

高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞胞内胆固醇及胆固醇酯

王佐 李全忠 杨向东 肖尚志 杨永宗

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Analysis the Difference of Cholesterol and Cholesteryl Ester in Oxidized Low Density Lipoprotein Treated U937 Monocyte by High Performance Liquid Chromatography

WANG Zuo, LI Quan-Zong, YANG Xiang-Dong, XIAO Shang-Zhi and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim To determine cholesterol and cholesteryl ester of U937 monocyte within it's foaming procedure, and to obtained a simple and useful method to identify foamcell.

Methods Cholesterol and cholesteryl ester was extracted from U937 monocyte by hexane-isopropanol, and it's triglycerides was hydrolyzed by ethanolic KOH, and it's protein contents was removed by trichloroacetic acid. Father separation of cholesterol and cholesteryl ester was accompolished by high performance liquid chromatography (HPLC), using an eluent of isopropanol-n-heptane-acetonitrice and a Gen-Pak FAX column(with a little hydrophobic property, using for nucleic acid separation) and it's cholesterol peak was identified by L-B (Lieberman burchard) reaction and spectrum index analysis.

Results Cholesterol concentration has a high linear relationship with it's peak area within 0.05~1.0 g/L, the limits of detection of cholesterol is 4 mg/g cell protein (100 mg cell protein equivalent to 1×10^5 cells).

The cholesteryl ester inside U937 amount to 62% to total cholesterol after cholesterol-loaded for 48 hour.

Conclusion This method is useful and simple to identify foam cell.

KEY WORDS High performance liquid chromatography; U937 monocyte; Cholesteryl; Cholesteryl ester

摘要 为找到一种判断泡沫细胞与非泡沫细胞的简便而较为实用的方法,本文采用正己烷-异丙醇从U937单核细胞内提取胆固醇,并用醇溶性氢氧化钾除去其中的甘油三酯成分,用三氯乙酸去其中的蛋白成分。以异丙醇:正己烷:乙腈为溶剂洗脱系统,采用疏水性较弱的核酸分离柱,进行高效液相色谱分析,分离纯化胆固醇和胆固醇酯成分,并采用L-B(Lieberman Burchard)显色法结合波谱分析法对所胆固醇峰进行鉴定。结果表明胆固醇含量在0.05~1 g/L之间与其峰面积有较好的线性关系,其最低检出量为4 mg/g细胞蛋白(100 mg细胞蛋白相当于 1×10^5 个细胞),通过定性与定量分析,结果表明,U937单核细胞株经氧化型低密度脂蛋白处理48 h后,其胞内的胆固醇酯占胞内总胆固醇60%以上。

关键词 高效液相色谱; U937单核细胞株; 胆固醇; 胆固醇酯

泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化形成的始动步骤,研究泡沫化过程是探索动脉粥样硬化防治的一条重要途径。泡沫细胞的形成是由于细胞内胆固醇酯的积累而引起的,而泡沫细胞的细胞学定义为细胞内胆固醇酯占总胆固醇的50%以上,因而,研究泡沫化过程的一个重要方面就是要求准确地测定胆固醇及胆固醇酯的含量,并计算细胞内胆固醇酯与总胆固醇的比值。本研究的目的就是为了较为准确地测定U937

细胞内胆固醇酯与总胆固醇,从而找到一种判断泡沫细胞与非泡沫细胞的简便而较为精确实用的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

U937 单核细胞株购自上海第二医科大学附属瑞金医院上海血液学研究所,乙腈为上海吴泾化工厂产品,胆固醇购自美国 Sigma 公司,胆固醇酯酶为北京化工厂产品,其余试剂均为国产分析纯。JY92-II 型超声细胞破碎仪,CQ250 超声波清洗器,Gen-Pak FAX 柱,Waters991 型高效液相色谱仪系统,PE 公司紫外检测仪,美国 LABCONCO 公司冷冻真空干燥仪。

1.2 方法

1.2.1 U937 细胞培养及处理 U937 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基中,于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中培养,细胞呈悬浮生长,细胞密度为 10⁶/L,每两天换液一次。细胞分处理组和对照组。处理组细胞加氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),其终末浓度为 80 mg/L,孵育 48 h,对照组细胞仍在 RPMI 培养基中培养。

1.2.2 胆固醇标准配制 称 1.5 g 标准胆固醇先溶于少许乙醇中,逐渐升温到 20℃,并把乙醇体积补满到 150 mL,标准胆固醇液的工作浓度分别为 0.129(50)、0.258(100)、0.516(200)、1.032(400)、2.064(800) mmol/L (mg/L),4℃ 下储存备用。

1.2.3 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯的提取 将每 10 mL 细胞收集入带盖的 10 mL 的塑料管中,在 1500 r/min、4℃ 离心 15 min,去上清后,用 1 mL 0.9% NaCl 溶液重新稀释细胞,冰浴中超声破碎细胞。工作条件为 600 W,工作时间为 4 s,间歇时间为 8 s,定时次数为 6 次。用 Lowry 法测定蛋白含量。在细胞溶解产物中加入等体积的新鲜配制的 15% 的醇溶性 KOH(-20℃),涡旋至细胞溶解产物清亮,加入 6% 的三氯乙酸去蛋白,再加入等体积的正己烷:异丙醇 4:1 溶液(V/V),将混合物涡旋 5 min,然后在 1500 r/min、15℃ 下离心 5 min,收集上层有机相,将下层水相按上述方法重复抽提二次,将混合的有机相转移到一个带盖的试管,再在真空冷冻干燥机中 65℃ 干燥,在室温中冷却后,加入 100 μL 异丙醇:正庚烷:乙腈 35:12:52 (V/V),将样品溶解,用活性炭去色素,超声除气 5 min,在 1500 r/min 离心 5 min 后,收集上清液,取 10 μL 进样,进行高效液相色谱(high performance liquid

chromatography, HPLC)分析。

1.2.4 HPLC 分析细胞内胆固醇 采用 waters991 型色谱系统,其中包括 510 泵,U-6K 进样器,991 型光电二极管矩阵检测器,TCM 色谱柱恒温盒,采用 Waters 公司生产的 Gen-PAK FAX 柱,以正庚烷:异丙醇:乙腈为流动相进行非梯度洗脱,流速 1 mL/min,柱温保持 4℃(加冰块),紫外检测时间 12 min,226 nm 检测。Gen-Pak FAX 柱子在使用之前用去离子水冲洗 10 min(流速 0.5 mL/min)以除去柱中的醇类物质。

1.2.5 对细胞内胆固醇及胆固醇酯定量

1.2.5.1 胆固醇的定量 参考王佐等^[1]的方法进行,以峰面积定量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

1.2.5.2 胆固醇酯的定量 参考周新等^[2]的方法,以胆固醇酯酶水解,以 HPLC 测定总胆固醇量,以总胆固醇量减去游离胆固醇量代表胆固醇酯的量,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

1.2.6 高效液相色谱分离纯化和鉴定胆固醇峰

1.2.6.1 保留时间 通过比较标准胆固醇液出峰时间与样品中各峰出峰时间,与胆固醇标准液的保留时间接近的峰即可能是胆固醇的峰。

1.2.6.2 加内标法 首先进一针样品,记录其色谱图,接着用相同样品量与相当量胆固醇标准混合进针一次,记录其色谱图,样品中加标准胆固醇液色谱图中明显升高的峰就可能是胆固醇的峰。

1.2.6.3 光谱分析法 把样品中各峰的光谱图形与样品胆固醇的光谱图形进行比较,与标准胆固醇光谱图形相同就是样品中胆固醇峰。

1.2.6.4 L-B(Lieberman-Burchard)反应显色法 收集样品中各峰,并浓缩,然后用 L-B 法直接显色。具体如下:取 10 mL 试管一支,往其中加入 0.2 mL 样品 0.5 mL 冰乙酸和 5.0 mL 乙酸酐,于振荡器上剧烈混匀,5 min 后 1500 g/离心 5 min,吸取上清液 4.0 mL 于 25℃ 水浴 5 min,最后加 0.2 mL 浓硫酸显色,在 630 nm 处比色,测定其光密度值。

2 结果

2.1 胆固醇峰及胆固醇酯峰的判定

高效液相色谱分析对照组 U937 和 ox-LDL 处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯色谱图如附图(Figure)。图中,“A”图为对照组 U937 胞内胆固醇及胆固醇酯高效液相色谱分析色谱图。“a”为胆固醇峰,1.25 到 9.8 min 之

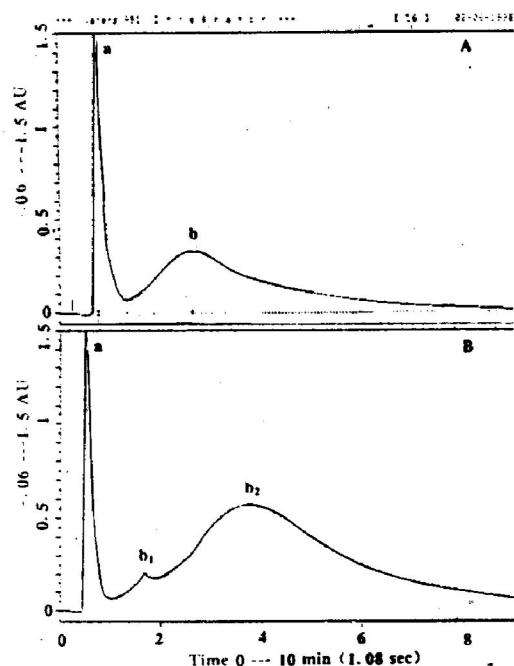


Figure. The chromatography picture of cholesterol and cholesteryl ester inside U937 cell identified by high performance liquid chromatography (HPLC).

A is the control U937 cell, B is the ox-LDL-loaded U937 cell. Chromatography conditions: flow rate 1 mL/min, column temperature 4°C, column Waters Gen-Pak FAX column, elution: isopropyl alcohol-n-heptane-acetonitrile (35:12:52).

间的“b”峰全为胆固醇酯峰。“B”图为 ox-LDL 处理的 U937 胞内胆固醇及胆固醇酯高效液相色谱分析色谱图,“a”峰为胆固醇峰,“b₁”与“b₂”两个峰均为胆固醇酯峰,其中“b₂”峰位于 2.05 min 与 9.8 min 之间,“b₁”峰是新出现的,可能是某种胆固醇酯合成增加,也有可能是新合成的某种胆固醇酯,“A”图与“B”图的两个“a”峰保留时间相差近 0.3 min,这与柱子的疏水性较弱有关,但其光谱分析与标准胆固醇一致, L-B 反应也证明其为胆固醇峰。“A”图部分与“B”图部分比较,可见处理组细胞胆固醇酯含量与胆固醇的含量明显增多,这与泡沫化的细胞内的胆固醇酯增多是相符合的。由于未采用分辨率较高的反向相柱,故各胆固醇酯峰未能分开,但对比较处理组和对照组细胞内胆固醇酯含量上差别却更加直观。

2.2 胆固醇与胆固醇酯的定量分析

通过定量分析得到处理组与对照组的总胆

固醇(total cholesterol, TC)、游离胆固醇(free cholesterol, FC)、胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)及胆固醇酯与总胆固醇之比值(CE/TC)见附表(Table)。

Table. The concentrations of total, free and esterified cholesterol in U937 monocyte ($n=8$, $\bar{x} \pm s$, mg/g).

Index	Control group	ox-LDL group
Total cholesterol(TC)	343±15	629±14
Free cholesterol(FC)	219±8	238±9
Cholesteryl ester(CE)	124±11	391±10
CE/TC(%)	36.15	62.16

Measurements of free cholesterol and cholesterol ester concentrations, and calculated total cholesterol concentration in cholesterol-loaded U937 monocyte using high performance liquid chromatography.

从附表(Table)中可见,U937 细胞经 ox-LDL 处理 48 h,其 CE/TC 之比值达到 60% 以上,已为泡沫化细胞。

2.3 胆固醇测定的线性关系及检测极限

用我们所采用的 HPLC 方法,胆固醇量在 0.05~1.0 mg/L 之间与胆固醇峰面积有较好的线性关系($r^2=0.998$),而所测定样品的胆固醇(酯)均在此范围之内。根据胆固醇含量与其峰面积之间的关系曲线,以均值加上标准差的三倍为最低检出量,得胆固醇得最低检出量为 4 mg/g 细胞蛋白,至少需要 0.1 mg 细胞蛋白,其相当于 1×10^8 个细胞。

3 讨论

高效液相色谱具有适于微量分析的特点,近年来国内外很多学者已不大用化学显色法测定胆固醇(胆固醇酯),而采用高效液相色谱的方法,如张庆林等^[3],高效液相色谱法分析人胎肝细胞培养基中 7-酮基胆固醇,采用 HPLC 测血清中胆固醇^[4]。胞内胆固醇(胆固醇酯)测定要求较高。最近,国外学者^[5]采用 HPLC 分析胞内胆固醇,但在细胞内有些胆固醇酯种类尚

未搞清楚的情况下,没有标准品,因而,尚不能单独依靠 HPLC 法来对胆固醇酯进行精确定量。我们在对 U937 单核细胞株泡沫化前后胞内胆固醇(酯)分析时,采用适于用核酸分离的 Gen-PAK FAX 分离柱,能使人较为直观地看出 ox-LDL 处理 48 h 的 U937 细胞内胆固醇酯含量明显高于对照组细胞内的胆固醇酯的含量,并且其胆固醇酯与总胆固醇的比值大于 50%,符合泡沫细胞的定义(这种处理的 U937 细胞已通过细胞形态鉴定,油红 O 染色可见胞浆中有许多细小的红染脂质颗粒,电镜下胞浆中可见大小不一的融合脂滴),故可以认为处理组细胞为泡沫细胞。采用异硫氰酸苯酯衍生法^[6]和苯甲酰氯衍生法^[4]虽能对胆固醇较好定量,但也对胆固醇酯也同样不好单独定量。

采用高效液相色谱虽具有很多优点,但在操作时仍有很多值得注意的地方。其中之一是色谱柱的选择,一般来说,三种常规柱子(分子筛、反相、离子交换)中以反相柱分辨率最高,但由于胆固醇(酯)本身疏水性较强,如采用 C18 填料反相柱,即使采用非极性较强的洗脱剂(如正庚烷:异丙醇:乙腈),胆固醇根本就无法从柱子上洗下来,如再采用非极性更高的洗脱剂,则粘度太大,压力太高,造成分辨率低,有些非极性试剂即使可以把胆固醇(酯)洗下来,但表现出是一种非特异性洗脱,故在 HPLC 分析胆固醇(酯)时,宜采用疏水性较弱的柱子,Waters 公司生产的 Gen-Pak FAX 柱,是在以硅胶作填料的基础上,在硅醇基上接上多聚碱基的阴离子材料,这种型号的柱子填料的碱基既具有部分疏水性质,又具有部分阴离子交换的性质,采用它来分离胆固醇(酯)正是利用其疏水的性质。另外,我们采用真空冷冻干燥的浓缩方法,进一步提高了该方法的灵敏度。

通过附图中“A”图与“B”图的比较,可见

处理组细胞与非处理组细胞之间不但胆固醇酯与总胆固醇之比存在差异,其胆固醇酯的种类及不同胆固醇酯含量的多少都有可能存在差别。即有些种类的胆固醇酯可能在非泡沫细胞中原来没有,而是在泡沫化过程中形成的;有些胆固醇酯种类也有可能在泡沫化过程中丢失;有些则在泡沫化之前含量很少,而在泡沫化过程中合成急剧增加;有些则在泡沫化前后无多大变化;有些则可能在泡沫化之前含量较多,而在泡沫化过程中含量减少。如能搞清楚以上所述这些胆固醇酯的变化,无疑有利于加深我们对泡沫化过程的了解。

参考文献

- 1 王佐,刘易林,姜志胜. 一种测定家兔动脉壁 L-精氨酸水平的新方法. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(1): 72~74.
- 2 周新. 动脉粥样硬化与生物化学检测. 武昌:湖北科学技术出版社, 1997; 181~184.
- 3 张庆林,吴祖泽,曹菊荣,等. 高效液相色谱法分析人胎肝细胞培养基中 7-酮基胆固醇. 军事医学科学院院刊, 1997, 21(2): 128~130.
- 4 董军,陈文祥,李健斋. 高效液相色谱测定微量胆固醇氧化产物. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 179~182.
- 5 Paul Cullen, Manfred Fobker, Karin Tegel Kamp, et al. An improved method for qualification of cholesterol and cholesterol esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesterol esters by means of secondary ion mass spectrometry. *J Lipid Res*, 1997, 38: 401~409.
- 6 Wen Xiang Chen, Pei Ying Li, Shu Wang, et al. Serum cholesterol determined by liquid chromatography with 6-cholestig masterol as internal standard. *Clin Chem*, 1993, 39(8): 1602~607.

(此文 1998-09-18 收到, 1998-11-15 修回)

(此文编辑: 胡必利)