

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2003)11-02-0114-04

氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响及可能机制

艾宝民, 夏敏, 唐志红, 凌文华

(中山大学公共卫生学院, 广东省广州市 510089)

[关键词] 病理生理学; 氧化型低密度脂蛋白对巨噬细胞蓄积胆固醇的影响; 荧光分光光度法; 小鼠腹腔巨噬细胞; 溶酶体; 胆固醇; 组织蛋白酶

[摘要] 研究氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响, 并探讨其与组织蛋白酶活性之间的关系。用 100 mg/L 的乙酰化低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白处理小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 分别测定巨噬细胞胞浆和溶酶体中胆固醇的含量以及溶酶体中组织蛋白酶的活性。结果发现, 乙酰化低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白均可引起细胞胆固醇含量增加(分别为 $22.2 \pm 0.4 \mu\text{g}$ 和 $22.55 \pm 0.15 \mu\text{g}$ 比对照组的 $7.0 \pm 0.4 \mu\text{g}$, $P < 0.01$), 但蓄积部位和形式完全不同, 前者蓄积部位主要在胞浆并以胆固醇酯为主(胞浆与溶酶体分别为 $18.9 \pm 0.4 \mu\text{g}$ 和 $3.3 \pm 0.2 \mu\text{g}$, 游离胆固醇与胆固醇酯分别为 $0.73 \pm 0.05 \mu\text{g}$ 和 $18.1 \pm 0.4 \mu\text{g}$), 后者主要在溶酶体并以游离胆固醇为主(胞浆与溶酶体分别为 $3.65 \pm 0.14 \mu\text{g}$ 和 $18.90 \pm 0.15 \mu\text{g}$, 游离胆固醇与胆固醇酯分别为 $14.13 \pm 0.14 \mu\text{g}$ 和 $4.77 \pm 0.33 \mu\text{g}$); 前者不引起溶酶体组织蛋白酶的活性改变和蛋白含量增加(组织蛋白酶 L 和 D 分别为 99.5 ± 3.4 和 28.0 ± 2.4 , 对照组分别为 102.3 ± 8.2 和 27.3 ± 1.6 , $P > 0.05$; 蛋白含量为 $8.8 \pm 0.4 \mu\text{g}$, 对照组为 $9.0 \pm 0.3 \mu\text{g}$, $P > 0.05$); 后者则造成溶酶体组织蛋白酶活性的明显降低和蛋白蓄积(组织蛋白酶 L 和 D 分别为 11.1 ± 2.3 和 2.1 ± 0.5 , 与对照组比较, $P < 0.01$; 蛋白含量为 $17.93 \pm 1.66 \mu\text{g}$, 与对照组比较, $P < 0.01$), 各组溶酶体内组织蛋白酶活性与胆固醇含量之间呈显著性负相关(r 为 0.683, $P < 0.01$)。由此推测, 氧化型低密度脂蛋白引起小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇的蓄积可能与其抑制巨噬细胞溶酶体中的组织蛋白酶活性有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on Cholesterol Accumulation in Mouse Peritoneal Macrophages and its possible mechanism

AI Bao-Min, XIA Min, TANG Zhi-Hong, and LING Wen-Hua

(School of Public Health, Zhongshan University, Guangzhou 510089, China)

[KEY WORDS] Lipoprotein, LDL, Oxidized; Mouse Peritoneal Macrophages; Lysosome; Cholesterol; Cathepsin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on cholesterol accumulation in mouse peritoneal macrophages and its relationship with activity of lysosomal cathepsin. **Methods** Low density lipoprotein (LDL), acetylated LDL (ac-LDL) and oxidized LDL (ox-LDL) were prepared and treated the macrophages in the same way. Lysosome and cytoplasm were acquired from the treated macrophages and the contents of total protein, cholesterol and the activities of lysosomal cathepsin L and D were determined. **Results** Compared to control, both treatment of ac-LDL and ox-LDL significantly increased the cholesterol level in macrophages ($22.2 \pm 0.4 \mu\text{g}$ and $22.55 \pm 0.15 \mu\text{g}$ to control $7.0 \pm 0.4 \mu\text{g}$, $P < 0.01$), however, ox-LDL and ac-LDL resulted in cholesterol accumulation in different manner. The ac-LDL caused cholesterol ester (CE) accumulation predominating in cytoplasm ($18.9 \pm 0.4 \mu\text{g}$ and $3.33 \pm 0.20 \mu\text{g}$ respective in cytoplasm and lysosome, $0.73 \pm 0.05 \mu\text{g}$ and $18.1 \pm 0.4 \mu\text{g}$ respective in FC and CE form), while ox-LDL leaded free cholesterol (FC) accumulation preferring in lysosome of macrophages ($3.65 \pm 0.14 \mu\text{g}$ and $18.90 \pm 0.15 \mu\text{g}$ respective in cytoplasm and lysosome, $14.13 \pm 0.14 \mu\text{g}$ and $4.77 \pm 0.33 \mu\text{g}$ respective in FC and CE form) and simultaneously we found that ox-LDL markedly inhibited the activities of cathepsin L and D (in the unit of a. u./mg pro, 11.1 ± 2.3 and 2.1 ± 0.5 to control 102.3 ± 8.2 and 27.33 ± 1.6 , $P < 0.01$); and gave rise to the content of total protein in lysosome. **Conclusion** Oxidized LDL cause the cholesterol accumulation in lysosome mainly in free manner and this effect may be related to its effect of inhibiting the activities of cathepsin L and D.

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)经氧化修饰所产生的氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL,

[收稿日期] 2003-01-06 [修回日期] 2003-03-19

[基金项目] 国家杰出青年基金项目(30025037)资助, 申请人: 凌文华

[作者简介] 艾宝民, 男, 1962 年出生, 河北省唐山市人, 讲师, 博士、博士后, 中山大学公共卫生学院预防医学系, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与营养预防。联系电话为 020-87330601; E-mail 为 abmdad@gzsums.edu.cn。唐志红, 女, 1968 年出生, 江西省南昌市人, 技师, 中山大学公共卫生学院营养系。凌文华, 男, 1955 年出生, 安徽省合肥市人, 教授, 博士研究生导师与博士后合作导师, 留学归国人员, 中山大学公共卫生学院院长。研究方向为动脉粥样硬化发病机制与营养预防。

ox-LDL) 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生中起重要作用。ox-LDL 能够被巨噬细胞清道夫受体识别并结合进入细胞, 导致负载有大量脂质的泡沫细胞形成。ox-LDL 所致的泡沫细胞形成是一个涉及受体识别、结合、摄取、胞内转运及代谢, 特别是溶酶体内代谢等多环节的复杂过程。其中 ox-LDL 在溶酶体内的代谢过程, 对于泡沫细胞是否形成起着至关重要的作用。阐明 ox-LDL 对巨噬细胞溶酶体胆固醇蓄积的影响以及其可能机制, 对于解释 ox-LDL 所致泡沫细胞的形成和其在 As 发生中的作用, 具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性昆明种小鼠, 体重 22.4 ± 1.5 g, 购自中山大学实验动物中心。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养^[1]

小鼠断髓处死后, 75% 酒精浸泡 5 min。10 mmol/L PBS 2 mL 反复冲洗腹腔 ($\times 3$), 将冲洗液并入洁净无菌离心管中, 在 4℃ 用 2 000 r/min 离心 10 min。收集的沉淀细胞用 1.5 mL/只 DMEM (含 100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 悬浮, 合并所有细胞悬液, 分别进行细胞计数和台盼蓝染色, 检测细胞存活率大于 95%, 细胞计数大于 2×10^9 /L。将细胞悬液稀释成 2×10^9 /L, 按 2.5 mL/孔, 接种到六孔板内, 置于 CO₂ 培养箱中 (37℃、5% CO₂), 培养使其贴壁。2 h 后, 洗去未贴壁细胞和组织碎片 (10 mmol/L PBS $\times 2$, DMEM $\times 1$, 37℃)。每孔再加入 2.5 mL 含 10% FCS 的 DMEM 继续培养。

1.3 低密度脂蛋白的分离、氧化和乙酰化修饰及鉴定^[2-4]

1.3.1 低密度脂蛋白的分离和提纯 取健康人血浆 50 mL (购自广州市中心血站), 先用聚乙二醇浓缩至 32 mL, 再用固体 NaBr 调节密度达 1.200。在容量为 11 mL 的离心管中, 分别铺入密度为 1.200 的血浆 4 mL, 密度为 1.063 的密度液 3 mL, 密度为 1.020 的密度液 4 mL。在 4℃、50 000 r/min 离心 5 h。吸取密度在 1.020~1.063 之间的淡黄色物质即为所需 LDL。将制备的 LDL 用透析液 (配方为 20 mmol/L Tris-HCl, 0.85% NaCl, 0.01% EDTA, 15 mmol/L NaN₃, pH 7.6) 在 4℃ 下透析 24 h, 然后除菌、密封、4℃ 避光保存。

1.3.2 低密度脂蛋白的氧化修饰 用 PBS 调节 LDL 蛋白浓度至 0.5~1.0 g/L 后, 用无 EDTA 的 PBS

透析 24 h。在 5 μ mol/L CuSO₄ 条件下氧化 24 h, 加入 10 μ mol/L EDTA 终止氧化。肉眼可见淡黄色已变成乳白色, 测得硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 值由 1.369 变为 6.528, 表明 LDL 已变成 ox-LDL。将制备的 ox-LDL 用含 200 μ mol/L 的 PBS 在室温下透析 24 h, 除菌, 4℃ 避光保存。

1.3.3 低密度脂蛋白的乙酰化修饰 按 16 mg LDL 蛋白对应 1 mL 0.15 mol/L NaCl 的比例, 加入 NaCl, 再加入 1 mL 饱和 NaAc, 于冰浴中不断搅拌; 再以小液滴的形式 (2 μ L/滴) 将醋酸酐加入冰浴下不断搅拌的 LDL 中, 加入总量为 LDL 蛋白量的 1.5 倍, 1 h 内全量加入, 加入后混合液继续搅拌 30 min。在 4℃ 下透析 24 h (透析液配方为 0.15 mol/L NaCl, 0.3 mol/L EDTA, pH 7.4), 测得 TBARS 值为 1.415, 琼脂糖凝胶电泳测得相对迁移率 (relative electrophoretic mobility, REM) 由 1 变为 2.0。表明 LDL 已变成乙酰化 LDL (acetylated LDL, ac-LDL)。

1.4 实验分组及处理

将小鼠腹腔巨噬细胞 (mouse peritoneal macrophages, MPM) 分为 3 组: 正常对照组 (control group), 给予 100 mg/L LDL; ac-LDL 处理组 (ac-LDL group) 给予 100 mg/L ac-LDL; ox-LDL 处理组 (ox-LDL group) 给予 100 mg/L ox-LDL。培养 24 h 后, 收获细胞, 制备溶酶体和胞浆组分。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体和胞浆组分的制备及完整性的评价

1.5.1 溶酶体和胞浆组分的制备 根据文献 [5, 6] 的方法, 先用 37℃ PBS 冲洗 ($\times 3$), 收获细胞, 用 2 mL/孔匀浆缓冲液 (配方如下: 250 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) 悬浮。超声破碎, 功率 20 W, 20 s $\times 2$, Teflon/glass 匀浆器匀浆 (15 次)。匀浆液在 4℃ 用 500 g 离心 10 min, 去除细胞碎片; 上清液再在 4℃ 用 10 000 g 离心 45 min, 上清即为胞浆组分, 沉淀即为富含溶酶体组分。溶酶体沉淀用 10 mmol/L 醋酸纳 (pH 5.2) 悬浮。为了检查超声破碎和匀浆效果, 需对匀浆液进行显微镜涂片观察, 如有完整细胞核而无完整细胞则细胞破碎效果理想。

1.5.2 溶酶体完整性的评价^[6, 7] 测定溶酶体和胞浆组分 β -N-乙酰氨基己糖苷酶 (β -N-acetyl-beta-glucosaminidase, NAG) 的活性, 以 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside 为底物, 4-methylumbelliferone 为标准品, PBS 作空白, 在激发波长 360 nm、发射波长 450 nm 和狭缝宽度 5 nm 条件下, 荧光分光光度法测定反应产物的荧光强度。酶活性用

kau/g 蛋白表示。并以公式 $A = [1 - (\text{Free}/\text{Total})] \times 100$ 来评价溶酶体的完整性。Free: 上清中 NAG 活性; Total: 上清+沉淀中 NAG 活性。A 值越高, 表示溶酶体完整性越好。本研究中所制备溶酶体, 经数次评价, 完整性在 95% 以上。

1.6 溶酶体和胞浆组分胆固醇含量的测定^[8,9]

1.6.1 脂质抽提 取溶酶体悬浮液或胞浆组分, 用甲醇/氯仿法抽提脂质, 用无水乙醇作为溶剂, 用作游离胆固醇(free cholesterol, FC)和总胆固醇(total cholesterol, TC)的测定。

1.6.2 游离胆固醇和总胆固醇含量的检测 采用酶法测定 FC 和 TC。将 0.1 mL 样品加入到 0.9 mL 胆固醇的分析液中, 在 37℃ 孵育 1 h 后, 于荧光分光光度计测定样品和空白的荧光强度, 测定荧光强度的激发波长为 325 nm, 发射波长为 410 nm。狭缝宽度激发波长为 10 nm, 发射波长 5 nm。胆固醇酯(cholesterol ester, CE)是以 TC 含量与 FC 含量的差值来表示。

1.7 溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 活性的测定

1.7.1 溶酶体组织蛋白酶 L 活性测定 采用荧光法^[10]来测定组织蛋白酶 L。在 pH 5.5 条件下, 以 CBZ-Phe-Arg-Nmec 为底物, aminomethylcoumarin 为标准, 以先加入终止反应液的样品为空白, 聚苯乙烯试管中进行酶促反应过程, 在激发波长为 370 nm, 发射波长为 440 nm, 狭缝 5 nm 状态下测定反应产物的荧光强度。酶活性用 kau/g 蛋白表示。

1.7.2 溶酶体组织蛋白酶 D 活性测定 采用¹²⁵I 标记的放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)法^[11]来

测定血管紧张素 iv 的生成。溶酶体组织蛋白酶 D 可催化血管紧张素原(肾素底物)降解产生血管紧张素 iv。每个样品需同时测定样品和试剂(TDP)空白, 沸水浴 10 min 终止反应, 冷却至室温后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清用于血管紧张素 iv 测定(¹²⁵I RIA 法)。关键试剂有二: 一是含有溶菌酶的 0.5% 的 50 mmol/L 柠檬酸钠(pH 4.5), 溶菌酶须临用时添加; 二是肾素底物, 为用缓冲液配成 0.5 μmol/L 应用液。酶活性表示方法同前。

1.8 数据处理与统计分析

用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 不同组之间显著性检验采用单因素方差分析。统计检验界值为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 乙酰化 LDL 和氧化型 LDL 对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响

正常情况下, MPM 内胆固醇的水平较低, 胞浆中的胆固醇主要是以 CE 形式存在, 而溶酶体内的胆固醇主要是以 FC 形式存在。ac-LDL 和 ox-LDL 均可引起 MPM 中 TC 的含量增加, 即胆固醇在巨噬细胞中蓄积增加, 但两者引起胆固醇蓄积的部位和类型有所不同。ac-LDL 引起巨噬细胞胆固醇的蓄积主要是以 CE 形式存在于胞浆中; 而 ox-LDL 造成巨噬细胞胆固醇的蓄积主要以 FC 的形式存在于溶酶体内(表 1, Table 1)。

表 1. 乙酰化 LDL 和氧化型 LDL 对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响($\bar{x} \pm s$, μg, $n = 3$)

Table 1. Effect of ac-LDL and ox-LDL on cholesterol accumulation in MPM cells

分 组	胞 浆			溶 酶 体			合 计
	FC	CE	合计	FC	CE	合计	
对照组	0.85 ± 0.09	2.80 ± 0.25	3.65 ± 0.17	2.72 ± 0.43	0.64 ± 0.18	3.36 ± 0.37	7.01 ± 0.43
乙酰化 LDL	0.73 ± 0.05	18.1 ± 0.4 ^{ab}	18.9 ± 0.4 ^{ab}	2.67 ± 0.20 ^b	0.56 ± 0.21	3.33 ± 0.20 ^b	22.2 ± 0.4 ^a
氧化型 LDL	0.89 ± 0.12	2.76 ± 0.19	3.65 ± 0.14	14.13 ± 0.14 ^a	4.77 ± 0.33	18.90 ± 0.15 ^a	22.55 ± 0.15 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较, b: $P < 0.01$ 与氧化型 LDL 组比较。

2.2 乙酰化 LDL 和氧化型 LDL 对巨噬细胞溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 活性的影响

小鼠腹腔巨噬细胞(MPM)经 ac-LDL 和 ox-LDL 处理后发现, 与对照组比较, ac-LDL 对溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 的活性无明显影响($P > 0.05$)。与对照组和 ac-LDL 组相比, ox-LDL 组溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 显著下降($P < 0.01$), 说明 ox-LDL 对溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 具有明显的抑制作用, 同时溶酶体

中总蛋白的含量也升高($P < 0.01$) (表 2, Table 2)。巨噬细胞溶酶体组织蛋白酶 L 和 D 活性与巨噬细胞胆固醇的含量蓄积呈显著性负相关($r = -0.683$, $P < 0.01$)。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)是一个复杂的多诱因的病理过程, 其发病机制至今尚未完全明确。现在认为, As

表 2. 乙酰化 LDL 和氧化型 LDL 对小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体中组织蛋白酶活性和总蛋白含量的影响

Table 2. Effect of ox-LDL and ac-LDL on lysosomal cathepsin activity and total protein content ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	组织蛋白酶 L (kau/g)	组织蛋白酶 D (kau/g)	总蛋白 (μ g)
对照组	102.3 \pm 8.2	27.3 \pm 1.6	9.0 \pm 0.3
乙酰化 LDL	99.5 \pm 3.4 ^b	28.0 \pm 2.4 ^b	8.8 \pm 0.4 ^b
氧化型 LDL	11.1 \pm 2.3 ^a	2.1 \pm 0.5 ^a	17.9 \pm 1.7 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较, b: $P < 0.01$, 与氧化型 LDL 组比较。

发病的一个重要环节就是泡沫细胞形成。泡沫细胞是以细胞内沉积大量脂质为主要特征, 以胆固醇及其酯为主的脂类沉积。随着 As 病变进展到不同阶段, 脂类沉积部位和蓄积模式的表现出差异。病变早期, 以胆固醇酯(cholesterol ester, CE)为主的脂类主要以包涵体的形式存在于胞浆中, 随着病变的进展, 大量脂质出现于增大、肿胀的溶酶体内。溶酶体内脂质除了 CE 蓄积外, 在脂质条纹期向斑块期的演变阶段, FC 的含量也不断增加^[12, 13]。实验发现, ac-LDL 和 ox-LDL 均能促进胆固醇在 MPM 的蓄积, 但两者所引起胆固醇的蓄积在部位和类型上存在差异, ac-LDL 主要以 CE 形式在胞浆中蓄积, 而 ox-LDL 则主要以 FC 形式在溶酶体中蓄积。

本研究还发现, 以浓度为 100 mg/L 的 ac-LDL 与 MPM 培养 24 h 后, 巨噬细胞溶酶体中的组织蛋白酶 L 和 D 活性并无明显改变; 而以浓度为 100 mg/L 的 ox-LDL 与 MPM 培养 24 h 后, 可使巨噬细胞溶酶体中的组织蛋白酶 L 和 D 活性明显降低, 并造成细胞内总蛋白的含量明显增加, 说明 ox-LDL 对溶酶体组织蛋白酶活性有直接抑制作用, 蛋白酶对 ox-LDL 的降解减少, 蛋白质在溶酶体中蓄积增加。与 ac-LDL 相比, 经 ox-LDL 处理过的 MPM 中 FC 的蓄积明显增加 ($P < 0.01$)。相关分析发现, 两者之间存在明显负相关 ($r = -0.683$, $P < 0.01$)。这一结果提示 ox-LDL 可能是通过抑制溶酶体组织蛋白酶活性, 使得 ox-LDL 中的蛋白组分降解受阻, 从而促进胆固醇在细胞中的蓄积。

正常情况下, LDL 中载脂蛋白是在溶酶体中经组织蛋白酶作用而降解的。已有研究发现, ac-LDL 能够造成 CE 在细胞内蓄积, 但其在载脂蛋白的降解过程并未受到影响。体外实验发现, ox-LDL 载脂蛋白的降解过程受到抑制。一般认为, ox-LDL 在细胞内的降解受到抑制, 一方面可能是受到蛋白酶的底

物 ox-LDL 特性的影响, 即 ox-LDL 代谢酶对其底物 ox-LDL 的敏感性降低, 因此不易被降解; 另一方面可能是受到 ox-LDL 代谢酶活性的影响, 即 ox-LDL 抑制了组织蛋白酶的活性。本次研究发现 ox-LDL 能够抑制巨噬细胞溶酶体组织蛋白酶的活性, 这可能是由于 LDL 经氧化修饰后生成的 ox-LDL 中含有醛化合物, 它可以共价结合邻近蛋白的巯基基团, 如溶酶体中的组织蛋白酶, 结果造成蛋白质的交联和酶活性降低或失活, 从而使组织蛋白酶对 ox-LDL 中的载脂蛋白降解减少^[14, 15]。

至于 ox-LDL 抑制组织蛋白酶的活性是否会直接引起胆固醇在细胞内的蓄积, 还有待于进一步的研究和探讨。

[参考文献]

- [1] Gelissen IC, Bromm AJ, Mander EL. Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, 1996, **27** (30): 17 852-860
- [2] Wang X, Greilberger J, Ledinski G. Binding and uptake of differently oxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages and THP-1 macrophages: involvement of negative charges as well as oxidation-specific epitopes. *J cell Biochem*, 2001, **81** (3): 557-569
- [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** (3): 169-171
- [4] Loughheed M, Moore ED, Scriven DR. Uptake of oxidized LDL by macrophages differs from that of acetylated and leads to expansion of an acidic endolysosomal compartment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (8): 1 881-890
- [5] Jerome WG, Lewis JC. Cellular dynamics in early atherosclerotic lesion progression in White Carneau pigeons. Spatial and temporal analysis of monocytes and smooth muscle invasion of the intima. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (4): 654-664
- [6] Maor I, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J Lipid Res*, 1994, **35** (5): 803-819
- [7] Leaback DH, Walker PG. The fluorometric assay of N-acetyl- β -glucosaminidase. *Biochem J*, 1961, **78**: 151-156
- [8] Gamble W, Vanghan M, Kruth HS. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells. *J Lipid Res*, 1978, **19** (8): 1 068-070
- [9] 刘国庆, 宋武. 培养细胞微量胆固醇的酶-荧光检测法. 中国病理生理杂志, 1987, **3** (3): 185-187
- [10] Barrett AJ, Kische H. Cathepsin B, Cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymol*, 1981, **80** (Pt C): 535-561
- [11] Takahashi T, Tang J. Cathepsin D from porcine and bovine spleen. *Methods Enzymol*, 1981, **80** (Pt C): 565-581
- [12] Jerome WG, Lewis JC. Early atherogenesis in White Carneau pigeons. ④ Ultrastructural and cytochemical observations. *Am J Pathol*, 1985, **119** (2): 210-222
- [13] Small DM. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis*, 1988, **8** (2): 103-129
- [14] O'Neil J, Hoppe G, Sayre LM. Inactivation of cathepsin B by oxidized LDL involves complex formation induced by binding of putative reactive sites exposed at low pH to thiols on the enzyme. *Free Radic Biol Med*, 1997, **23** (2): 215-225
- [15] Loughheed M, Zhang HF, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages. *J Biol Chem*, 1991, **266** (22): 14 519-525

(此文编辑 胡必利)