

# 激活巨噬细胞抑制载脂蛋白 AI 促细胞胆固醇流出能力

张春妮 田秀<sup>①</sup> 庄一义 堀内正公<sup>①</sup>

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

主题词 载脂蛋白 AI; 胆固醇; 运输; 巨噬细胞, 腹腔; 巨噬细胞活化; 泡沫细胞; 小鼠

摘要 为探讨巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 促胆固醇外流能力的影响, 用炎症诱发剂活化鼠腹腔巨噬细胞, <sup>3</sup>H 标记乙酰低密度脂蛋白作泡沫细胞诱导物, 巨噬细胞衍化的泡沫细胞与载脂蛋白 AI 孵育一段时间后, 测定由细胞释放入培养基中的 <sup>3</sup>H 标记胆固醇量。结果发现, 载脂蛋白 AI 浓度为 20 mg/L 时, 从被活化的细胞释放至基质中的 <sup>3</sup>H 标记胆固醇量  $[(4.15 \pm 0.41) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$  显著低于未被活化的细胞  $[(5.69 \pm 0.12) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$  ( $P < 0.01$ ), 但高密度脂蛋白清除细胞胆固醇能力两组细胞无显著差异。提示巨噬细胞活化可显著抑制载脂蛋白 AI 促细胞胆固醇外流能力。

## Effect of Activation on the Capacity of Apolipoprotein AI to Promote Cellular Cholesterol Efflux in Murine Macrophages

ZHANG Chun-Ni, Hakamata Hideki, ZHUANG Yi-Yi and Seikon Horiuchi

(Center of Medical Laboratory Science, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

MeSH Apolipoproteins AI; Cholesterol; Transportation; Macrophages, Peritoneal; Lipoproteins, LDL; Macrophage Activation; Foam Cell; Mice

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the effects of macrophage activation on the capacity of apolipoprotein AI to promote cellular cholesterol efflux. **Methods** <sup>3</sup>H labeled acetyl low density lipoprotein (ac-LDL) was employed as an inducer for foam cell formation by thioglycolate were cultured with apo AI for 18 h, <sup>3</sup>H cholesterol released from cells to the medium was measured by scintillation spectrometry. **Results** The efflux of cholesterol from inflammatory macrophages to apo AI did not increase markedly with the increase of the concentration of apo AI as that observed in resident macrophages. The macrophage activation resulted in a significantly decrease in the capacity of apo AI (20 mg/L) to promote cellular cholesterol efflux ( $P < 0.01$ ), but had no effect on HDL. **Conclusion** The macrophages activation may effectively inhibit the capacity of apo AI to remove cholesterol from cells.

载脂蛋白 AI 在高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的逆向运输中起关键作用。它激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT), 促进胆固醇从外周细胞流出<sup>[1]</sup>。最近 Oram 等<sup>[2]</sup>推测, 载脂蛋白 AI 可能通过与细胞表面高亲和性结合位点相互作用, 清除细胞胆固醇和磷脂。动脉粥样硬化斑块主要来自巨噬细胞的沉积有脂质的泡沫细胞组成。近年来发现, 巨噬细胞经 zymosan 和 thioglycolate 等活化后, 细胞低密度脂蛋白受体及清道夫受体明显减少, 一些脂蛋白的代谢也受到影响<sup>[3]</sup>。但是否影响巨噬细胞载脂蛋白 AI 促胆固醇外流能力, 尚无文献报道。本文用炎症诱发剂 thioglycolate 激活鼠腹腔巨噬细胞, 使其活化, 观察并分析对巨噬细胞载脂蛋白 AI 介导细胞胆固醇外流能力的影响, 以期进一步探讨动脉粥样硬化的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

9, 10(n)-<sup>3</sup>H-油酸酯为 Amersham 产品, thioglycolate 购自 Sigma 公司。

### 1.2 脂蛋白及载脂蛋白的制备

密度梯度超速离心法分离正常人血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) [ $d = (1.019 \sim 1.063) \times 10^3 \text{ g/L}$ ] 和高密度脂蛋白 (HDL) [ $d = (1.063 \sim 1.200) \times 10^3 \text{ g/L}$ ]。将 HDL 脱脂, Sephacryl S-200 柱层析纯化制备载脂蛋白 AI。用醋酸酐化学修饰 LDL 法制备乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)<sup>[4]</sup>; 参考文献<sup>[5]</sup>方法用 9, 10(n)-<sup>3</sup>H-油酸酯标记 ac-LDL。

### 1.3 鼠腹腔巨噬细胞活化及培养

雄性 DDY 小鼠 (25~30 g) 腹部注射 thioglycolate (1.5 mL/只), 三天后取腹腔巨噬细胞。被激活的 (活化的) 及未被激活的 (正常的) 腹腔巨噬细胞采用文献<sup>[6]</sup>方法获取。用含 10% 小牛血清的 RPMI

<sup>①</sup> 日本熊本大学医学部生物化学系

1640培养基培养。

#### 1.4 测定释放入基质中的 $^3\text{H}$ -胆固醇量

参照文献<sup>[7]</sup>,巨噬细胞( $2 \times 10^6$ 个/L)培养于6孔板2 h,形成单层后,加入 $5 \times 10^4/\text{g}$ 的 $^3\text{H}$ 油酸酯标记 ac-LDL, 37℃孵育18 h,此时细胞变为沉淀有脂质颗粒的泡沫细胞。用磷酸盐缓冲液洗3次,再分别加入5、10、20 mg/L 的载脂蛋白 AI 及20 mg/L 的 HDL。培养基改为含0.2%牛血清白蛋白的 RPMI,继续培养18 h。基质移入 Eppendorf 离心管,离心10 min,取400/L 上清液,加入2 mL 闪烁液 Scintisol,用闪烁分光光度计测定放射活性。未加载脂蛋白 A 或 HDL 的孔为空白对照,实验每组取3个复孔。

#### 1.5 统计学处理

所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两样本均数的  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 的影响

正常的巨噬细胞与载脂蛋白 AI 孵育后,释放入基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇与载脂蛋白 AI 浓度呈显著量效关系(图1, Figure 1)。当载脂蛋白 AI 浓度为5 mg/L 时,基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇水平 $[(4.47 \pm 0.11) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 显著高于未加载脂蛋白 AI 时的基质 $^3\text{H}$ 胆固醇水平(空白对照)( $P < 0.01$ )。经 thioglycolate 活化的巨噬细胞与载脂蛋白 AI 共同孵育后,由细胞释放入基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇不随载脂蛋白 AI 浓度增加而显著变化。5 mg/L 的载脂蛋白 AI 与活化的巨噬细胞孵育后,基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇水平 $[(3.55 \pm 0.13) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 与空白对照无显著差异,载脂蛋白 AI 浓度升至20 mg/L 时, $^3\text{H}$ 胆固醇 $[(4.15 \pm 0.41) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 仅为空白对照的1.2倍,表明巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 介导细胞胆固醇流出能力起明显抑制作用。

### 2.2 比较巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 和 HDL 的影响

当巨噬细胞与20 mg/L 载脂蛋白 AI 孵育18 h 后,从活化的巨噬细胞释放至基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇量 $[(4.15 \pm 0.41) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 显著低于正常的巨噬细胞 $[(5.69 \pm 0.12) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ ( $P < 0.01$ )。而当细胞与相同浓度的 HDL 孵育后,从活化的巨噬细胞释放至基质中的 $^3\text{H}$ 胆固醇水平 $[(7.12 \pm 0.31) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 与正常的巨噬细胞 $[(6.57 \pm 0.41) \times 10^{-1} \text{ dpm/g 细胞蛋白}]$ 无明显差异,表明巨噬细胞活化对 HDL 清除细

胞胆固醇能力无影响(图2, Figure 2)。

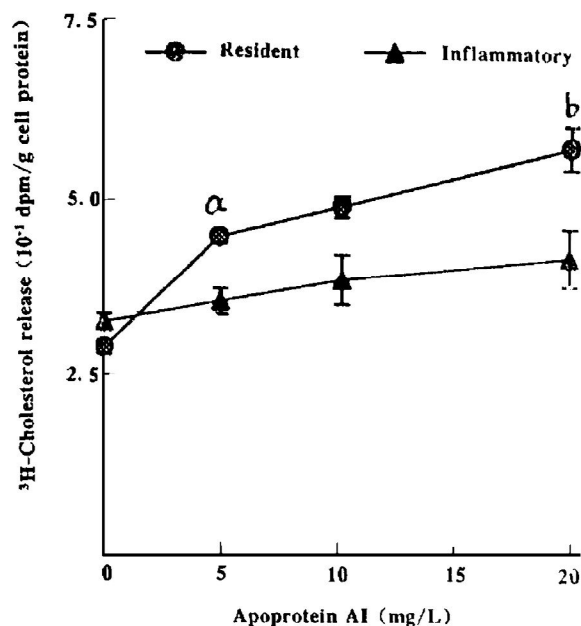


图1. 巨噬细胞活化影响载脂蛋白 AI 促细胞胆固醇外流

Figure 1. Inhibition of macrophages activation on the capacity of apo AI to promote cellular cholesterol efflux. a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.001$ , compared with control group

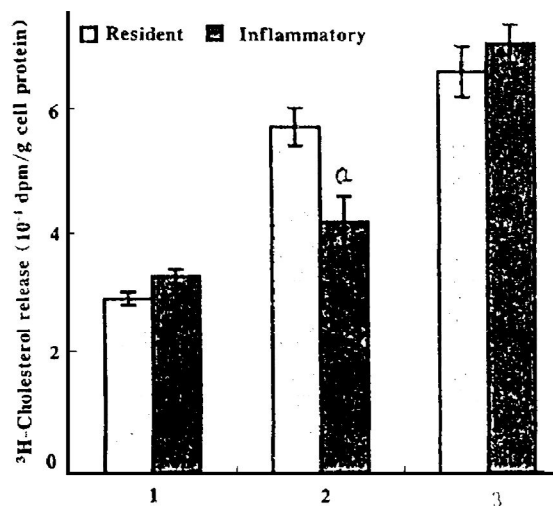


图2. 巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 和高密度脂蛋白促细胞胆固醇外流影响的比较

Figure 2. Comparison of the effects of macrophages activation on the capacity of HDL and apo AI to promote cellular cholesterol efflux. 1: Non-loaded; 2: Apo AI; 3: HDL. a:  $P < 0.01$ , compared with resident macrophages

## 3 讨论

根据最近提出的细胞胆固醇流出假说,载脂蛋白 AI 通过与细胞表面高亲和结合位点相互作用介导细胞胆固醇流出,而高密度脂蛋白则可通过两种

机制达到这一目的<sup>[2]</sup>；一是载脂蛋白 A 从高密度脂蛋白粒子解离，然后按照与游离载脂蛋白 AI 相同的机制，通过与细胞表面高亲和结合位点相互作用，刺激细胞胆固醇流出；二是高密度脂蛋白分子中的磷脂作为胆固醇的高效受体，通过水相扩散机制清除细胞胆固醇。通过本实验发现，鼠腹腔巨噬细胞经 thioglycolate 活化后，载脂蛋白 AI 介导巨噬细胞胆固醇流出能力显著下降，而高密度脂蛋白清除细胞胆固醇能力无变化，表明巨噬细胞活化对载脂蛋白 AI 清除细胞胆固醇能力具有明显抑制作用，而对高密度脂蛋白无影响。我们推测其可能的原因是，巨噬细胞经 thioglycolate 处理后，细胞表面的载脂蛋白 AI 高结合位点减少从而降低了载脂蛋白 AI 对胆固醇的清除作用，而高密度脂蛋白由于具有两种促胆固醇流出机制，当细胞表面载脂蛋白结合位点数目减少时，水相扩散机制占主导地位<sup>[7]</sup>，因此 thioglycolate 活化对高密度脂蛋白清除细胞胆固醇能力无明显影响。

动脉粥样硬化损伤部位巨噬细胞是否激活尚不清楚，但实验表明，该处的巨噬细胞极可能处于一种被激活状态<sup>[3]</sup>。已发现损伤部位含有大量的 T 淋巴细胞，它可通过分泌  $\gamma$ -干扰素等活化巨噬细胞。另外，由巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等也对细胞产生一定的活化作用。因此研究激活状态下细胞脂质和脂蛋白的代谢及行为会更客观地反映动脉粥样硬化损伤部位情况。

我们的实验表明，鼠腹腔巨噬细胞活化明显抑

制载脂蛋白 AI 清除细胞胆固醇能力，而对高密度脂蛋白无影响。本结果一方面证实了最新提出的细胞流出假说，另一方面也为了解动脉粥样硬化损伤部位被激活的巨噬细胞的异常性提出了线索。

#### 参考文献

- 1 Fielding C, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, **36**(2): 211-228
- 2 Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res*, 1996, **37**(12): 2 473-491
- 3 Kraemer FB, Tavangar K, Gundjici RK, et al. Effects of activation on lipid and lipoprotein metabolism in murine macrophages. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**(1): 8-16
- 4 Miyazaki M, Sakai M, Sugino Y, et al. Acetylated low density lipoprotein reduces its ligand activity for the scavenger receptor after interaction with reconstituted high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1994, **269**(7): 5 254-269
- 5 Roberts DC, Miller NE, Price SG, et al. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem J*, 1985, **226**(2): 319-322
- 6 Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, et al. Species difference in cholesteryl ester cycle and HDL-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**(11): 1 860-865
- 7 Czarnecka H, Yokoyama S. Lecithin cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein-mediated efflux. *Biochemistry*, 1995, **34**(13): 4 385-392

(此文1998-10-05收到,1999-02-08修回)

(此文编辑 朱雯霞)