

钙离子信使通路在溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流中的作用

杨丽丽, 凌文华, 马 静, 唐志红

(中山医科大学公共卫生学院, 广州 510089)

[主题词] 溶血卵磷脂; 巨噬细胞, 泡沫细胞; 胆固醇; 钙

[摘要] 探讨溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胆固醇外流影响及第二信使细胞内钙在这一效应中所起的作用, 为动脉粥样硬化的有效防治提供理论依据。分离培养小鼠腹腔巨噬细胞, 用乙酰化低密度脂蛋白负载使之形成巨噬泡沫细胞; 酶学荧光法检测细胞胆固醇外流, 荧光分光光度法检测细胞内钙, 分别整合细胞外钙和抑制蛋白激酶 C 活性后检测溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响。结果发现, 在 10~80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 各剂量溶血卵磷脂组培养基中游离胆固醇浓度明显高于对照组。各剂量溶血卵磷脂引起胞内钙离子浓度升高, 当用 EGTA 整合细胞外钙后, 溶血卵磷脂不引起胞内钙离子浓度升高, 以及不再促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流。当蛋白激酶 C 活性受抑制后, 溶血卵磷脂不再促进细胞胆固醇外流。溶血卵磷脂在 10~80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内能够促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流, 这一效应与胞内第二信使细胞内钙浓度升高有关, 而且钙离子-蛋白激酶 C 这一信使通路介导了溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流效应。

[中图分类号] R344.81

[文献标识码] A

Effect of Calcium Signaling Pathway on Cholesterol Efflux Promoted by Lysophosphatidylcholine from Macrophage Foam Cells

YANG Li- Li, LING Wen- Hua, MA Jing, and TANG Zhi- Hong

(School of Public Health, Sun Yat- Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

MeSH Lysophosphatidylcholine; Macrophage, Foam Cells; Cholesterol; Calcium

ABSTRACT **Aim** To explore the effect of lysophosphatidylcholine on cholesterol efflux from macrophage foam cells, and the function of calcium signaling pathway on this effect. **Methods** Macrophage foam cells were harvested from female mice weighing 25~30 g. Human LDL was separated from healthy subjects and isolated by differential ultracentrifugation. LDL was acetylated to ac-LDL to convert macrophage to foam cells. Cholesterol mass of medium and cells were quantified by enzymatic fluorometry. Intracellular calcium concentration was measured by fluorometry. Involvement of intracellular calcium and PKC on effect of cholesterol efflux from macrophages by LPC was measured by applying EGTA and H_7 to adduct extracellular calcium and to inhibit the activity of PKC, then observed whether cholesterol efflux could occur. **Results** Within the dosage of 10~80 $\mu\text{mol/L}$, LPC obviously promoted cholesterol efflux from macrophage foam cells, and LPC increased intracellular calcium concentration. When extracellular calcium was cleared by EGTA or PKC activity was inhibited by H_7 , LPC could not promote cholesterol efflux from macrophage foam cells.

Conclusions LPC could promote cholesterol efflux from macrophage foam cells within the dosage of 10~80 $\mu\text{mol/L}$, this effect is related to influx of intracellular calcium. Calcium-PKC signaling pathway induced LPC's effect on cholesterol efflux from macrophage foam cells.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种危害人类健康的危险疾病, 能否找到有效防治 As 的因素及途径已经成为当今医学研究领域的当务之急。泡沫细胞的形成是 As 形成早期的病理变化。阐明泡沫

细胞的形成机制不仅是明确 As 形成机理的基础, 而且也是 As 防治研究首先要解决的问题。泡沫细胞的形成涉及两方面因素, 即胆固醇内流增加和胆固醇外流减少, 而能够促进胆固醇外流增加的因素对 As 形成有拮抗作用。溶血卵磷脂 (lysophosphatidylcholine, LPC) 来自于卵磷脂的水解或低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化过程, 近

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号 39870326) 资助

[作者简介] 杨丽丽, 女, 1976 年出生, 中山医科大学公共卫生学院教师。

年来研究发现 LPC 具有某些抗 As 作用。本研究观察 LPC 对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响, 对这一效应的形成机制做初步探讨, 以期 As 的有效防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用小鼠为本校动物实验中心提供, 昆明种, 雌性, 体重 25~ 30 g。健康人新鲜血浆购自广州市中心血站。DMEM 培养基购自 Borringhman 公司, FCS 购自天象人公司, 庆大霉素、LDL 乙酰化试剂、Lowry's 法蛋白检测试剂盒、酶学荧光法检测胆固醇试剂、Fura2/AM 和 PKC 抑制剂 H_7 均购自 Sigma。

1.2 低密度脂蛋白的分离、提纯和乙酰化

采用密度梯度超速离心法^[1]。新鲜正常人血浆经密度梯度超速离心, 50 000 r/min, 4℃, 5 h。离心后采集的 LDL 经透析液透析 4℃, 24 h。LDL 的蛋白含量测定用 Lowry' 法。LDL 纯度鉴定用琼脂糖凝胶电泳法。

低密度脂蛋白乙酰化按文献[2]方法, 以 6 mL 醋酸酐/g LDL 蛋白量在 1 h 内对 LDL 进行乙酰化。Ac-LDL 蛋白含量测定同 LDL 蛋白含量测定方法。Ac-LDL 纯度鉴定同 LDL 纯度鉴定。

1.3 巨噬细胞分离、培养及分组

小鼠腹腔巨噬细胞的分离按文献[3]方法。用台盼蓝排除法计数细胞存活率达 95% 以上。按细胞密度 2×10^6 接种于 24 孔培养板中。于 37℃ 温箱孵育 2 h, 之后洗去未贴壁细胞, 重新用含 50 mg/L Ac-LDL 的 DMEM 培养基孵育 20 h, 以形成巨噬泡沫细胞。

实验分空白对照组、不同浓度 LPC 组(10、20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$)、EGTA(1 mmol/L) 处理组和 H_7 (10 $\mu\text{mol/L}$, 5 min) 处理组。细胞为同一批次分离并处理形成的巨噬泡沫细胞。

1.4 胆固醇外流检测^[4]

1.4.1 细胞胆固醇检测 细胞胆固醇检测分二步进行, 第一步制备样品, 各组细胞用细胞刮刮下, 离心, 2 000 r/min, 10 min。弃上清, 用 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH7.4) 洗两次。500 μL 样品用于细胞总胆固醇和游离胆固醇检测。

第二步, 取 0.1 mL 样品加入到 0.9 mL 游离胆固醇检测分析液中, 37℃ 孵育 1 h。用荧光分光光度计检测荧光强度, $\text{ex} = 325 \text{ nm}$, $\text{em} = 410 \text{ nm}$ 。狭缝宽度 $\text{ex} = 10 \text{ nm}$, $\text{em} = 5 \text{ nm}$ 。

1.4.2 培养基胆固醇检测 用氯仿-甲醇方法反复提取培养基脂质。提取出的胆固醇溶于 100 μL 无水乙醇中, 用于游离胆固醇和总胆固醇检测。检测方法同细胞胆固醇检测。

1.5 胞液钙浓度检测^[5]

收集巨噬泡沫细胞, 用含 1 μmol Fura2/AM 的负载液负载, 负载后调节细胞密度达 $2 \times 10^9/\text{L}$, 分成 1 mL 一份的待测样品, 4℃ 保存。样品测定前再用 BSS 洗脱细胞外 Fura2。用荧光分光光度计测细胞内钙。 $\text{ex} = 340 \text{ nm}$, $\text{em} = 510 \text{ nm}$ 。然后按照文献[5] 钙离子浓度计算方法计算细胞内钙值。

1.6 统计学分析

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS8.0 统计软件处理。其中细胞胆固醇外流检测用 One-way ANOVA, LPC 剂量与引起的胆固醇外流效应之间的剂量-效应关系检测用 Spearman 相关性检验, 胞内钙浓度检测用配对 t 检验。

2 结果

2.1 溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流

从表 1(Table 1) 可见, 不同剂量溶血卵磷脂引起的胆固醇外流均高于空白对照组($P < 0.01$)。且溶血卵磷脂剂量增加与促进胆固醇外流效应间呈剂量-效应关系(Spearman 相关性检验, $r = 0.732$, $P = 0.001$)。

表 1. 溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of LPC on cholesterol efflux from macrophage foam cells (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

Groups	<i>n</i>	Medium free cholesterol
Control	3	0.623 \pm 0.031
10 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	1.077 \pm 0.064 ^a
20 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	1.690 \pm 0.161 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	2.287 \pm 0.035 ^a
80 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	2.480 \pm 0.105 ^a

a: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 EGTA 和 H_7 对溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响

从表 2(Table 2) 可见, EGTA 组与空白对照相比较, 胆固醇外流未增加($P > 0.05$), 提示 1 mmol/L EGTA 本身对巨噬泡沫细胞胆固醇外流没有影响。40 $\mu\text{mol/L}$ 溶血卵磷脂加 1 mmol/L EGTA 组与 40 $\mu\text{mol/L}$ 溶血卵磷脂组比较, 前者培养基中胆固醇含

量显著低于后者($P < 0.05$)。而且 40 $\mu\text{mol/L}$ 溶血卵磷脂加 1 mmol/L EGTA 组与空白对照组比较也无显著性差异($P > 0.05$)。

表 2. EGTA 对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 2. Effect of EGTA on cholesterol efflux from macrophage foam cells(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Medium free cholesterol
Control	3	0.623 \pm 0.031
40 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	2.287 \pm 0.035 ^a
1 mmol/L EGTA	3	0.543 \pm 0.121
40 $\mu\text{mol/L}$ LPC + 1 mmol/L EGTA	3	0.795 \pm 0.134

a: $P < 0.05$, compared with control group.

H₇ 处理组与单纯 40 $\mu\text{mol/L}$ 溶血卵磷脂处理组比较,胆固醇外流明显降低($P < 0.05$),说明 H₇ 能明显抑制由 40 $\mu\text{mol/L}$ 溶血卵磷脂引起的细胞胆固醇外流增加。细胞经 H₇ 处理后溶血卵磷脂引起胆固醇外流与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 3, Table 3)。

表 3. H₇ 对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 3. Effect of H₇ on cholesterol efflux promoted by LPC (mg/L, $\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Medium free cholesterol
Control	3	0.623 \pm 0.031
40 $\mu\text{mol/L}$ LPC	3	2.287 \pm 0.035 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$ LPC+ H ₇	3	0.817 \pm 0.149

a: $P < 0.05$, compared with control group or 40 $\mu\text{mol/L}$ LPC+ H₇ group.

2.3 溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胞内钙离子浓度的影响及 EGTA 对该作用的影响

从表 4(Table 4) 可见,溶血卵磷脂能引起巨噬泡沫细胞胞内钙离子浓度升高($P < 0.01$)。而且,溶血卵磷脂剂量与细胞内钙浓度增加呈明显剂量-效应关系(Spearman 相关性检验, $r = 0.874$, $P < 0.01$)。而细胞先用 1 mmol/L EGTA 处理再用不同剂量溶血卵磷脂处理前后,细胞内钙浓度无显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨 论

巨噬细胞内胆固醇稳态涉及两方面,即胆固醇内流和胆固醇外流。在动脉粥样硬化形成和发展过程中,巨噬细胞摄入胆固醇过多或胆固醇外流过少,均

可引起细胞内过量脂质聚集而转变为巨噬泡沫细胞
表 4. 溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胞内钙浓度影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4. Effect of LPC on intracellular calcium of macrophage foam cells(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

LPC Dose	n	Before treat	During treat
20 $\mu\text{mol/L}$	4	525.5 \pm 14.9	940.0 \pm 14.0 ^a
40 $\mu\text{mol/L}$	4	561.6 \pm 23.5	1219.5 \pm 118.3 ^a
60 $\mu\text{mol/L}$	4	528.0 \pm 16.5	1302.0 \pm 133.7 ^a
80 $\mu\text{mol/L}$	4	533.7 \pm 24.9	2116.8 \pm 429.1 ^a

a: $P < 0.01$, compared with before treat.

胞,这在动脉粥样硬化形成中是关键步骤^[6]。近年来研究认为高密度脂蛋白具有重要的抗动脉粥样硬化作用,由高密度脂蛋白介导的胆固醇逆转运可以有效地将胆固醇由外周细胞转运到肝脏进行代谢,其中胆固醇逆转运的首要步骤是胆固醇由外周细胞流出^[7]。由此可见,胆固醇在细胞内过度聚集之后,外界因素是否能够使过量胆固醇流出细胞决定了泡沫细胞的形成和转归,也进一步提示这一因素在动脉粥样硬化形成与发展中所起的作用。Hara 等^[8]于 1997 年首次发现溶血卵磷脂能够促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流,本实验研究结果也证实了在一定剂量范围内溶血卵磷脂可以引起巨噬泡沫细胞胆固醇外流,且溶血卵磷脂剂量与胆固醇外流效应之间呈剂量-效应关系。虽然溶血卵磷脂能够促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流,但是溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流的机制至今仍不清楚。

近年来研究发现钙离子第二信使及其信使通路在调节细胞生理功能方面具有重要作用,发现它也参与细胞内脂质代谢。细胞内钙离子浓度升高来源于两方面,即胞外钙离子内流增加和胞内钙库(内质网、肌浆网)释放,胞内钙库释放可使胞内钙离子浓度快速升高,而胞外钙内流则使细胞内钙持续缓慢升高。本研究发现溶血卵磷脂不仅能促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流,而且可引起巨噬泡沫细胞胞内钙离子浓度持续缓慢升高^[9]。为了观察溶血卵磷脂引起的这两种效应之间是否有关联,本研究进一步用胞外钙离子螯合剂螯合细胞外钙后,再检测溶血卵磷脂对细胞内钙和胆固醇外流的影响,发现溶血卵磷脂不再引起胞内钙离子浓度升高,而且细胞胆固醇外流现象也随之消失,说明溶血卵磷脂促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流效应是通过钙离子这一第二信使所介导的。这一现象与最近 Takahashi 等^[10]研究发现的由载脂蛋白 A_{iv}引起的细胞胆固醇外流依赖于细胞外钙离子内流的结果极为相似。胞内钙升高以后可以通过几条信

使通路传递信号,本研究探讨了钙离子-蛋白激酶 C 信使通路在溶血卵磷脂促进胆固醇外流效应中所起的作用。研究进一步发现当用蛋白激酶 C 特异性抑制剂抑制蛋白激酶 C 活性后,溶血卵磷脂也同样不能促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流。结合本研究的结果,可以得出结论,溶血卵磷脂能够促进巨噬泡沫细胞胆固醇外流,且这一外流效应是通过钙离子-蛋白激酶 C 信使通路进行调节的。

有关溶血卵磷脂在动脉粥样硬化形成中所起作用的研究尚不深入。国外研究表明,溶血卵磷脂在动脉粥样硬化形成和发展中具有某些拮抗作用。溶血卵磷脂能促进血管内皮细胞 NOS、PGH₂ 以及 COX-2 的合成及分泌^[11~13],这几种物质都可以促进血管舒张,这无疑是抗动脉粥样硬化作用。溶血卵磷脂能够通过信号通路调节细胞胆固醇外流,对于拮抗动脉粥样硬化新药的研究开发以及动脉粥样硬化防治研究都提供了理论依据。有关外流胆固醇的转归及动物模型的建立与研究,将是以后研究的一个重要方向,还有待于科研工作者不断的努力与探索。

参考文献

- [1] 王克勤,何锦麟. 一次性密度梯度超速离心分离人血清 VLDL、LDL、HDL、HDL₃ 及无脂血清 [J]. 生物化学杂志, 1986, 2(1): 15- 22
- [2] Basu SK, Goldstein J, Anderson RSW, et al. Degradation of catonized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterol lemia fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad USA*, 1976, 73: 3 178- 182
- [3] 沈德钧,吴伟. 中国地鼠卵巢细胞和巨噬细胞培养 [M]. 见:汪谦,现代医学实验方法. 北京:人民卫生出版社,1997; 174- 175
- [4] 刘国庆,宋武. 培养细胞微量胆固醇及其酯的酶-荧光检测法 [J]. 中国病理生理杂志, 1987, 3(3): 185- 187
- [5] Chen Y, Morimoto S, Kitano S, et al. Lysophosphatidylcholine causes Ca²⁺ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 112: 69- 76
- [6] Jochen K, Christa B, Evelyn O, et al. ABCG1(ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 817- 822
- [7] Eder CR, Quintao. Is reverse cholesterol transport a misnomer for suggesting its role in the prevention of atheroma formation [J]? *Atherosclerosis*, 1995, 116: 1- 14
- [8] Hara S, Shike T, Takasu N, et al. Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells [J]. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(7): 1 258- 266
- [9] 孙大业,郭艳林. 细胞信号系统 [M]. 北京:科学出版社, 1993; 156- 160
- [10] Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein A_{iv} involves endocytosis and resecretion in a calcium- dependent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11 358- 363
- [11] Hirata K, Miki N, Kuroda Y. Low concentration of oxidized low- density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase Mrna expression in bovine aortic endothelial cells [J]. *Circ Res*, 1995, 76: 958- 962
- [12] Zembowicz A, Tand J, Wu KK. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type by lysophosphatidylcholine [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 170 006- 010
- [13] Zembowicz A, Jones SL, Wu KK. Induction of cyclooxygenase- 2 in human umbilical vein endothelial cells by lysophosphatidylcholine [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 1 688- 692

(此文 2000- 11- 20 收到, 2001- 05- 07 修回)

(此文编辑 朱雯霞)