

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素对巨噬细胞脂质蓄积的抑制作用

杨方^① 赵培真 蔡海江^② 张英珊 叶刚 赵斌 韩晓男

(中国医学科学院中国协和医科大学心血管病研究所阜外心血管病医院, 北京 100037)

The Inhibitory Effects of Heparin and Heparan Sulfate Proteoglycan on Accumulation of Lipid in Macrophages

YANG Fang, ZHAO Pei-Zhen, CAI Hai-Jiang, ZHANG Ying-Shan, YE Gang, ZHAO Bin and HAN Xiao-Nan

(Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effect and mechanism of heparan sulfate proteoglycan and heparin on accumulation of lipid in macrophages.

Methods Lipid accumulation in macrophages was observed with Sudan N stain. Cholesterol content in macrophages was detected with enzyme fluorescence assay. The activity of scavenger receptor of macrophage was assessed by examining the degradation rate of ¹²⁵I labeled oxidized low density lipoprotein (OLDL).

Results More red particles stained with Sudan N were seen in macrophages incubated with OLDL (100 mg/L). The red particles in macrophages incubated with OLDL (100 mg/L) plus heparan sulfate proteoglycan (HSPG, 15.5 mg/L) or with OLDL (100 mg/L) plus heparin (HP, 200 mg/L) were far less than that with OLDL only. The total cholesterol and cholesteryl ester in macrophages incubated with OLDL plus HSPG or with OLDL plus HP were significantly

lower than that with OLDL ($P < 0.05$; $P < 0.01$).

The degradation rate of ¹²⁵I labeled OLDL of macrophages incubated with HSPG or with HP were lower than control.

Conclusion HSPG and HP may inhibit lipid accumulation in macrophage and formation of foam cell possibly through down-regulating the activity of scavenger receptor of macrophage and decreasing the intake of OLDL.

KEY WORDS Heparan sulfate proteoglycan; Heparin; Macrophage; Oxidized low density lipoprotein; scavenger receptor

摘要 用苏丹N染色观察巨噬细胞内脂质聚积的变化;通过酶—荧光法检测巨噬细胞内胆固醇含量并检测¹²⁵I标记氧化型低密度脂蛋白降解量来反映巨噬细胞清道夫受体的活性,以探讨硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素对巨噬细胞脂质蓄积的影响及机制。结果发现,氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)组巨噬细胞的胞浆内可见较多苏丹N着色红染颗粒,氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)+硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(15.5 mg/L)组及氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)+肝素(200 mg/L)组巨噬细胞内红色颗粒明显少于氧化型低密度脂蛋白组;氧化型低密度脂蛋白+硫酸乙酰肝素蛋白聚糖组及氧化型低密度脂蛋白+肝素组巨噬细胞内总胆固醇和胆固醇酯的含量明显低于氧化型低密度脂蛋白组($P < 0.05$, $P < 0.01$);硫酸乙酰肝素蛋白聚糖组及肝素组¹²⁵I标记的氧化型低密度脂蛋白降解量均低于对照组。结果提示,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和肝素可能是通过下调清道夫受体活性减少了巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取而抑制脂质在巨噬细胞内的聚集和泡沫细胞的形成。

关键词 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖;肝素;巨噬细胞;氧化型低密度脂蛋白;清道夫受体

国家“八五”攻关课题(859150304)

①现单位:华北煤炭医学院病理学教研室,唐山 063000

②南京医科大学动脉粥样硬化研究中心

血管壁巨噬细胞内脂质蓄积,进而形成泡沫细胞在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)早期病变形成及发展过程中具有重要意义。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)经清道夫受体途径被巨噬细胞摄入,并以胆固醇的形式储存于胞浆内,促进了泡沫细胞的形成^[1]。体内和体外实验证实硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)及肝素主要是通过抗凝血以防止血小板的聚集及抑制血管壁平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖而发挥其抗As的作用^[2]。而HSPG及肝素有无抑制巨噬细胞内脂质蓄积及泡沫细胞形成的作用尚不清楚。本实验通过体外培养方法研究、探讨HSPG和肝素对巨噬细胞内脂质蓄积及泡沫细胞形成的抑制作用及可能的机制,为进一步阐明HSPG和肝素的抗As的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 人血浆低密度脂蛋白制备

常规分离新鲜健康人空腹血浆,EDTA抗凝,63 000 r/min 2 h 密度梯度超速离心分离低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)($1.019 < d < 1.063$),以10 mmol/L PBS充分透析,加以10 μ mol/L EDTA,4℃保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 氧化型低密度脂蛋白制备 按Steinbrecher等^[3]改良法进行OLDL的制备。

1.2.2 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖制备 按阜外医院生物化学室方法进行HSPG的制备^[4]。肝素购自中国医药公司北京采购供应站。

1.2.3 无菌条件下收取20 g左右昆明小鼠腹腔的巨噬细胞,以 4×10^7 /L接种于12孔培养板中,部分巨噬细胞以同样的密度接种于 1.5×1.5 cm²的盖玻片上。在含10%血清的DMEM培养液中,37℃、5%CO₂条件下孵育24 h,以D-Hank's液清洗3次去除未贴壁的细胞,重新加入含10%血清的DMEM培养液再孵育24 h至细胞达次融合状态。而后分为三组加入相应试剂。第一组加入100 mg/L OLDL,第二组加入100 mg/L OLDL及15.5 mg/L HSPG,第三组加入100 mg/L OLDL及200 mg/L 肝素。细胞爬片另设一未氧化修饰的低密度脂蛋白(native LDL, n-LDL)组,加入100

mg/L n-LDL。37℃、5% CO₂条件下孵育72 h后,按Heider等改良法测定巨噬细胞内胆固醇含量。细胞爬片用苏丹N染色于显微镜下观察。

另按上述方法收取小鼠腹腔巨噬细胞接种于12孔培养板内孵育,使之达次融合状态。加入100 mg/L OLDL孵育72 h,造成细胞内脂质蓄积。而后弃去含OLDL的培养基,分三组加入相应试剂。第一组(对照组)加入正常的DMEM培养液,第二组(HSPG组)加入含15.5 mg/L HSPG的培养液,第三组(肝素组)加入含200 mg/L 肝素的培养液。三组分别于37℃、5% CO₂条件下孵育48及96 h后测定巨噬细胞内胆固醇含量。

1.2.4 细胞内胆固醇含量测定^[5] 加入氯仿、甲醇抽提细胞内胆固醇,将其提取液用氮气吹干,加无水乙醇溶解后加入酶试剂应用液,37℃水浴30 min。在EX 325 nm,EM 410 nm测荧光值,求得总胆固醇量和游离胆固醇量,两者相减为胆固醇酯量。

1.2.5 ¹²⁵I-氧化型低密度脂蛋白和¹²⁵I-低密度脂蛋白降解量测定

将THP-1(人外周血单核细胞性白血病)单核细胞加入 1×10^{-7} PMA(乙酸豆蔻佛波醇)诱导96 h后贴壁生长并转化为巨噬细胞。将转化的巨噬细胞分为三组。第一组加含10%血清的DMEM培养液(对照组);第二组在培养液中加入15.5 mg/L的HSPG(HSPG组);第三组在培养液中加入200 mg/L的肝素(肝素组)。37℃、5% CO₂条件下孵育72 h,洗去培养液。三组细胞分别加入含10 mg/L¹²⁵I标记的OLDL(¹²⁵I-OLDL)或LDL(¹²⁵I-LDL),4 h后按Goldstein等^[6]的方法测定人巨噬细胞对¹²⁵I-OLDL或¹²⁵I-LDL的降解量。

1.3 统计学处理

实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样平均数用 t 检验。

2 结果

2.1 形态学观察

爬片巨噬细胞孵育72 h后,n-LDL组的细胞内未出现明显的苏丹N着色颗粒(图1, Figure 1);OLDL组的细胞内出现较多的苏丹N着色的红染颗粒,其颗粒较大,色深(图2, Figure 2);HSPG及肝素组的细胞内也可见一些苏丹N着色的红染颗粒,但颗粒数量较OLDL组为少,且颗粒相对较小、着色较淡(图3, Figure 3)。



Figure 1. There were not red particles in macrophages (O-LDL group; Sudan V stain, $\times 400$).

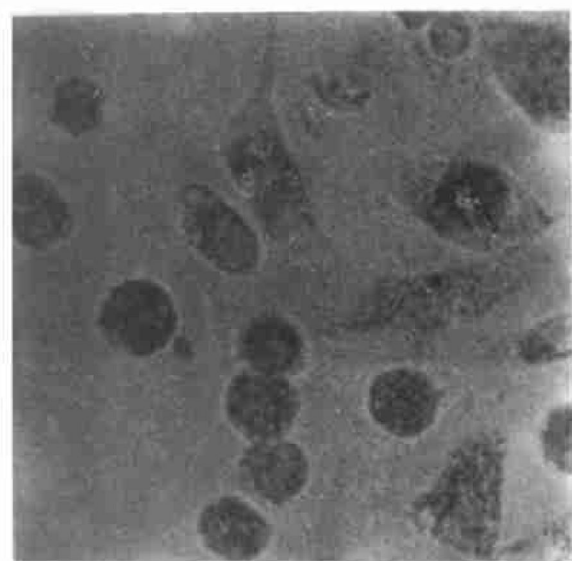


Figure 2. There were more red particles in macrophages (OLDL group; Sudan V stain, $\times 400$).

2.2 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素对巨噬细胞内脂质蓄积的影响

从表1(Table 1)可见 HSPG 组及肝素组巨噬细胞内总胆固醇含量均明显低于 OLDL 组 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 其中以胆固醇酯含量降低明显 ($P < 0.01$), 游离胆固醇含量无明显变化。

2.3 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素对巨噬细胞内脂质清除的影响

从表2(Table 2)可见 HSPG 组及肝素组作用 48 和 96 h 后与对照组比较, 细胞内脂质含

量无明显减少

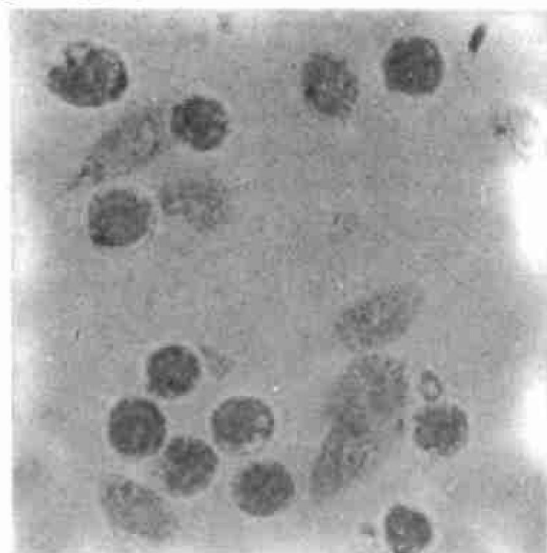


Figure 3. The red particles in macrophages were less than in macrophages from OLDL group (HSPG group; Sudan V stain, $\times 400$).

Table 1. Cholesterol content in macrophages collected from mouse's abdominal cavity ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, mg/g).

Groups	TC	FC	CE
OLDL	157.4 ± 3.8	72.5 ± 2.9	85.2 ± 3.6
OLDL+HSPG	137.5 ± 7.2^a	67.0 ± 5.4	71.6 ± 3.7^b
OLDL+HP	122.5 ± 3.4^b	68.2 ± 3.2	54.3 ± 6.0^b

TC: total cholesterol; FC: free cholesterol; CE: cholesteryl ester. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with OLDL group.

Table 2. The influence of HSPG and HP on the clearance of intracellular lipid in macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, mg/g).

Groups	Time (h)	TC	FC	CE
Control	48	155.8 ± 4.0	70.4 ± 2.8	85.4 ± 6.8
HSPG	48	159.3 ± 2.9	74.5 ± 1.0	84.8 ± 3.3
HP	48	158.4 ± 7.0	74.8 ± 1.5	83.6 ± 5.6
Control	96	153.8 ± 2.4	74.5 ± 4.4	79.4 ± 2.1
HSPG	96	158.4 ± 3.2	77.4 ± 2.1	81.0 ± 1.7
HP	96	158.7 ± 1.4	75.4 ± 3.3	83.2 ± 4.2

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

2.4 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素对巨噬细胞¹²⁵I-氧化型低密度脂蛋白和¹²⁵I-低密度脂蛋白降解量的影响

从表 3(Table 3)可见,HSPG 组及肝素组巨噬细胞的¹²⁵I-OLDL 降解量均比对照组低,且肝素组更明显($P<0.05$)。而 HSPG 组及肝素组巨噬细胞的¹²⁵I-LDL 降解量与对照组比较均无明显减少。

Table 3. The influence of HSPG and HP on the degradation of ¹²⁵I-OLDL and ¹²⁵I-LDL in macrophages ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, $\mu\text{g/g}$).

Groups	degradation rate of ¹²⁵ I-OLDL	degradation rate of ¹²⁵ I-LDL
Control	359.23±88.52	187.64±44.86
HSPG	215.62±28.59	169.25±34.39
HP	170.47±31.70 ^a	177.96±33.47

a: $P<0.05$, compared with control group.

3 讨论

巨噬细胞能够摄入氧化型低密度脂蛋白,并以胆固醇酯的形式储存于胞浆内,形成泡沫细胞^[7,8]。我们的结果亦证实氧化型低密度脂蛋白组巨噬细胞胞浆内含有较多的苏丹Ⅳ着色的脂质颗粒,具体泡沫细胞的形态特征。而天然低密度脂蛋白组巨噬细胞胞浆内未见苏丹Ⅳ着色颗粒的存在。这可能与巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白及天然低密度脂蛋白摄入的途径不同有关。实验已证实,天然低密度脂蛋白是通过低密度脂蛋白受体途径被巨噬细胞摄取,低密度脂蛋白受体细胞内胆固醇含量的负反馈调节,不会形成细胞内胆固醇酯的蓄积^[9]。而氧化型低密度脂蛋白是通过清道夫受体途径被巨噬细胞摄入,清道夫受体不受细胞内胆固醇含量的负反馈调节,因而造成细胞内胆固醇酯的蓄积并形成泡沫细胞^[10,11]。因此减少和抑制氧化型低密度脂蛋白的摄入对于防止动脉粥样硬化早期病变的形成及其发展具有重要意义。

研究表明,动脉内的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素在内膜表面参与糖萼的形成,可防止

血液中血小板聚集及单核细胞的粘附,同时还可抑制血管平滑肌细胞的增殖,以发挥其抗动脉粥样硬化的作用^[2,12]。然而肝素及肝素类物质尤其是人动脉内的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖有无抑制巨噬细胞摄入脂质的作用并不清楚。我们的实验结果显示,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和肝素组巨噬细胞内总胆固醇酯的含量明显低于氧化型低密度脂蛋白组,形态学上也见硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和肝素组巨噬细胞胞浆内苏丹Ⅳ着色的脂质颗粒明显少于氧化型低密度脂蛋白组,表明硫酸乙酰肝素蛋白聚糖和肝素均能抑制或减少巨噬细胞内脂质的聚集和泡沫细胞的形成。

我们的实验还显示硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与肝素并不能使已蓄积在巨噬细胞内的胆固醇含量下降,表明硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与肝素一方面不能使已形成的泡沫细胞逆转,促进动脉粥样硬化病变的消退;另一方面抑制脂质在巨噬细胞内的聚集和泡沫细胞的形成不是通过加速细胞内脂质的代谢或向细胞外转运的过程。现已知道,氧化型低密度脂蛋白经清道夫受体介导被巨噬细胞摄入胞浆内,并可形成细胞内脂质的蓄积,进而形成泡沫细胞^[10,11]。清道夫受体的活性与脂质的摄入关系密切。许多影响巨噬细胞摄取脂质的因素与清道夫受体的活性相关^[7,10,13]。抑制清道夫受体活性对减少细胞内脂质的蓄积及防止泡沫细胞的形成具有重要作用。¹²⁵I-氧化型低密度脂蛋白的特异性降解值及¹²⁵I-低密度脂蛋白特异性降解值可分别代表清道夫受体活性及低密度脂蛋白受体活性^[6,10]。本实验显示硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素均能够使巨噬细胞的¹²⁵I-氧化型低密度脂蛋白的降解量减少,而对¹²⁵I-低密度脂蛋白降解量无明显影响,提示硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素能够抑制清道夫受体活性,而对低密度脂蛋白受体活性无明显抑制作用。由此推测硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及肝素可能是通过抑制清道夫受体活性,减少巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取从而防止脂质在巨噬细胞内的蓄积及泡沫细胞的形成。

参考文献

- 1 Steinberg D. Role of oxidize LDL and antioxdation in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 1995, **369**: 39~48.
- 2 张英珊. 动脉壁的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与动脉粥样硬化. *基础医学与临床*, 1991, **2**: 23~27.
- 3 Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3 883~887.
- 4 张英珊, 丛详凤, 朱志敏, 等. 人主动脉蛋白聚糖, I. 提取、分离及初步鉴定. *生物化学与生物物理学学报*, 1987, **19**: 253~259.
- 5 Heider JG. The picomole determination of free and total cholesterol in the cells in culture. *J Lipid Res*, 1978, **19**: 514~518.
- 6 Goldstein JL, Brown MS. Genetics of the LDL receptor: Evidence that the mutations affecting binding and internalization are allelic. *Cell*, 1977, **12**: 629~641.
- 7 Yui S, Sasaki T, Miyazake A, et al. Induction of murine macrophage growth by modified LDLs. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 331~337.
- 8 Daugherty A, Roselaar SE. Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: Insights from pharmacological studies. *Cardiovasc Res*, 1995, **3**: 297~311.
- 9 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Science*, 1990, **343**: 425~430.
- 10 Dejager S, Michele MS, Pitas RE. Oxidized low density lipoprotein bind to the scavenger receptor expressed by rabbit smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 371~378.
- 11 Reaven PD. Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. *Adv Exp Med Biol*, 1994, **366**: 113~128.
- 12 Fritze LMS, Reilly CF, Rosenberg RD. An antiproliferation heparan sulfate species produced by postconfluent smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1985, **100**: 1 041~49.
- 13 Krieger M. Molecular flypaper and atherosclerosis: Structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends Biochem Sci*, 1992, **17**: 141~146.

(1997-07-22 收到)