

极低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞 载脂蛋白 E 基因表达的影响

陈培利^① 冯友梅 从 容 王淳本 宗义强 邓耀祖

同济医科大学生物化学教研室, 武汉 430030)

主题词 血浆蛋白; 脂蛋白, 极低密度; 甘油三酯; 巨噬细胞, 腹腔; 巨噬细胞活化; 载脂蛋白 E; 基因表达; 小鼠

摘 要 为研究载脂蛋白 E 含量不同的极低密度脂蛋白对巨噬细胞载脂蛋白 E 表达的影响, 以肝素 - 琼脂糖凝胶亲和层析法将正常人极低密度脂蛋白分离为富含载脂蛋白 E 和贫含载脂蛋白 E 的二种不同亚组分, 并分别以不同浓度与小鼠腹腔巨噬细胞共培养。而后以 Northern 印迹分析和十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法研究了其对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的不同影响。结果发现, 两种极低密度脂蛋白亚组分在较低浓度 (含甘油三酯 100 $\mu\text{g/L}$) 时均可刺激小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因的表达, 且尤以贫含载脂蛋白 E 的极低密度脂蛋白作用更为明显, 其刺激后的细胞 mRNA 及蛋白质表达分别增高约 1.58 和 1.82 倍。但高浓度的二种极低密度脂蛋白亚组分刺激的细胞 mRNA 水平下降为对照的 65%, 而蛋白质水平却升高 2 倍之多, 其机制未明。上述实验结果说明, 贫含载脂蛋白 E 极低密度脂蛋白可能在较低浓度下具有更强的刺激小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的能力, 而高浓度时则不然。

Effects of Human Very Low Density Lipoprotein on the Expression of Apolipoprotein E Gene in the Peritoneal Macrophages of Mice

CHEN Pei - Li, FENG You - Mei, CONG Rong, WANG Chun - Ben, ZONG Yi - Qiang and DENG Yao - Zu

(Department of Biochemistry, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Blood Proteins; Plasma; Lipoproteins, VLDL; Triglycerides; Macrophages, Peritoneal; Macrophage Activation; Apolipoproteins E; Gene Expression; Mice

ABSTRACT **Aim** To study the differential effects of human very low density lipoprotein (VLDL) subfractions with different apolipoprotein E content on the expression of apolipoprotein E gene in mouse peritoneal macrophages (MPMs). **Methods** Apolipoprotein E - rich and apolipoprotein E - poor subfractions of normal human VLDL with different apolipoprotein E content were separated by Heparin - sepharose CL - 6B affinity chromatography and incubated with MPMs at different concentrations respectively. Their effects on the expression of MPM apolipoprotein E gene were determined at both mRNA and protein level with Northern blotting assay and SDS - polyacrylamide gel electrophoresis respectively. **Results** At concentration of triglyceride 100 $\mu\text{g/L}$ medium, both apolipoprotein E - rich and apolipoprotein E - poor subfractions could stimulate expression and secretion of apolipoprotein E in MPMs, with apolipoprotein E - poor subfraction demonstrating more potent: a nearly two - fold increase in the mRNA and protein level (1.58 and 1.82 - fold respectively) was observed in the cells treated with apolipoprotein E - poor subfraction compared to the slight increase in cells treated with its apolipoprotein E - rich counterpart (1.10 and 1.25 - fold respectively). However, the case was quite different for cells treated with that two subfractions at 1 000 $\mu\text{g/L}$ of triglyceride medium.

The mRNA level was similarly inhibited to a level of 65% of control cells in contrast to elevated apolipoprotein E protein level at more than two - fold. However, the reasons remain obscure at present. **Conclusion** These findings might suggest that apolipoprotein E - poor VLDL has higher potentiality to stimulate the expression of apolipoprotein E at only relatively low concentration, but does not at high concentration level.

载脂蛋白 E 是人及某些动物血浆脂蛋白中重要的载脂蛋白组分之一, 它在介导某些脂蛋白, 如极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、

乳糜微粒残粒、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 等的运输和清除中起着重要的作用^[1]。巨噬细胞是动脉粥样硬化病变中泡沫细胞的重要来源, 其细胞表面存在多种脂蛋白受体, 诸如 VLDL 受体、LDL 受体和清道夫受体等。这些受体大多需载脂蛋白 E 为配体, 而且已证明巨噬细胞有较强的分泌载

本文为国家自然科学基金资助课题

①现在北京医科大学生物化学与分子生物学系, 100083

脂蛋白 E 的能力, 但该过程的生理意义尚不清楚。这些分泌的载脂蛋白 E 可能与上述脂蛋白相结合而利于其被巨噬细胞摄取, 籍此可以将进入动脉壁的脂质转运出去, 从而起到防止动脉壁中脂质堆积的作用。但是, 摄取脂质后的巨噬细胞如不能及时移出动脉壁, 则可导致泡沫细胞的形成与堆积。我们以前的工作发现取自正常血脂个体的 VLDL 可致巨噬细胞内甘油三酯和胆固醇酯的堆积^[2]。但是载脂蛋白 E 含量不同的 VLDL 是否及如何影响巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达目前尚无报道。实验观察了载脂蛋白 E 含量不同的人的 VLDL 组分对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的影响, 以进一步阐明其分泌的载脂蛋白 E 在 VLDL 摄取中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM、胎牛血清及硝酸纤维素薄膜 (0.45 μm) 购自 Gibco 公司; 苯硼酸购自 Sigma 公司; 肝素 - 琼脂糖凝胶层析柱购自 Pharmacia 公司; α -³²P-dCTP 得自中国原子能科学研究院同位素研究所; 其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 脂蛋白及两种极低密度脂蛋白组分的分离

将正常人 (TG < 1 357 mg/L, TC < 1 816 mg/L) 的新鲜全血以本实验室建立的超速离心法 (L-80M, Beckman, USA) 分离 VLDL ($d < 1.006 \text{ kg/L}$)^[3]。载脂蛋白 E 含量不同的 VLDL 的两种亚组分参照 Huff 等^[4]介绍的方法以肝素 - 琼脂糖凝胶亲和层析分离。将两组分各取少量测定其蛋白质含量后, 以 Maguire 等^[5]介绍的方法鉴定各组分载脂蛋白的组成。余者过滤除菌后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 充氮避光保存。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞培养

按常规方法收集雌雄小鼠腹腔巨噬细胞 (mouse peritoneal macrophages, MPM) 并悬浮于含 10% 胎牛血清、1 ku/L 青霉素和 1 mg/L 链霉素的 DMEM 中, 充分混匀后分散于 90 \times 18 mm 的塑料培养皿内, 经

37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养约 3 h (Shel Lab, USA), 以 DMEM 冲洗以除去未贴壁的细胞后, 按不同实验条件继续培养。

1.4 小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 的合成和分泌

培养 18 ~ 24 h 后的 MPM 分别在含有 TG 100 $\mu\text{g/L}$ 或 1 000 $\mu\text{g/L}$ 、富含载脂蛋白 E 或贫含载脂蛋白 E 的两种 VLDL 组分的 DMEM 中继续培养 24 h (含苯硼酸 200 $\mu\text{mol/L}$)。废弃原培养基, 以 DMEM 彻底冲洗后加入新鲜的无血清的 DMEM 继续培养 8 ~ 10 h。收集各试验组的培养基, 充分透析, 浓缩, 冻干。测定其蛋白质含量后以十二烷基硫酸钠 - 甘油 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-G-PAGE) 分析其所含蛋白质成分。各组载脂蛋白 E 以光吸收度扫描作相对定量。

1.5 RNA 的提取与 Northern 印迹分析

细胞单层以冰冷的 PBS 冲洗后依照 Chomczynski 等^[6]方法提取总 RNA, 在 260 nm 测定吸光值以定量。Northern 印迹分析和载脂蛋白 E 及 β -actin cDNA 探针的制备按标准方法^[7]进行, 探针以随机引物法标记。扫描各组载脂蛋白 E mRNA 条带的吸光度作相对定量, 以各组 β -actin mRNA 条带的吸光度扫描作内参比。

1.6 其它实验方法

蛋白质含量以 Lowry's 法测定, 总胆固醇和甘油三酯含量以酶法测定 (Boehringer Mannheim)。

2 结果

2.1 极低密度脂蛋白两种亚组分的组成

正常人血浆 VLDL 两种亚组分的脂质与蛋白质的相对构成见表 1 (Table 1)。从表 1 (Table 1) 中可见胆固醇/蛋白质、甘油三酯/蛋白质的构成均以贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 组分高 ($P < 0.005$, $P < 0.05$)。提示两种组分中蛋白质含量与相对构成不同。

表 1. 极低密度脂蛋白两种亚组分的脂质及蛋白质组成 (mg/L)

Table 1. Lipid and protein compositions of human VLDL subfractions separated by Heparin - Sepharose CL - 6B chromatography

VLDL fractions	TG	Cholesterol	Protein	TG/Pr	Ch/Pr	Apo E/C
Apo E - rich	1052.5	315.4	640	164.5	49.3	2.25
Apo E - poor	2223	414.2	750	296.4 ^b	55.2 ^a	0.37 ^b

TG, Triglyceride; Ch, Cholesterol; Pr, Protein; Apo, Apolipoprotein. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.005$, compared with Apo E - rich VLDL fraction

2.2 载脂蛋白 E 的合成与分泌

十二烷基硫酸钠 - 甘油 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析培养基中载脂蛋白 E 含量的结果见图 1 (Figure

1)。其吸光度扫描结果见表 2 (Table 2)。可见 MPM 分泌载脂蛋白 E 的量在分别与正常人 VLDL 两种亚组分共培养后均增高。对于富含载脂蛋白 E 的

VLDL, 当培养基中 TG 浓度为 $100 \mu\text{g/L}$ 时细胞所分泌的载脂蛋白 E 是对照组的 1.25 倍, TG 浓度为 $1000 \mu\text{g/L}$ 时是 2.45 倍。而相应浓度的贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 则可以使细胞分泌的载脂蛋白 E 分别是对照组的 1.82 倍和 2.43 倍。可见贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 在较低浓度时具有更强的刺激 MPM 分泌载脂蛋白 E 的能力, 而在高浓度时虽然两种 VLDL 均可使 MPM 分泌的载脂蛋白 E 增加, 但似无差别。

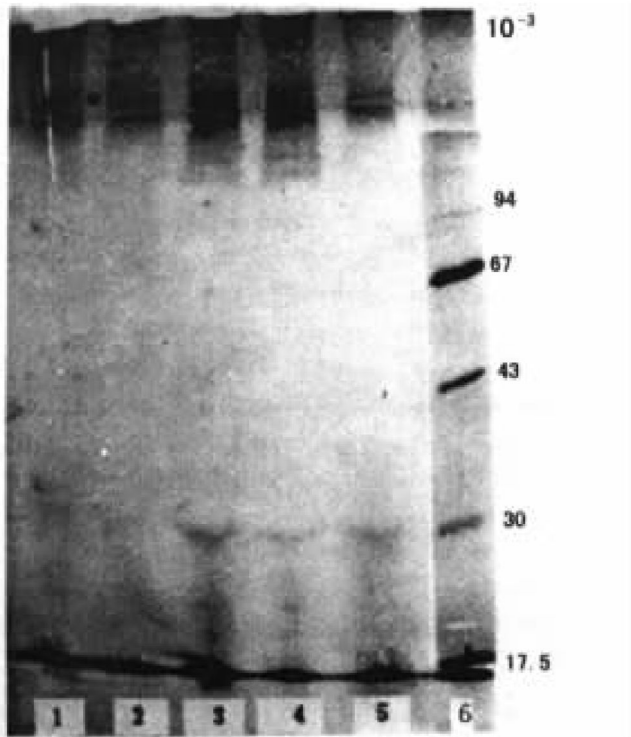


图 1. 不同 VLDL 亚组分对小鼠腹腔巨噬细胞分泌载脂蛋白 E 的影响

Figure 1. Effects of human VLDL subfractions on the apolipoprotein E secretion in mouse peritoneal macrophage (MPM) determined by PAGE. Lane 1, control; Lanes 2 and 3, MPMs treated with $100 \mu\text{g/L}$ and $1000 \mu\text{g/L}$ apolipoprotein E-rich VLDL respectively; Lanes 4 and 5, MPMs treated with $100 \mu\text{g/L}$ and $1000 \mu\text{g/L}$ apolipoprotein E-poor VLDL respectively; Lane 6, protein molecular weight marker

2.3 载脂蛋白 E mRNA 的 Northern 印迹分析结果

为了研究富含载脂蛋白 E VLDL 与贫含载脂蛋白 E VLDL 对 MPM 分泌载脂蛋白 E 不同作用的机制, 提取不同条件下培养的 MPM 的总 RNA 进行 Northern 印迹分析以观察载脂蛋白 E mRNA 的表达情况。结果见图 2 (Figure 2) 和表 2 (Table 2)。发现在 TG 为低浓度实验组中正常人 VLDL 两种亚组分均可使 MPM 载脂蛋白 E mRNA 的水平增高: 富含载脂蛋白 E 的 VLDL 中培养的细胞其表达的载脂蛋白 E mRNA 是对照的 1.10 倍, 而加入相应浓度的贫含载脂蛋白 E VLDL 的培养者其载脂蛋白 E mRNA 大约是对照的 1.58 倍。然而, 在培养基中 TG 浓度为

$1000 \mu\text{g/L}$ 的实验组中, 两种亚组分却可以类似的程度抑制 mRNA 的水平, 即其 mRNA 均约为对照的 0.65 倍。提示载脂蛋白 E 含量不同的 VLDL 可能是在转录水平影响 MPM 载脂蛋白 E 的合成和分泌的, 并且低浓度下表现为诱导其转录, 在高浓度下则表现为抑制效应。

表 2. 人 VLDL 亚组分对鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的影响

Table 2. Effects of human VLDL subfractions on secretion and transcripts of apolipoprotein E gene in mouse peritoneal macrophage (MPM)

Group	n	ApoE protein	ApoE mRNA
Control	0	100	100
ApoE-rich	100	125	100
	1000	245	65.4
ApoE-poor	100	182	158
	1000	243	64.8

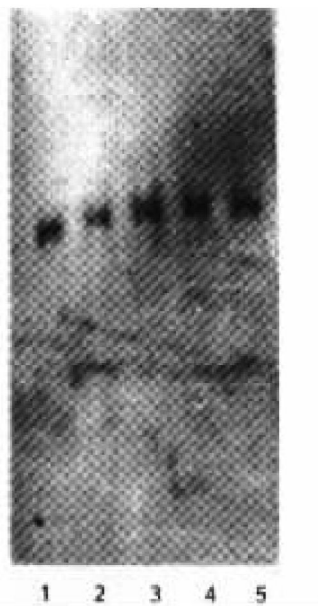


图 2. 不同 VLDL 亚组分对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E mRNA 转录的影响

Figure 2. Effects of human VLDL subfractions on transcripts of apolipoprotein E secretion in mouse peritoneal macrophage (MPM) determined by Northern blotting. Lane 1, control; Lanes 2 and 3, MPMs treated with $100 \mu\text{g/L}$ and $1000 \mu\text{g/L}$ apolipoprotein E-rich VLDL respectively; Lanes 4 and 5, MPMs treated with $100 \mu\text{g/L}$ and $1000 \mu\text{g/L}$ apolipoprotein E-poor VLDL respectively

3 讨论

动脉内皮下巨噬细胞源泡沫细胞的大量聚集是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 早期病变的重要病理特征。因此研究巨噬细胞在 As 发生过程中的生物学行为对阐明 As 发生的分子机制及早期治疗和预防有着重要的意义。MPM 是研究巨噬细胞在

As 中作用的重要模型,该细胞不仅可以合成及分泌载脂蛋白 E, 并且其合成量受诸如细胞内游离胆固醇的量和某些细胞因子 (如 GM-CSF、TGF- β) 及佛波酯 (Phorbol ester) 等因素的调节。研究表明,巨噬细胞可以通过 VLDL 受体途径摄取 VLDL^[8~10]。该途径主要以载脂蛋白 E 为配体介导 VLDL 与其受体相结合。本实验则表明富含载脂蛋白 E 的 VLDL 组分和贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 组分在经由上述受体途径被巨噬细胞摄取时对其载脂蛋白 E 的基因表达具有不同的作用。以肝素琼脂糖凝胶亲和层析法分离的正常人 VLDL 富含载脂蛋白 E 的组分和贫含载脂蛋白 E 的组分在低浓度时均可刺激载脂蛋白 E mRNA 及蛋白质产物的合成, 贫含载脂蛋白 E 者尤为显著。通过该过程分泌的载脂蛋白 E 可能会在局部与 VLDL 颗粒结合 (尤其是贫含载脂蛋白 E 的 VLDL), 以提高 VLDL 中载脂蛋白 E 的含量, 从而增强 VLDL 与受体的亲和力, 利于 VLDL 的摄取和清除。类似的过程有的研究者称之为分泌-再摄取途径^[11]。贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 组分具有较强的刺激巨噬细胞分泌载脂蛋白 E 的作用, 且这种调控作用发生在转录水平。其机制可能如下: 由于贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 中脂质与蛋白质的比值均高于富含载脂蛋白 E 的 VLDL, 故可能具有更强的结合载脂蛋白 E 的能力。此外, 由于贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 使巨噬细胞中甘油三酯的堆积更为显著, 增高的甘油三酯也可能会通过某种机制影响载脂蛋白 E 的表达。

同时, 由于贫含载脂蛋白 E 的 VLDL 中载脂蛋白 E/C 比值要低于富含载脂蛋白 E 者 (0.37 比 2.25)。而载脂蛋白 C 在肝载脂蛋白 E 受体 (LRP) 及 LDL 受体介导的脂蛋白摄取中的“负性调节因子”^[12,13] 的类似作用可能会延缓巨噬细胞对贫含载脂蛋白 E VLDL 的摄取从而使巨噬细胞分泌的载脂蛋白 E 反馈性的增加, 以促进其内化和降解。

与在低浓度下的刺激效应相反, VLDL 两种亚组分在高浓度时均表现为对载脂蛋白 E mRNA 的抑制效应。其机制未明, 可能机理如下: 外源的载脂蛋白 E 与细胞合成和分泌的载脂蛋白 E 均可再次与 VLDL 相结合而被摄取^[11], 因此当环境中有足够的载脂蛋白 E 参与 VLDL 的摄取时, 巨噬细胞自身载脂蛋白 E 的合成即受到抑制。

综上所述, 巨噬细胞可以通过调节自身载脂蛋白 E 的合成和分泌量而控制 VLDL 的摄取量, 这对

解释在以碳水化合物为主食的人群中发生的以贫含载脂蛋白 E VLDL 升高为主的高甘油三酯患者所发生的 As 提供了一定的实验依据。

致谢 冯宗忱教授及屈伸教授在实验中给予了有益的支持和建议。

参考文献

- 1 Malhey RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, **240**: 622-630
- 2 冯宗忱, Bates SR, Getz GS. 极低密度脂蛋白引起巨噬细胞内甘油三酯的堆积: 脂蛋白受体的作用. *武汉医学院学报*, 1983, **2**: 107-112
- 3 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白. *同济医科大学学报*, 1995, **24**: 169-171
- 4 Huff MW, Telford DE. Characterization and metabolic fate of two very low density lipoprotein subfractions separated by Heparin-Sepharese chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **796**: 251-261
- 5 Maguire GF, Lee M, Connelly PW. Sodium dodecyl sulfate-glycerol-polyacrylamide slab gel electrophoresis for the resolution of apolipoproteins. *J Lipid Res*, 1989, **30**: 757-761
- 6 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156-159
- 7 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992, 24-28, 366-372
- 8 Suzuki J, Takahashi S, Oida K et al. The role of VLDL in the foam cell formation. Abstracts from the 67th science sessions, American Heart Association, New York, 1994 (Electric edition)
- 9 Sukai J, Hoshino A, Takahashi S, et al. Structure, Chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 2173-182
- 10 Wittmaack FM, Gafvels ME, Bronner M, et al. Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor: Trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport. *Endocrinology*, 1995, **136**: 340-348
- 11 Shimano H, Namba Y, Ohsuga J, et al. Secretion-recapture process of apolipoprotein E in hepatic uptake of chylomicron remnants in transgenic mice. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 2215-223
- 12 Kowal RCJ, Hert KH, Weisgraber RW, et al. Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 10771-779
- 13 Windler E, Havel RJ. Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and human on the uptake of triglycerol-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res*, 1985, **26**: 556-565

此文 1998-09-24 收到, 1999-04-24 修回)

(此文编辑 胡必利)