

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0111- 04

• 实验研究 •

# 高密度脂蛋白 3 介导大鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇流出

陈佩芳, 李剑军, 吴满平, 楼 滨, 杨小琪

(上海医科大学药学院生物化学教研室, 上海市 200032)

[主题词] 巨噬细胞, 腹腔; 胆固醇; 脂蛋白, 高密度; 细胞内吞; 异硫氰酸荧光素酯; 大鼠

[摘要] 为了研究高密度脂蛋白 3 介导大鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇流出的机理, 用 N- 乙酰咪唑修饰高密度脂蛋白 3, 阻断其与细胞表面受体的结合, 观察细胞内胆固醇流出。用异硫氰酸荧光素酯标记高密度脂蛋白 3, 示踪其在细胞内的代谢。结果发现牛血清白蛋白(对照组)介导 2.87% 细胞内胆固醇流出, 高密度脂蛋白 3 组和 N- 乙酰咪唑- 高密度脂蛋白 3 组分别为 40.68% 和 8.69%。异硫氰酸荧光素酯- 高密度脂蛋白 3 与细胞在 37℃ 共育 3 h 后, 细胞内吞荧光强度占结合的 65.0%, 细胞在 37℃ 继续培养 2 h 后, 细胞释放的荧光强度占内吞的 78.4%, 并且内吞和释放的荧光强度均主要存在于三氯醋酸沉淀部分。结果提示高密度脂蛋白 3 通过与细胞表面受体作用进入细胞, 在细胞内不经过溶酶体途径降解, 而是接受细胞内胆固醇后通过逆胞饮形式释放到细胞外。

[中图分类号] Q548.1

[文献标识码] A

## Cholesterol Efflux from Macrophages Mediated by High Density Lipoprotein- 3

CHEN Pei- Fang, LI Jian- Jun, WU Man- Ping, LOU Bin, and YANG Xiao- Qi

(Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**MeSH** Macrophages, Peritoneal; Cholesterol; Lipoprotein, HDL; Endocytosis; Fluorescence Isothiocyanate; Rat

**ABSTRACT** **Aim** To study the mechanism of cholesterol efflux from rat peritoneal macrophages mediated by high density lipoprotein- 3(HDL<sub>3</sub>). **Methods** Modification of HDL<sub>3</sub> by N- acetylimidazole blocked interaction between HDL and its cellular receptor. FITC labeled HDL<sub>3</sub> were used to observed the cellular metabolic process of HDL<sub>3</sub>. **Results** BSA (control group) mediated 2.9% cellular cholesterol efflux from the cells. In HDL<sub>3</sub> group and N- acetylimidazole- HDL<sub>3</sub> group, they were 40.7% and 8.7% respectively. After incubation of macrophages with FITC- HDL<sub>3</sub> at 37℃ for 3 h, the cell- endocytic fluorescence strength (FS) was 65.0% of the cell- associated FS. When the cells were further incubated with blank media at 37℃ for 2 h, 78.4% of the cell- endocytic FS was released into the media. Both the cell- endocytic FS and the cell- released FS were mainly in trichloroacetic acid preceipitable form. **Conclusions** The cellular cholesterol efflux from macrophages mediated by HDL<sub>3</sub> was HDL receptor- dependent. The possible mechanism could be that macrophages internalized HDL<sub>3</sub> by HDL receptor. HDL<sub>3</sub> picked up cellular cholesterol and was resecreted out of cells by a retroendocytic pathway without taking a cellular lysosomal pathway.

高密度脂蛋白 3 (high density lipoprotein - 3, HDL<sub>3</sub>) 具有抗动脉粥样硬化作用, 主要是因为其参与了胆固醇(cholesterol)逆转运。胆固醇逆向转运包含三个步骤: ①胆固醇从肝外细胞流出, 被 HDL<sub>3</sub> 接受; ②在血浆中卵磷脂: 胆固醇酰基转移酶催化下, 胆固醇转变成胆固醇酯, 使 HDL<sub>3</sub> 转化成富含胆固醇酯的 HDL<sub>2</sub>; ③肝脏选择性摄取 HDL<sub>2</sub> 中胆固醇酯。其中第二步胆固醇酯化反应过程早已阐明, 第三步

肝脏选择性摄取 HDL<sub>2</sub> 中胆固醇酯的机理, 我们已作了研讨<sup>[1]</sup>。但关于第一步 HDL<sub>3</sub> 介导细胞内胆固醇流出的机理, 至今尚未阐明, 有几种代表观点: 胆固醇通过简单扩散透过细胞膜, 进入细胞间液与 HDL 结合并被运走<sup>[2]</sup>; ④细胞上 HDL 受体介导细胞内胆固醇流出<sup>[3]</sup>; ⑤细胞内胆固醇流出是由 HDL 中脂质部分介导的<sup>[4]</sup>; HDL 中两种组分, 即载脂蛋白与脂质部分均参与了细胞内胆固醇的流出<sup>[5]</sup>。本研究将以大鼠腹腔巨噬细胞为对象来探讨细胞内胆固醇流出的机理。

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(项目编号 39570158)

[作者简介] 陈佩芳, 女, 46 岁, 主管技师, 参与国家自然科学基金资助课题 5 次, 发表论文 20 余篇, 两次赴香港中文大学生物化学系进修。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

健康人血由上海市中心血站提供。Wistar 大鼠由我校实验动物部提供。RPMI-1640 培养基系 GIBCO 产品。胰蛋白酶系 Difco 进口分装。异硫氰酸荧光素酯 (fluorescence isothiocyanate, FITC) 系上海第二军医大学药学系工厂产品。胆固醇酶联试剂盒系上海十八药厂产品。超速离心机系 Beckman 产品。CO<sub>2</sub> 培养箱系日本 Tabaiespec 公司产品。荧光分光光度计系日本 Hitachi 产品。D-Hanks 液 (pH7.4) 含 0.8% NaCl、0.04% KCl、0.006% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、0.006% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.035% NaHCO<sub>3</sub> 和 0.002% 酚红。细胞培养基为含 10% 小牛血清、100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 液。

## 1.2 无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白 3 的制备与纯化

参照我室方法<sup>[2]</sup>。人新鲜血浆经超速离心后,采用吸流法,取密度在 1.125~1.210 kg/L 部分,经肝素-Sephrose CL-4B 亲和层析制备,经电泳证明不含载脂蛋白 E。本实验所用 HDL<sub>3</sub> 均为无载脂蛋白 E-HDL<sub>3</sub>。

## 1.3 大鼠腹腔巨噬细胞制备

以 85% 普通饲料、2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠和 12.5% 猪油配成的高脂饲料喂养老鼠,建立高脂模型。实验前 4 天,大鼠腹腔注射 3% 无菌硫代乙醇酸钠肉汤,诱导巨噬细胞产生。实验时将大鼠乙醚麻醉处死,用 D-Hanks 液腹腔灌洗收集腹腔巨噬细胞,1 000 r/min 离心 10 min,将沉淀用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基制成悬液,调节细胞浓度至  $3 \times 10^6$  个/L,接种于直径 35 mm 培养皿中。置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,3 h 后洗去未贴壁的细胞,加入 2 mL 培养基,预培养 24 h 后加入各种样品。

## 1.4 N-乙酰咪唑修饰高密度脂蛋白 3

参照我室方法<sup>[6]</sup>。

## 1.5 高密度脂蛋白 3 的异硫氰酸荧光素酯标记及异硫氰酸荧光素酯-高密度脂蛋白 3 的纯化

参照我室方法<sup>[7]</sup>。

## 1.6 细胞内胆固醇含量的测定

用 1 mL 0.5% 胰蛋白酶消化贴壁细胞,洗涤,超声波粉碎,离心后取上清液,按胆固醇-酶联法测定胆固醇含量。

## 1.7 N-乙酰咪唑修饰对高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的影响

实验分三组,每组 4 皿。分别加入 100 μg 牛血清白蛋白 (BSA)、100 μg HDL<sub>3</sub> 和 100 μg N-乙酰咪

唑-HDL<sub>3</sub>。37℃培养 24 h,测定细胞内胆固醇含量。用 *q* 检验方法进行数据显著性差异分析。

## 1.8 高密度脂蛋白 3 和 N-乙酰咪唑-高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇外流的时间-效应曲线和剂量-效应曲线

三组各取 10 皿细胞,分别加入 100 μg BSA、100 μg HDL<sub>3</sub>、100 μg N-乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub>。每组再分别分成三组,37℃分别培养 12 h (*n*=3)、24 h (*n*=4) 和 36 h (*n*=3),测定细胞内胆固醇含量,绘制时间-效应曲线。取 10 皿细胞,分别加入 50 μg (*n*=3)、100 μg (*n*=4) 和 150 μg (*n*=3) HDL<sub>3</sub>,相应浓度依次为 25、50 和 75 mg/L。另各取 10 皿细胞,分别加入相应剂量的 BSA 和 N-乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub>。37℃培养 24 h,测定细胞内胆固醇含量,绘制剂量-效应曲线。

## 1.9 细胞结合、内吞和释放载脂蛋白实验

取 6 皿细胞,加入 100 μg 异硫氰酸荧光素酯-HDL<sub>3</sub>,总体积定容至 2 mL,37℃培养 3 h 后用无酚红 D-Hanks 液洗三遍,分成三组(每组 2 皿)。第一组每皿加入 1.5 mL 含 0.5% 胰蛋白酶的无酚红 D-Hanks 液,室温消化 2 min,回收细胞,超声波粉碎,测定细胞结合内吞的荧光强度(激发波长 495 nm,发射波长 519 nm)。第二组每皿加 1 mL 含 0.5% 胰蛋白酶的无酚红 D-Hanks 液,0℃处理 15 min,离心洗涤后加入 1.5 mL 含 0.5% 胰蛋白酶的无酚红 D-Hanks 液,室温消化 2 min,回收细胞,超声波粉碎后加三氯醋酸沉淀蛋白质,分离沉淀和上清液,分别测定细胞内吞三氯醋酸沉淀部分和上清液部分的荧光强度。第三组按第二组 0℃处理后再加入 2 mL 培养基,37℃培养 2 h,取上清液加入三氯醋酸沉淀蛋白质,分别测定细胞释放的三氯醋酸沉淀部分和上清液部分的荧光强度。

## 2 结果

### 2.1 N-乙酰咪唑修饰高密度脂蛋白 3 对其介导巨噬细胞内胆固醇流出的影响

从表 1 (Table 1) 中可见,BSA、HDL<sub>3</sub> 和 N-乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub> 分别介导 2.87%、40.68% 和 8.69% 细胞内胆固醇流出, *Q* 检验结果显示 HDL<sub>3</sub> 组与 BSA 组及 N-乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub> 组均有显著性差异 (*P*<0.05)。而 BSA 组与 N-乙酰咪唑-HDL<sub>3</sub> 组之间差异不显著 (*P*>0.05)。

### 2.2 高密度脂蛋白 3 和 N-乙酰咪唑-高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的时间-效应曲线和剂量-效应曲线

由图 1(Figure 1) 中可见, 随着时间的延长, HDL<sub>3</sub> 介导细胞内胆固醇流出增加, 细胞内胆固醇含量逐渐减少, 而 N- 乙酰咪唑- HDL<sub>3</sub> 组变化不明显。

表 1. N- 乙酰咪唑修饰对高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的影响。

Table 1. Cholesterol efflux from macrophages in the presence of HDL<sub>3</sub> and N- acetylimidazole- HDL<sub>3</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ ).

Groups	TC ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Cholesterol efflux	Efflux percentage (%)
Control	80.6 $\pm$ 3.3	0	0
BSA	78.3 $\pm$ 4.7	2.31	2.87
HDL <sub>3</sub>	47.8 $\pm$ 5.4 <sup>ab</sup>	32.78	40.68
N- ALD- HDL <sub>3</sub>	73.6 $\pm$ 4.7	7.00	8.69

N- ALD- HDL<sub>3</sub>: N- acetylimidazole- HDL<sub>3</sub>. a:  $P < 0.05$ , compared with control and BSA group; b:  $P < 0.05$ , compared with N- ALD- HDL<sub>3</sub> group.

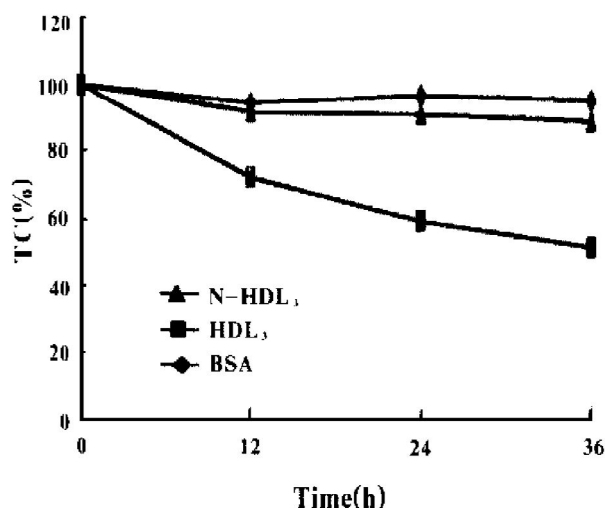


图 1. 高密度脂蛋白 3 和 N- 乙酰咪唑- 高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的时间- 效应曲线(24 h 组  $n = 4$ , 其它时间组  $n = 3$ ).

Figure 1. Time- course of cholesterol efflux from macrophages in the presence of HDL<sub>3</sub> and N- acetylimidazole treated HDL<sub>3</sub> ( $n = 4$  at 24 h,  $n = 3$  at other time).

同样, 图 2(Figure 2) 结果显示, 随着剂量的增加, HDL<sub>3</sub> 介导细胞内胆固醇流出量逐渐增加, 细胞内胆固醇含量逐渐减少, 而 N- 乙酰咪唑- HDL<sub>3</sub> 组无明显变化。

### 2.3 细胞结合、内吞和释放载脂蛋白实验

表 2(Table 2) 结果显示, 细胞内吞的荧光强度占结合荧光强度的 65.0%, 细胞释放的荧光强度占内吞荧光强度的 78.4%, 且两者的荧光强度分别以 94.4% 和 94.2% 的比例存在于三氯醋酸沉淀部分。

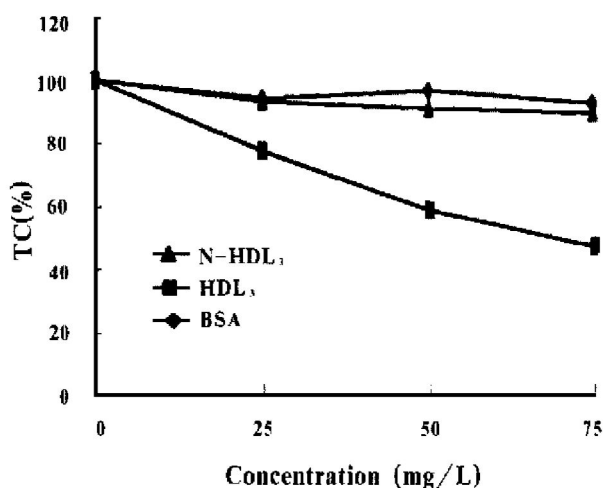


图 2. 高密度脂蛋白 3 和 N- 乙酰咪唑- 高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的剂量- 效应曲线 (100  $\mu\text{g}$  组  $n = 4$ , 其它剂量组  $n = 3$ ).

Figure 2. Cholesterol efflux from macrophages in the presence of HDL<sub>3</sub> and N- acetylimidazole- HDL<sub>3</sub> ( $n = 4$  at 100  $\mu\text{g}$ ,  $n = 3$  at other dose).

表 2. 细胞结合、内吞和释放荧光强度。

Table 2. Cell- associated, cell- endocytic and cell- released fluorescence strength (FS) after incubation of macrophages with FITC- HDL<sub>3</sub> ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 2$ ).

Groups	FS	Preceptable FS	Souluble FS
Associated( iv)	14.8 $\pm$ 0.2	-	-
Endocytic( ⑤)	-	9.1 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.1
Released( ⑥)	-	7.1 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1
⑤ iv( %)	65.0	-	-
⑥ ⑤( %)	78.4	-	-

## 3 讨论

大量研究表明高密度脂蛋白能促进肝外细胞内胆固醇流出, 从而具有抗动脉粥样硬化作用。我们的结果有力证明了这一点(表 1), 高密度脂蛋白 3 将巨噬细胞内 40.68% 胆固醇介导流出, 与牛血清白蛋白组(对照组)有显著性差异( $P < 0.05$ )。载脂蛋白 A- I 是高密度脂蛋白的主要载脂蛋白, 它的缺失或者减少会引起血浆高密度脂蛋白减少和冠心病发病率的增加。载脂蛋白 A- I 能识别高密度脂蛋白受体, 修饰它使其不能与细胞结合, 对研究受体在细胞内胆固醇外流中的功能非常有用。N- 乙酰咪唑特异修饰高密度脂蛋白中的酪氨酸, 几乎能完全阻断细胞与高密度脂蛋白的结合, 细胞内胆固醇的流出率也显著降低( $P < 0.05$ ), 说明高密度脂蛋白 3 促进细胞内胆固醇的流出是由受体介导的。从时间- 效应曲线(图 1) 和剂量- 效应曲线(图 2) 上可以

看出, 高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇流出的能力随时间的延长和剂量的增加而增强, 而 N-乙酰咪唑- 高密度脂蛋白 3 组无明显变化, 这更进一步说明了高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇的流出是由受体介导的。

用异硫氰酸荧光素酶标记观察载脂蛋白的摄取和代谢的实验中, 细胞内吞的荧光强度占结合量的 65.0%, 三氯醋酸检测出存在于三氯醋酸沉淀部分的荧光强度占 94.4%, 即内吞以后异硫氰酸荧光素酶仍与载脂蛋白相结合, 说明载脂蛋白在巨噬细胞内未经溶酶体降解。这与我们实验室以前在大鼠肝窦状隙细胞中得到的结果一致<sup>[1]</sup>。释放到介质中的荧光强度占内吞量的 78.4%, 并且以 94.2% 的比例存在于三氯醋酸沉淀部分(表 2)。说明巨噬细胞与高密度脂蛋白 3 作用过程中, 细胞摄取了高密度脂蛋白 3, 并且未被溶酶体降解, 而是以逆向胞饮的途径释放出来。

从本实验结果我们可以提出高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇外流的假说, 即高密度脂蛋白 3 通过载脂蛋白 A- I 与细胞受体作用被细胞内吞, 不经溶酶体途径降解, 而是摄取胞浆中胆固醇, 以逆向胞饮方式释放到细胞外。

## •读者•作者•编者•

# 关于汉字文稿中名词术语使用英语缩写的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时, 作者往往喜欢用一个英语缩写词来代替; 这样做, 既节省篇幅, 又避免繁琐重复, 为多数期刊所称颂, 本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现, 由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响, 在使用名词术语的英语缩写时存在以下问题: ①同一个英语名词如术语, 译成的汉语不同, 如 derived 这个词, 有的译成源性, 有的译为衍化, 还有的译成衍生; ②名词术语的缩写不规范, 英语字母的大小写不一致, 如载脂蛋白(apolipoprotein), 缩写为 apo 已不规范, 而它却有 Apo 和 apo 两种写法; ③用法不当, 有的用在文题中, 有的用作关键词, 有的名词术语仅两三个汉字, 为图方便, 个别作者也用缩写词来代替; 而且, 第一次出现时, 没有汉英对照, 只有缩写, 这是极不应该的。有鉴于此, 为求统一, 本刊对汉字文稿中名词术语使用英语缩写词来代替作如下规定, 请作者遵照执行。

1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内, 一律使用汉语; 多于 3 个汉字的, 可使用英语缩写; 如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等, 都只能用汉语; 但冠心病、肺心病等例外。

## 参考文献

- [1] 魏强, 吴满平, 陈佩芳, 等. HDL 受体和肝性脂酶在肝选择性摄取 HDL<sub>2</sub>-CE 中的协同作用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28: 659-662
- [2] Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, et al. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux[J]. J Lipid Res, 1992, 33: 1091-1098
- [3] Shotte JF, Oram JF, Bierman EL. Binding of HDL to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intercellular membranes to the cell surface[J]. J Bio Chem, 1987, 262: 12001-12012
- [4] Mahlberg FH, Glick JM, Kafz SL, et al. Influence of apolipoprotein A- I, A- II, and Cs on the metabolism of membrane and lysosomal cholesterol in macrophages[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 19931-19935
- [5] Oram JF, Mendez JA, Slotte JP, et al. HDL apolipoproteins mediated removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol-loaded fibroblasts[J]. Arterioscler Thromb, 1991, 11: 403-413
- [6] 吴满平, 陈佩芳, 卜书红, 等. 乙酰咪唑修饰对高密度脂蛋白结合人肝癌 SMMC-7721 细胞的影响[J]. 上海医科大学学报, 1994, 21: 321-323
- [7] 吴满平, 陈佩芳, 陈其善, 等. 大鼠肝外非实质细胞的高密度脂蛋白非溶酶体途径内吞[J]. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25: 543-544

(1999-12-03 收到, 2000-03-15 修回)

(此文编辑 朱雯霞)

2 文题、摘要和关键词中的名词术语, 不得使用英语缩写词来代替。

3 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语; 段首和句首的名词术语, 也不得用缩写词来代替。

4 第一次使用英语缩写词来代替名词术语时, 必须按照下列格式来写: 汉语(英语, 缩写)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等, 以下行文, 可只写缩写词, 不必注释汉语。

5 用来代替汉语名词术语的英语缩写词, 在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符; 若词末有数字, 可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线), 如 II-1。

7 名词术语的英语缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英语缩写词, 我刊规定一篇文献综述可使用 5 个, 其它文稿限 3 个内。

以上规定, 自 1994 年 10 月 1 日起生效; 此后, 凡文稿中有不符合规定者, 本刊将退回作者重写, 直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)