

U937 泡沫细胞模型的建立

李全忠 杨永宗 易光辉 王佐 杨向东

衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

主题词 U937 细胞系; 氧化型低密度脂蛋白; 高效液相色谱; 胆固醇; 胆固醇酯; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化

摘要 为建立一个新的人单核细胞来源的泡沫细胞模型, 将 U937 细胞与 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h, 应用高效液相色谱检测发现细胞内胆固醇和胆固醇酯增加, 胆固醇酯含量大于总胆固醇含量的 50%; 应用光镜和透射电镜观察发现细胞胞浆内出现大量的红染颗粒或脂质空泡。提示 U937 细胞与 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h 后, 成功建立了人类单核细胞源性泡沫细胞。

Establishment of a Novel Foam Cell Model from Human Monocytic U937 Cell Line

LI Quan-Zhong, YANG Yong-Zong, YI Guang-Hui, WANG Zuo and YANG Xiang-Dong

Institute of cardiovascular disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

MeSH U937 Cell Line; Lipoprotein, LDL; High Performance Liquid Chromatography; Cholesterol; Cholesteryl Esters; Foam Cell; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To establish a macrophage-derived foam cell model from human monocytic U937 cell line. **Methods** U937 cells were incubated with 80mg/L oxidized low density lipoprotein for 48 hours. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for qualitative and quantitative analysis of intracellular cholesterol and cholesteryl esters. Both light microscope (using red oil O staining technique) and transmission electron microscope were applied to observe the morphology of treated and control U937 cells. **Results** Total intracellular cholesterol in oxidized low density lipoprotein treated U937 cells increased markedly with cholesteryl esters higher than cholesterol identified by HPLC assay. There were also many lipid droplets in these cells both under the electronic microscope and light microscope. **Conclusion** A novel human monocyte-derived foam cell model was established by incubating U937 cells with 80 mg/L oxidized low density lipoprotein for 48 hours.

泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块内出现的特征性病理细胞, 其主要来源有两个, 一是血液单核细胞, 二是血管中膜平滑肌细胞。一般认为在动脉粥样硬化形成的早期, 血液中的单核细胞进入内皮下间隙, 在内膜下被激活后分化为巨噬细胞, 后者主要通过清道夫受体无反馈性下调地吞噬大量氧化修饰的低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 导致细胞内脂质堆积, 形成泡沫细胞^[1]。建立稳定的人类单核细胞源性泡沫细胞模型, 对研究动脉粥样硬化有重要的意义。本文介绍在体外以常用的人类单核细胞株 U937 为细胞材料建立一个新的人单核细胞源性泡沫细胞模型的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

U937 细胞株由上海血液学研究所提供。胆固醇标准品和胆固醇酯酶购自 Sigma 公司。乙腈为上海吴泾化工厂产品。牛血清白蛋白由华美生物工程公司提供, RPMI-1640 为 GIBCOLab 产品。丙二醛测

定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。Waters991 型高效液相色谱仪系统和 Gen-Pak FAX 柱为 Waters 公司产品, 冷冻真空干燥仪为美国 Labconco 公司产品, 超速离心机为日本 Hitachi80-P 型产品。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

按蔡海江等^[2]方法超速离心提取 LDL。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 考马斯亮兰染色显示为单一条带。采用 Lowry 方法^[3], 以牛血清白蛋白作标准品, 测得 LDL 浓度为 2.5 g/L。将 LDL 置于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 中 37℃ 透析 12 h 后, 在含 0.1% EDTA 的 PBS 中透析 24 h, 0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌备用。用硫代巴比妥酸反应物质含量来鉴定 LDL 的修饰程度。以四乙氧基丙烷为标准品, 用每毫克 LDL 蛋白中丙二醛的含量来表示。按说明书操作, 测得新鲜 LDL 的丙二醛为 2.1 $\mu\text{mol/g}$, 经 CuSO_4 处理的 LDL 即 ox-LDL 的丙二醛含量为 25.3 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.3 U937 细胞的培养及处理

U937 细胞株系人类单核细胞系, 倍增时间为 24 ~ 48 h, 在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中呈

悬浮生长。U937 细胞置于 37℃ 含 5% CO₂ 和 95% 空气的培养箱中培养,细胞密度为 10⁹ 个/L 左右,每两天换液一次。将新换液的 U937 细胞分为对照组和处理组,对照组只加培养基,处理组另加 ox-LDL 至终浓度为 80 mg/L,培养 48 h 后收集细胞。

1.4 高效液相色谱法检测胆固醇及胆固醇酯

按本所王佐等^[4]方法,将收集的培养细胞分别低速离心,弃上清,用生理盐水清洗细胞。然后用等体积的生理盐水重悬细胞,在冰浴下超声破碎 600 W,20 s),加入等体积的 15% 乙醇氢氧化钾 (-20℃),混匀后加入 6% 三氯乙酸数滴去蛋白,涡旋 5 min 至清亮。再加入等体积正己烷:异丙醇 4:1, V/V),涡旋 5 min 后离心 5 min,收集上层有机相,将下层水相按上述步骤重复二次。

采用 Lowry 法对下层水相进行细胞蛋白质定量分析。将收集的有机相真空冷冻干燥,加入原培养细胞 1/10 体积的异丙醇-正庚烷-乙腈 55:12:52, V/V)溶解样品,超声去泡,离心 5 min 后取 10 μL 注入高效液相色谱仪的上样孔。采用 Gen-Pak 柱,柱温 4℃,对样品进行非梯度洗脱,流速 1 mL/min,226 nm 紫外光检测 10 min。胆固醇以峰面积定量,先检测样品中游离胆固醇的量,再用胆固醇酯酶将一样品中的胆固醇酯完全水解成胆固醇,以高效液相色谱测定总胆固醇量,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。

1.5 U937 细胞油红 O 染色

按杨永宗等^[5]方法,收集细胞低速离心制成细胞悬液,涂于干净的被有 1% 明胶的玻璃片上,自然晾干。在 2.5% 的戊二醛中固定 3 h→2.5% 重铬酸钾处理 16 h→新鲜配制的 0.3% 油红 O 染色 20 min→氧化苏木精衬染 2 min→丙酮脱水 1~2 s 后 PVP 封片。各步骤间均用双蒸水冲洗干净。胞浆内出现红染颗粒的为脂质染色阳性。

1.6 U937 细胞透射电镜观察

以 1:1 (v/v) 的比例在每瓶培养细胞中加入 2% 戊二醛预固定 30 min,低速离心 20 min,去上清后制备出细胞团;以每份细胞团与 5 份 2% 戊二醛的比例固定细胞。标本送湖南医科大学电镜室行透射电镜检查。细胞内脂质在透射电镜下表现为胞浆内或大或小的脂质空泡。

1.7 统计学处理

胆固醇和胆固醇酯检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 *t* 检验。统计显著性以 $P < 0.05$ 判断。

2 结果

2.1 细胞内胆固醇和胆固醇酯的含量

细胞内胆固醇和胆固醇酯高效液相色谱图谱表现为两个独立的吸收峰,第一个峰为胆固醇的吸收峰,第二个峰全为胆固醇酯的吸收峰。进一步定量研究发现,正常对照组细胞内胆固醇酯只占总胆固醇的 30% 左右,而处理组细胞内胆固醇酯增加明显,占细胞内总胆固醇的 60% 以上 (表 1, Table 1),符合泡沫细胞的生物学特性。

表 1. 细胞内胆固醇和胆固醇酯的含量 (mg/g 细胞蛋白)

Table 1. Content of cholesterol and cholesteryl ester in U937 $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, mg/g cell protein)

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

CE: cholesteryl ester, TC: total cholesterol. a: $P < 0.05$, compared with control group

2.2 细胞的形态学改变

泡沫细胞内脂质的堆积在形态学上也有相应的改变。光镜下,正常对照组细胞内无明显红染颗粒,而处理组细胞体积增大,细胞浆内可见较多的红染颗粒,提示细胞内脂质成分增加。同样,在透射电镜下,正常对照组细胞浆内无脂质空泡 (图 1, Figure 1),经 ox-LDL 处理的细胞胞浆内出现大量的脂质空泡 (图 2, Figure 2)。光镜和电镜结果表明 ox-LDL 处理的细胞胞浆内有大量脂质堆积。

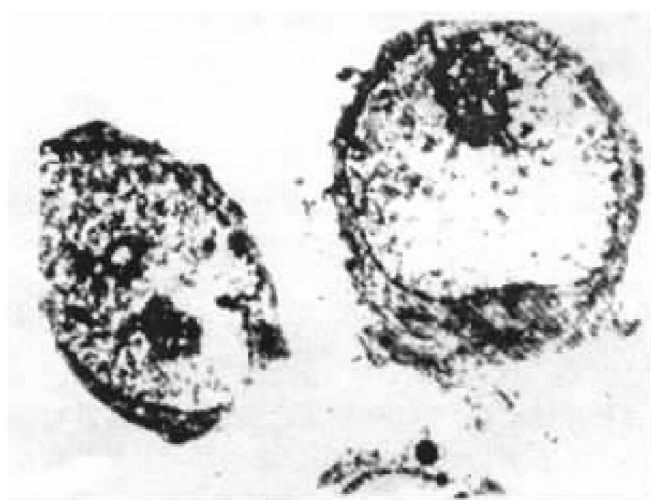


图 1. 对照组细胞透射电镜观。胞浆内无脂质空泡 (×6000)

Figure 1. Transmission electron microscopy of U937 cells cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (×6000)

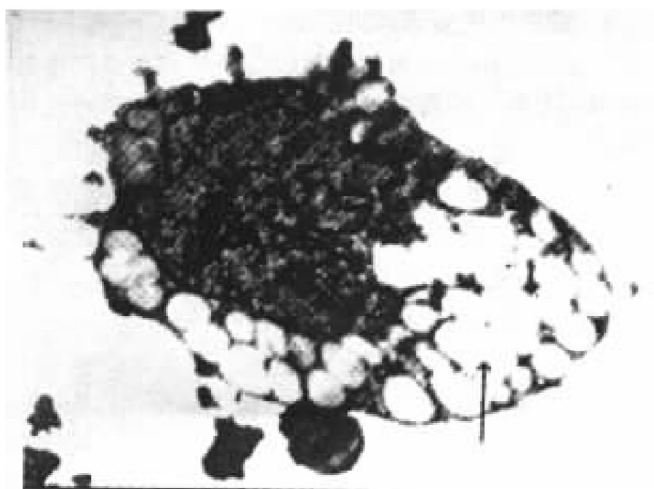


图2. 处理组细胞透射电镜观. 胞浆内有大量的脂质空泡 ($\times 6000$)

Figure 2. Transmission electron microscopy of U937 cells incubated with 80 mg/L of oxidized low density lipoprotein for 48 hours in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum ($\times 6000$)

3 讨论

泡沫细胞的生物学特征有二:其一是在形态学上,细胞浆内脂质成份明显增多,并聚集成滴,苏木素-伊红染色镜下可见胞浆呈泡沫样改变;其二是细胞内总胆固醇增加,且胆固醇酯占总胆固醇的一半以上^[5]。本实验采用人类单核细胞株 U937 与 80 mg/L 的 ox-LDL 孵育 48 h,建立的模型细胞内脂质特别是胆固醇酯明显增加,超过了胆固醇的含量。光镜下处理组细胞经油红 O 染色胞浆内可见明显的红染的脂质颗粒;透射电镜下处理组细胞内可见大量的脂质空泡,在生化和形态学上符合泡沫细胞的定义。提示采用上述方法成功地建立了人单核细胞源性泡沫细胞模型。

采用高效液相色谱法检测细胞内微量的胆固醇和胆固醇酯,克服了以往化学和酶学方法检测细胞内胆固醇和胆固醇酯的不足,提高了胆固醇和胆固醇酯检测的稳定性和灵敏度;在形态学观察上光镜和透射电镜相结合,使实验结果更加直观可靠。以 U937 细胞株为基础建立的泡沫细胞模型来源于人类的单核细胞,比其他动物源性的如 J744 巨噬细胞^[7]及 C57BL/6J 小鼠腹膜巨噬细胞^[8]源性泡沫细

胞更接近于人体。曾有人用外周血单核细胞来源的巨噬细胞与 100 mg/L 的乙酰化 LDL 孵育 48 h 后获得人单核细胞来源的泡沫细胞的报道^[5],与本模型使用 ox-LDL 剂量和时间相近,但本模型使用的是已证明在粥样斑块内存在的氧化型 LDL,且避免了个体差异,也避免了从人体取材原代细胞培养的麻烦,能为研究泡沫细胞提供大量稳定可靠的细胞材料;U937 细胞无经典的 A 类清道夫受体,但存在 B 类清道夫受体 CD36,故本泡沫细胞模型有利于研究 CD36 功能。

总之,本实验在离体细胞水平建立了动脉粥样硬化损伤中的一种病理细胞模型,为研究泡沫细胞和动脉粥样硬化斑块形成的机理提供了新的工具,也为我们今后筛选泡沫化相关基因的顺利进行奠定了可靠的基础。

参考文献

- Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1993, **98**: 1-9
- 蔡海江, 范乐明, 杨绍明. 人血浆脂蛋白的超速离心. 南京医学院学报, 1983, **3**: 42-44
- Lowry OH, Rosebrough, Nira J, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265-270
- 王佐, 李全忠, 杨向东, 等. 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. 中国动脉硬化杂志, 1998, **6**: 317-320
- 杨永宗, 杨小毅, 袁中华. 消斑肽能逆转平滑肌细胞源性泡沫细胞. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3**: 275-278
- Fogellman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 2214-2220
- Rinninger F. Selective uptake of low density lipoprotein-associated cholesteroles by human fibroblasts, human HepG2 hepatoma cells and J774 macrophages in culture. *Biochim Biophys Acta Lipids & Lipid Metab*, 1995, **1255**: 141-153
- 杨永宗, 谭健苗, 杨小毅. 动脉粥样硬化敏感小鼠 C57BL/6J 腹膜巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3** (4): 279-282
- Philippe L, Mustapha R, Sonia S, et al. Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 370-374

此文 1999-05-03 收到, 1999-05-24 修回)

此文编辑 朱雯霞)