

正常人两种极低密度脂蛋白亚组分对小鼠腹腔巨噬细胞脂质堆积的影响

从 容 冯友梅 宗义强 王淳本 袁 敏 邓耀祖

(同济医科大学生物化学教研室, 武汉 430030)

The Effects of Very Low Density Lipoprotein Subfractions on Lipid Accumulation in Mouse Peritoneal Macrophages

CONG Rong, FENG You-Mei, ZONG Yi-Qiang, WANG Chun-Ben, YUAN Min and DENG Yao-Zu
(Department of Biochemistry, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

Aim This study is to investigate the effects of natural very low density lipoprotein (n-VLDL) subfractions (Apo E-poor VLDL and Apo E-rich VLDL) on triglyceride (TG) and cholesteryl ester (CE) accumulation in mouse peritoneal macrophages (MPM).

Methods VLDL for subfraction by Heparin-Sepharose 6B affinity chromatography was obtained from 400 ml of normal human plasma by ultracentrifugation. MPM were incubated with Apo E-poor VLDL or Apo E-rich VLDL at the concentrations of 10~40 mg protein/L DMEM for 24 hours.

Results Followed the increased concentrations of VLDL, the accumulation of TG and CE in MPM increased ($P < 0.05$). The TG content in MPM was much higher in Apo E-poor VLDL group than that in Apo E-rich VLDL group ($P < 0.01$). There was little difference in CE content in MPM between both groups ($P > 0.05$).

Conclusion These results suggest that both VLDL subfractions can stimulate TG and CE accumulation in MPM and accelerate the transformation of macrophages into foam cells.

KEY WORDS Lipoproteins, very low density;

Affinity chromatography; Macrophages; Triglyceride; Cholesteryl ester; Foam cell

摘要 本文研究了正常人极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)两种亚组分,即贫含载脂蛋白E的VLDL和富含载脂蛋白E的VLDL对小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophage, MPM)脂质堆积的影响。将贫含载脂蛋白E的VLDL和富含载脂蛋白E的VLDL分别与MPM温育24 h后,细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)和胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)随VLDL浓度的增加而增加(方差分析, $P < 0.05$),且对MPM内TG的增加量以贫含载脂蛋白E的VLDL居多($P < 0.01$),而对MPM内CE的增加量两者无显著性差异($P > 0.05$)。这提示,贫含载脂蛋白E的VLDL和富含载脂蛋白E的VLDL均能促进MPM内TG、CE堆积,从而使巨噬细胞(macrophage, MP)转变为泡沫细胞。

关键词 极低密度脂蛋白; 亲和层析; 巨噬细胞; 甘油三酯; 胆固醇酯; 泡沫细胞

用肝素结合琼脂糖6B柱(Heparin-Sepharose 6B)亲和层析法可将正常人VLDL分离为贫含载脂蛋白E的VLDL和富含载脂蛋白E的VLDL两种亚组分。Huff等^[1]报道这两种VLDL的化学组成和分子大小有明显差异,在高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)患者血浆中升高的脂蛋白主要为贫含载脂蛋白E的VLDL,它们从血浆中清除的速率富含载脂蛋白E的VLDL慢^[2]。故我们推测贫含载脂蛋白E的VLDL和富含载脂蛋白E的VLDL对MP脂质堆积的影响可能有所差异,有关这方面的研究尚未见报道。藉此,我们观察了贫含载脂蛋白E的VLDL对MPM内脂质

堆积的影响并初步探讨其机制,以进一步研究正常 VLDL (natural-VLDL, n-VLDL) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 脂蛋白的分离

按本室所建立的超速离心法分离出 VLDL^[3]。再按 Huff 等^[1]的肝素琼脂糖亲和层析法将 VLDL 分成贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 和富含载脂蛋白 E 的 VLDL。经透析、浓缩、除菌后 4℃ 存放,一周内使用。

1.2 脂蛋白成分鉴定

蛋白质定量用 Lowry 法^[4];载脂蛋白用甘油-十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (glycerol-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Gly-SDS-PAGE) 法分离^[5];TG、CE 及游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 用高效薄层色谱 (high power thin layer chromatography, HPTLC) 法分离。电泳及层析结果均用 CS-930 色谱扫描仪积分定量。

1.3 巨噬细胞培养

取雄性昆明种小白鼠,体重 20~25 g,用于收集腹腔巨噬细胞,培养按本室建立的方法进行^[6,7]。收集的腹腔巨噬细胞,悬浮于含 10% 小牛血清,100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中,混匀后分装于 60 mm 培养皿中,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内温育 3 h,用 DMEM 洗去未贴壁的细胞,再在上述条件下培养 24 h,加入 VLDL 与 MP 共同温育。

1.4 细胞内脂质测定

培养结束后,用冷磷酸缓冲液洗 MP 3 次,再加 0.1 mol/L NaOH 0.8 ml,20 min 后取 100 μl 测蛋白量。其余按 Folch 法提取脂类^[8],细胞内 TG 用酶法测定;FC、CE 测定用气相色谱法,以粪固醇作内标;细胞蛋白测定按 Lowry 法。

2 结果

2.1 两种极低密度脂蛋白亚组分的组成

用 Heparin-Sepharose 6B 柱层析法将正常人血浆 VLDL 分离得到贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 和富含载脂蛋白 E 的 VLDL 两种不同的亚组分。用 HPTLC 法和 Gly-SDS-PAGE 法分别测得贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 和富含载脂蛋白 E 的 VLDL 的脂质组成及载脂蛋白 E

和载脂蛋白 C 的相对含量见 Table 1 和 Table 2。将贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 与富含载脂蛋白 E 的 VLDL 相比,前者的 FC/protein 值和 TG/protein 值均大于后者 ($P < 0.01$),而两者的 CE/protein 值却无显著性差异。反之,后者的载脂蛋白 E/载脂蛋白 C 值则大于前者 ($P < 0.01$)。

Table 1. Lipid composition of normal human VLDL subfractions.

Lipoproteins	TG/protein *	FC/protein *	CE/protein
Apo E-poor VLDL	932±213	274±65	406±40
Apo E-rich VLDL	333±106	123±41	405±38

The data shown are $\bar{x} \pm s$ from four samples and expressed as (mg lipid)/(g protein). Apo E-poor VLDL vs Apo E-rich VLDL: * $P < 0.01$

Table 2. Relative amount of Apo E and Apo C in normal human VLDL subfractions (scanning units).

Lipoproteins	Apo E	Apo C	Apo E/Apo C
Apo E-poor VLDL	2±1.5	3.8±2.8	0.62±0.25
Apo E-rich VLDL	3.10±1.9	2±0.9	1.52±0.39

The data shown are $\bar{x} \pm s$ from four samples. From each sample, 20 μg of VLDL protein was loaded on 15×16 cm slab acrylamide gel. The relative amounts of Apo E and Apo C were determined by densitometric scanning of the bands.

2.2 两种亚组分对小鼠腹腔巨噬细胞内甘油三酯堆积的影响

以不同蛋白质浓度的两种 VLDL 亚组分与 MPM 温育 24 h,细胞内 TG 随 VLDL 浓度的增加而增加,见 Table 3。结果表明,两种 VLDL 均可促进 MPM 内 TG 积聚,尤以贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 作用更强。

2.3 两种亚组分对小鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇堆积的影响

将不同蛋白质浓度的 VLDL (10、20、40 mg/L) 与 MPM 温育 24 小时,MD 内 FC、CE 均可随培养基中脂蛋白浓度的增加而增加 (Figure)。而将贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 与富含载脂蛋白 E 的 VLDL 相比,两者对细胞内 FC 和 CE 的堆积无显著性差异。这表明,贫含

Table 3. Accumulation of triglyceride in MPM exposed to Apo E-poor VLDL or Apo E-rich VLDL.

VLDL content	control (c)	Apo E-poor VLDL (p)	p/c	Apo E-rich VLDL (r)	r/c
10 mg		436.71±98.11	2.54	178.90±103.24	1.07
20 mg	167.76±136.54	687.32±136.54	4.10	266.11±197.17	1.59
40 mg		706.84±142.28	4.21	381.65±71.55	2.27

Macrophages were incubated with 10, 20 and 40 mg VLDL-protein/L DMEM of Apo E-poor VLDL or Apo E-rich VLDL for 24 h at 37°C, respectively. The results are $\bar{x} \pm s$ of four samples.

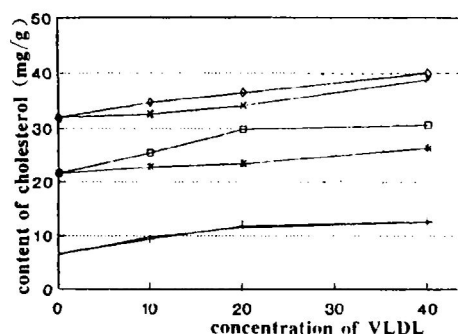


Figure. Effects of increasing concentrations of Apo E-poor VLDL and Apo E-rich VLDL on MPM cholesterol. —○— Apo E-poor VLDL CE, —□— Apo E-rich VLDL CE, —△— Apo E-poor VLDL FC, —◇— Apo E-rich VLDL FC, —○— Apo E-poor VLDL TC, —□— Apo E-rich VLDL TC

载脂蛋白 E 的 VLDL 和富含载脂蛋白 E 的 VLDL 一样能促进 MPM 内胆固醇的增加。

3 讨论

本实验中, 贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 的促 MPM 内 TG 堆积的作用较富含载脂蛋白 E 的 VLDL 明显, 可能原因是 MP 主要通过脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)作用摄取 VLDL 中的 TG^[16]。贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 分子直径较大, TG 含量较多, 载脂蛋白 C I (LPL 激活剂)含量也较多, 故更适合作为 LPL 的底物。在 LPL 作用下, VLDL 中 TG 水解后, 以游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)形式进入 MP 中, 而后再酯化为 TG, 使 MP 内 TG 堆积。由

于上述原因, 贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 促进 MP 内 TG 堆积作用较富含载脂蛋白 E 的 VLDL 更为明显。

用贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 和富含载脂蛋白 E 的 VLDL 与 MP 温育后, 与对照组比较, 两组均可引起 MPM 内 FC 和 CE 的增加(方差分析, $P < 0.05$), 但两者引起 MPM 内 FC 和 CE 增加量无显著性差异。其可能原因是 MP 主要经特异性受体途径, 以载脂蛋白 E 作配体摄取完整的 VLDL 颗粒或 VLDL 残粒而获得 VLDL 胆固醇^[7]。据本室研究, 虽然贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 中载脂蛋白 E 的含量相对较少, 但其促 MP 分泌载脂蛋白 E 的能力更强(另文发表), 由 MP 分泌的载脂蛋白 E 可掺入到 VLDL 分子中, 故这两种 VLDL 通过受体途径致 MP 内胆固醇堆积的作用无显著性差异。

由于我国居民以碳水化合物为主食, 易产生以 VLDL 升高为主的 HTG, 而 HTG 主要表现为贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 在血浆中浓度的升高^[2]。本实验中发现贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 促 MP 内脂质堆积作用与富含载脂蛋白 E 的 VLDL 相仿或更强, 这对阐明 HTG 患者的 As 发生更有实际意义。

参考文献

- 1 Huff MW, Telford DE. Characterization and metabolic fate of two VLDL subfractions separated by Heparin-Sepharose chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 796(3): 251~261.
- 2 Evans AJ, Huff MW, Wolfe BM, et al. Accumulation of

- an Apo E-poor subfraction of very low density lipoprotein in hypertriglyceridemic men. *J Lipid Res*, 1989, 30(11): 1 691~701.
- 3 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 快速大量制备人血浆脂蛋白的超速离心法. 同济医科大学学报, 1995, 24(3): 169~171.
 - 4 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265~275.
 - 5 Maguire GF, Lee M, Connelly PW, et al. Sodium didecyl sulfate-glycerol polyacrylamids slab gel electrophoresis for the resolution of apolipoproteins. *J Lipid Res*, 1989, 30(5): 757~761.
 - 6 冯友梅, 王式平, 吴万生, 等. 脂蛋白脂肪酶在巨噬细胞代谢正常极低密度脂蛋白中的作用. 生物化学杂志, 1989, 5(3): 255~259.
 - 7 翁良平, 冯宗忱, 吴万生, 等. 正常人极低密度脂蛋白促进巨噬细胞胆固醇堆积及机制. 中华心血管病杂志, 1992, 20(1): 45~47.
 - 8 Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. Preparation of lipids. Extracts from brain tissue. *J Biol Chem*, 1951, 191(2): 833~841.
- (1995-12-14 收到, 1996-02-27 修回)

关于中文稿件中名词术语使用外文缩写的规定

中国动脉硬化杂志编辑部

当一个多个汉字的名词术语在中文稿件中反复出现时, 作者往往喜欢用一个外文缩写词来代替; 这样做, 既节省篇幅, 又避免繁琐重复, 为多数期刊所称颂, 本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现, 由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响, 在使用名词术语的外文缩写时存在以下问题: ①同一个英文词, 译成的汉文不同, 如 derived 这个词, 有的译成源性, 有的译为衍化, 还有的译成衍生; ②缩写不规范, 字母大小写不一致, 如载脂蛋白 (apolipoprotein), 缩写为 apo 已不规范, 而它却有 Apo 和 apo 两种写法; ③用法不当, 有的用在文题中, 有的用作关键词, 有的名词术语仅两三个汉字, 为图方便, 个别作者也用缩写词来代替; 而且, 第一次出现时, 没有汉英对照, 只有缩写, 这是极不应该的。有鉴于此, 为求统一, 本刊对中文稿件中名词术语使用外文缩写词来代替作如下规定, 请作者遵照执行。

- 1 名词术语在 3 个 (含 3 个) 汉字内, 一律使用中文; 多于 3 个汉字的, 可使用外文缩写; 如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等, 都只能用中文; 但冠心病、肺心病等例外。
- 2 文题、摘要和关键词中的名词术语, 不得使用外文缩写词来代替。
- 3 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语; 段首和句首的名词术语, 也不得用缩写词来代替。
- 4 第一次使用外文缩写词来代替名词术语时, 必须按照下列格式来写: 中文 (外文, 缩写)。如极低密度脂蛋白胆固醇 (very low density lipoprotein cholesterol,

VLDLC)、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等, 以下行文, 可只写缩写词, 不必注释中文。

5 名词术语的外文缩写原则

- 5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语, 缩写时一律取实词首字母, 全大写, 如总胆固醇 (total cholesterol, TC)。
- 5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时, 不论主干词和前缀之间是否有连字符, 一律取前缀和主干词的首字母, 全大写, 如去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)。
- 5.3 组合法构成的单词名词术语, 其间若没有连字符, 缩写时取首字母和另 1~2 个字母, 首字母大写, 余小写, 如动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As), 但相沿成习的写法例外, 如动脉硬化 (arteriosclerosis, AS)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、白细胞介素 (interleukin, IL) 等。
- 5.4 组合法构成的名词术语, 其间有连字符的, 按照上述第 5.1 条原则缩写。
- 5.5 用来代替中文名词术语的外文缩写词, 在中文稿件中不用复数。
- 5.6 缩写词字母之间不用连字符; 若词末有数字, 可在数字与左邻字母之间加连字符 (用半字线), 如 IL-1。
- 6 书写、打字或排版时, 名词术语的外文缩写不移行。

以上规定, 自 1994 年 10 月 1 日起生效; 此后, 凡文稿中有不符合规定者, 本刊将退回作者重写, 直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)