

# 低密度脂蛋白受体基因敲除鼠极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分诱导 J774 巨噬细胞胆固醇酯蓄积

张春妮 Miyazaki Akira Hakamata Hideki  
Sakaguchi Hisashi<sup>④</sup> Horiuchi Seikoh  
(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

**主题词** 受体, 低密度脂蛋白; 小鼠, 敲除; 基因; 脂蛋白类; 细胞系; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化

**摘要** 为探讨低密度脂蛋白受体基因敲除鼠血浆极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分致动脉粥样硬化的作用, 采用密度梯度序列超速离心法从低密度脂蛋白受体基因敲除鼠血浆分离极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分, 用日立 7450 自动分析仪测定其脂含量, 琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其电泳迁移率和载脂蛋白组成, 并与鼠腹腔巨噬细胞共同孵育, 观察它与巨噬细胞的相互作用。结果发现, 低密度脂蛋白受体基因敲除鼠血浆极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分与 J774 巨噬细胞孵育后, 细胞胆固醇酯水平 $[(73 \pm 0.5) \mu\text{mol}/(\text{g. cell protein})]$ 非常显著地大于空白对照组( $P < 0.005$ ), 是天然低密度脂蛋白诱导细胞胆固醇酯 $[(8 \pm 7) \mu\text{mol}/(\text{g. cell protein})]$ 蓄积的 9 倍。结果提示, 低密度脂蛋白受体缺失鼠血浆非修饰极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分可被 J774 巨噬细胞摄取, 转巨噬细胞为泡沫细胞。

## Very Low and Intermediate Density Lipoprotein Fraction from Low Density Lipoprotein Receptor – Knockout Mice Induce Cholesterol Ester Accumulation in J774 Macrophages

ZHANG Chun- Ni, MIYAZAKI Akira, HAKAMATA Hideki, SAKAGUCHI Hisashi and HORIUCHI Seikoh

(Department of Medical Laboratory Science, Nanjing General Hospital of People's Liberation Army, Nanjing 210002, China)

**MeSH** Receptor, LDL; Mice, Knockout; Genes; Lipoproteins; Cell Line; Foam Cells; Atherosclerosis

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the atherogenic role of very low density lipoprotein (VLDL) and intermediate density lipoprotein (IDL) fraction isolated from plasma of LDL receptor (LDLR) – knockout mice. **Methods** The lipoprotein fraction containing both VLDL and IDL fraction (LDLR ko- VLDL/IDL) was isolated from plasma of LDLR- knockout mice by ultracentrifugation. The lipid content of the fraction was determined on a Hitachi 7450 automatic analyzer, and its electrophoresis mobility and apolipoprotein components were respectively determined with agarose gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE). In addition, its interaction with J774 macrophages was studied. **Results** After LDLR ko- VLDL/IDL was incubated with J774 macrophages, the cholesterol ester (CE) content  $[(73 \pm 0.5) \mu\text{mol}/(\text{g. cell protein})]$  in macrophages increased markedly, which was an 9- fold increase over the corresponding level induced by native LDL  $[(8 \pm 7) \mu\text{mol}/(\text{g. cell protein})]$  and significantly higher than non- loaded group ( $P < 0.005$ ). **Conclusions** Unmodified LDLR ko- VLDL/IDL fraction could be actively taken up by J774 macrophages and transferred the macrophages to foam cells.

由基因靶技术产生的低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因敲除鼠 (knock-out mice) 是家族性高胆固醇血症动物模型。该模型在高胆固醇饲料喂养下发生严重的高胆固醇血症和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)<sup>[1]</sup>, 但其 As 的发病机制至今尚不十分清楚。由于该鼠高胆固醇血症主要表现在血浆极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和中间密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) 水平增高<sup>[1]</sup>, 故推测血浆

VLDL/IDL 组分有可能参与动脉粥样斑块处泡沫细胞的形成。本实验观察了 LDLR 敲除鼠 VLDL/IDL 组分 (LDLR ko- VLDL/IDL) 与 J774 巨噬细胞的相互作用, 旨在进一步探讨 LDLR 敲除鼠 As 的形成机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细胞培养板及培养液为 IWAKI 产品。琼脂糖凝胶板为 Ciba Corning 产品。胆固醇测定酶购自 Sigma 公司。LDLR 基因敲除鼠由日本中外制药公司 Suzuki 先生提供<sup>[2]</sup>。

日本熊本大学医学部生物化学系

④日本熊本大学医学部病理学系

## 1.2 脂蛋白分离与修饰

密度梯度超速离心分离正常人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) ( $d = 1.019 \sim 1.063$  kg/L) 和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) ( $d = 1.063 \sim 1.20$  kg/L)。用醋酸酐化学修饰 LDL 制备乙酰低密度脂蛋白(acetylated LDL, ac-LDL)<sup>[3]</sup>。超离法分离 LDLR ko-VLDL/IDL 组分 ( $d < 1.019$  kg/L)。分离后,置 0.15 mol/L NaCl 和 1 mmol/L EDTA (pH 7.4) 溶液中透析。

## 1.3 脂分析和电泳

脂含量采用标准酶法,用日立 7450 自动分析仪测定。琼脂糖凝胶电泳用 Universal Gel/8 电泳试剂盒进行。SDS-PAGE 用含 1% SDS 的 10% 凝胶进行,电泳后用考马氏亮兰染色。以载脂蛋白 E 基因敲除鼠 VLDL/IDL 组分作阴性对照。

## 1.4 细胞培养

J774 细胞接种于 24 孔板,在培养液 (RPMI 1640, 10% FCS) 中孵育 2 天,形成单层后换培养液 (RPMI 1640, 0.2% BSA), 分别与 50 mg/L LDLR ko-VLDL/IDL、LDL 或 ac-LDL 孵育 18 h。

## 1.5 细胞胆固醇测定

细胞与脂蛋白孵育 18 h 后,细胞清洗 3 次,用 0.7 mL 已烷:异丙醇(体积比为 3:2)抽提细胞脂质 2 次,于 N<sub>2</sub> 气流下吹干,细胞游离胆固醇(free cholesterol, FC)和总胆固醇(total cholesterol, TC)含量测定参照修饰的酶荧光法<sup>[4]</sup>进行:将吹干的脂质用 180  $\mu$ L 异丙醇复溶,取 30  $\mu$ L 加入 0.4 mL 酶混合液 370,孵育 1 h(用于测定 FC)或 2 h(用于测定 TC),然后加 0.5 mol/L NaOH 0.81 mL 终止反应。测定荧光强度的激发波长为 320 nm,发射波长为 407 nm。胆固醇酯(cholesterol ester, CE)值为 TC 值与 FC 值之差。细胞溶于 0.1 mol/L NaOH,用 BCA 蛋白试剂测定细胞蛋白。

## 2 结果

### 2.1 脂蛋白的脂含量

低密度脂蛋白受体(LDLR) ko-VLDL/IDL 组分中甘油三酯(triglyceride, TG)含量与 LDL 中相似,但其它几种脂质含量均要高(表 1, Table 1)。

### 2.2 电泳

琼脂糖凝胶电泳显示, LDL 和 HDL 分别迁移在  $\beta$  和  $\alpha$  位, LDLR ko-VLDL/IDL 迁移至前  $\beta$ - 位(图 1, Figure 1)。SDS-PAGE 分析发现,载脂蛋白 E 基因敲除鼠 VLDL/IDL 主要含载脂蛋白 B48 和载脂蛋白 A iv, 不含载脂蛋白 E。而 LDLR ko-VLDL/IDL

除含有大量载脂蛋白 B48, 少量载脂蛋白 B100 外, 尚含一定量的载脂蛋白 E(图 2, Figure 2)。

表 1. 低密度脂蛋白受体基因敲除鼠极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分与低密度脂蛋白的脂含量

Table 1. Lipid contents of LDLR ko-VLDL/IDL and LDL (lipid/protein, W/W)

Index	LDL	LDLR ko-VLDL/IDL
TC	1.51	4.90
FC	0.41	1.23
CE	1.10	3.67
TG	0.42	0.42
PL	0.92	1.51

PL: phospholipid. Experimental errors in lipid determination were within 5%

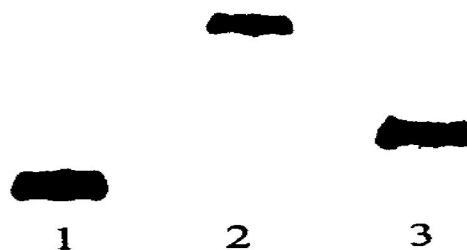


图 1. 琼脂糖凝胶电泳.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis. 1: LDL; 2: HDL; 3: LDLR ko-VLDL/IDL.

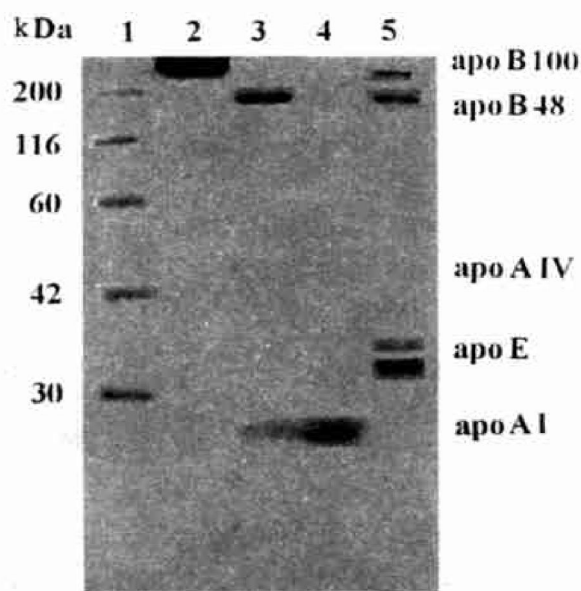


图 2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Figure 2. SDS-PAGE. 1: Marker; 2: LDL; 3: apoE ko-VLDL/IDL; 4: HDL; 5: LDLR ko-VLDL/IDL.

### 2.3 细胞胆固醇含量

作为巨噬细胞清道夫受体(macrophage scavenger receptor- A iv/A  $\oplus$ , MSR- A iv/A  $\oplus$ ) 的活性配基, ac

- LDL 引起 J774 细胞内胆固醇酯[ (149 ± 21)  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{cell protein})$ ] 大量堆积, 而天然 LDL 不增加细胞胆固醇酯含量[ (8 ± 7)  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{cell protein})$ ]。LDLR ko- VLDL/IDL 显著增加细胞胆固醇酯[ (73 ± 0.5)  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{cell protein})$ ] 的蓄积, 与对照组相比, 差异有极显著性 ( $P < 0.005$ ) (图 3, Figure 3)。

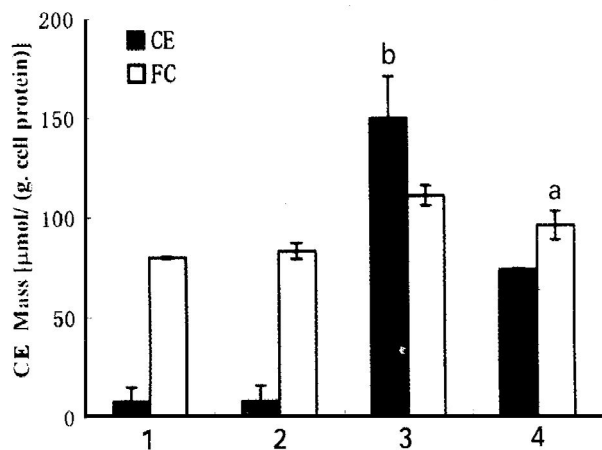


图 3. 低密度脂蛋白受体基因敲除鼠极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白组分对 J774 巨噬细胞胆固醇酯蓄积的影响

**Figure 3. Cholesterol ester accumulation in J774 macrophages induced by LDLR ko- VLDL/IDL.** 1: Control; 2: LDL; 3: ac-LDL; 4: LDLR ko- VLDL/IDL. The concentration of lipoprotein was 50 mg/L. a:  $P < 0.005$ , compared with control; b:  $P < 0.001$ , compared with LDL and control

### 3 讨论

本研究通过分析 LDLR ko- VLDL/IDL 参与泡沫细胞形成的可能性以进一步探讨这种鼠 As 形成的机制。用 J774 巨噬细胞体外实验显示, LDLR ko- VLDL/IDL 可被巨噬细胞摄取, 导致细胞胆固醇酯大量蓄积, 提示血浆高水平 VLDL/IDL 对 LDLR 缺失鼠泡沫细胞的形成起一定作用。As 损伤主要由巨噬细胞衍化沉积有脂质的泡沫细胞所组成<sup>[5]</sup>。已知巨噬细胞通过 MSR- A iv/A  $\ominus$  摄取化学修饰低密度脂蛋白, 导致细胞胆固醇酯蓄积, 转巨噬细胞为泡沫细胞。最近观察到 LDLR 和 MSR- A iv/A  $\ominus$  双基因敲除鼠对饮食诱导动脉硬化的敏感性低于 LDLR 单基因敲除鼠<sup>[6]</sup>, 提示 MSR- A iv/A  $\ominus$  参与 LDLR 基因缺失鼠 As 的形成。我们发现, LDLR ko- VLDL/IDL 的硫代巴比妥酸反应值[ 0.32  $\mu\text{mol MDA}/(\text{g} \cdot \text{protein})$ ] 与天然 LDL 的硫代巴比妥酸反应值[ 0.70  $\mu\text{mol MDA}/(\text{g} \cdot \text{protein})$ ] 相似, 远低于  $\text{Cu}^{2+}$  氧化 LDL

的硫代巴比妥酸值[  $> 10 \mu\text{mol MDA}/(\text{g} \cdot \text{protein})$  ], 表明 LDLR ko- VLDL/IDL 为非修饰脂蛋白组分。因此, MSR- A iv/A  $\ominus$  作为识别受体的可能性不大。SDS- PAGE 分析显示, LDLR ko- VLDL/IDL 除含有载脂蛋白 B100, 载脂蛋白 B48 以外, 尚含有大量载脂蛋白 E。载脂蛋白 E 是富含精氨酸, 相对分子质量为 34 kDa 的糖蛋白。作为 VLDL 和 HDL 的结构成分, 载脂蛋白 E 是 LDLR 及其超家族包括 VLDL 受体和 LDL 受体相关蛋白的活性配基<sup>[7]</sup>。推测 LDLR ko- VLDL/IDL 与 J774 细胞的相互作用可能由载脂蛋白 E 介导, 其结合受体可能是 LDL 受体基因家族中的一员或与这一受体家族密切相关的某个受体。尚需进一步研究以确定巨噬细胞中识别 LDLR ko- VLDL 分子的受体及受体结合位点。

本实验结果提示, LDLR 缺失鼠非修饰 VLDL/IDL 组分可能担当体内致 As 脂蛋白, 在载脂蛋白 E 介导下与巨噬细胞相互作用, 转巨噬细胞为泡沫细胞。

### 参考文献

- 1 Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, et al. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol- fed low density lipoprotein in receptor- negative mice. *J Clin Invest*, 1994, **93** (5): 1 885- 893
- 2 Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptor in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997, **386**: 292- 296
- 3 Miyazaki M, Sakai M, Sugino H, 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**: 5 254- 269
- 4 Kawano T, Hakamata H, Ohta T, et al. Inhibitory effects of HepG2 cell- derived apolipoprotein A iv- containing lipoproteins in cholesteryl ester accumulation in macrophages. *Biochemistry*, 1997, **36**: 9 816- 825
- 5 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801- 809
- 6 Sagaguchi H, Takeya M, Suzuki H, et al. Role of macrophage scavenger receptors in diet- induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest*, 1998, **78**: 423- 434
- 7 Plump AS. Sever hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992, **71**: 343- 353

(此文 1999- 03- 17 收到, 1999- 10- 28 修回)

(此文编辑 文玉珊)