HDL 的结合率明显增加, 提示细胞内因摄取了过多的脂质, 需要通过 HDL 的结合与转运来加以消除。单核细胞作为外周血细胞, 有被激活后吞摄脂质, 尤其摄取低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及氧化型 LDL 的作用。在动脉粥样硬化形成过程中, 单核细胞吞摄脂质并演变成泡沫细胞是其重要的环节。U937 细胞虽来自人的单核细胞瘤株, 但仍具有单核细胞的功能, 北京人高脂血清对 U937 细胞有刺激和促进摄取脂质的作用, 而同为高血脂的来自广州地区人群的血清标本, 则无此作用。提示二者的血清成份可能存在差异。北京人高脂血清中或者脂质成份有改变, 如氧化型 LDL 增多, 可激活单核细胞摄取脂质, 或者存在脂质以外的其它因子对单核细胞有刺激作用。

为进一步分析 HDL 与单核细胞结合的性质。用高脂血清作用后的细胞分别与含载脂蛋白 E 和不含载脂蛋白 E 的 HDL 结合, 结果显示不含载脂蛋白 E 的 HDL 对细胞的结合率高

于含载脂蛋白 E 的 HDL, 表明结合过程主要不是通过载脂蛋白 E 及其受体途径进行。载脂蛋白 E 主要存在于 HDL₂ 中, 而不含载脂蛋白 E 的 HDL 主要为 HDL₃。本实验所用含载脂蛋白 E 的 HDL 为包括 HDL₂ 和 HDL₃ 的总 HDL。其结合率低于无载脂蛋白 E 的 HDL₃, 表明 U937 细胞主要是与 HDL₃ 结合, 一般认为 HDL 的主要功能为逆转运胆固醇, 即 HDL₃ 先与外周细胞结合, 摄取细胞的胆固醇后渐转变为 HDL₂, 然后逆转运胆固醇至肝脏分解代谢。本实验结果与此相符合。

血脂调查发现北京人群的 HDLC 水平低于广州人群 ($P < 0.05$), 在高脂血症患者中 HDLC 水平两地间差异更显著 ($P < 0.01$), HDL 亚类检测显示北京人群主要是 HDL₂C 低 (另文报道)。提示北京人群不仅 HDLC 水平低, 可能还存在 HDL₃→HDL₂ 的转化障碍。结合本实验结果分析, 北京高脂血清一方面可促使外周细胞大量摄取胆固醇, 另一方面其血浆 HDL 数量少、功能差, 不足以将动脉壁中的胆固醇逆转运出细胞、导致动脉粥样硬化发生。这可能是冠心病发病率北方高于南方的一个重要原因。以上仅是初步结果, 对形成南北方在血脂代谢上之差异的详细机制及与膳食结构、生活方式等因素的直接关系, 还需进一步的研究。

参考文献

- 1 周北凡. 我国心血管病流行特征分析(4). 中国循环杂志, 1993, 8 (12): 705~706.
- 2 吴锡桂, 陶寿淇, 郝建生, 等. 北京、广州中年工人群高血压的发病率及其危险因素. 中华心血管病杂志, 1991, 19 (4): 207~210.
- 3 周北凡, 肖枝葵, 陶寿淇, 等. 北京和广州工人群中营养因素与血脂水平关系. 中国循环杂志, 1992, 7 (1): 49~53.
- 4 Lee CC, Koo SI. Separation of three compositionally distinct subclasses of rat high density lipoproteins by heparin-affinity chromatography. *Atherosclerosis*, 1988, 70: 205~215.
- 5 Takata K, Horiuchi S, Rahim AT, et al. Receptor-mediated internalization of high density lipoprotein by rat sinusoidal liver cells: identification of a nonlysosomal endocyt-

ic pathway by fluorescence-labeled ligand. *J Lipid Res*,
1988, **29**: 1 117~126.

(1995-12-13 收到)