

低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对 HepG2 细胞肝脂酶活性及肝脂酶 mRNA 表达的影响

张晓刚, 陈运贞

(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 细胞生物学; 低密度脂蛋白对肝脂酶的作用; 逆转录聚合酶链反应; 低密度脂蛋白; 氧化型低密度脂蛋白; 人肝癌细胞株; 吸光度

[摘要] 为观察低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对肝脂酶合成和肝脂酶活性的影响, 将不同浓度的低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白与人肝癌细胞株 HepG2 细胞共同培养, 用 MTT 法测定细胞增殖抑制率, 用组织化学法测定细胞肝脂酶活性, 用逆转录聚合酶链反应测定细胞肝脂酶 mRNA 的表达水平。结果发现, 低密度脂蛋白浓度在 27.47、54.95 mg/L 时 HepG2 细胞逆转录聚合酶链反应产物的吸光度值分别是细胞对照的 2.8 倍和 2.3 倍, 浓度在 109.89 mg/L 时逆转录聚合酶链反应产物的吸光度值与细胞对照比较降低 20%。细胞肝脂酶活性随低密度脂蛋白浓度增加而降低, 两者呈负相关($r = -0.95614$, $P < 0.05$); 低密度脂蛋白浓度在 54.95 mg/L 时开始产生细胞增殖抑制作用, 其细胞增殖抑制率与低密度脂蛋白浓度呈正相关($r = 0.91199$, $P < 0.05$)。不同浓度的氧化型低密度脂蛋白处理 HepG2 细胞其肝脂酶 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物的吸光度值均低于细胞对照孔; 脂蛋白浓度为 27.47、54.95 及 109.89 mg/L 时低密度脂蛋白组细胞肝脂酶活性是氧化型低密度脂蛋白组的 3~4 倍; 浓度在 54.95 mg/L 时氧化型低密度脂蛋白对细胞的增殖抑制作用是低密度脂蛋白的 2 倍。结果提示, 低密度脂蛋白在一定浓度范围能诱导 HepG2 细胞肝脂酶 mRNA 表达上调; 高浓度低密度脂蛋白及各种浓度氧化型低密度脂蛋白均表现抑制 HepG2 细胞肝脂酶活性及肝脂酶 mRNA 表达。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effect of Low Density Lipoprotein and Oxidized Low Density Lipoprotein on Activity and mRNA Expression of Hepatic Lipase in HepG2 Cells

ZHANG Xiao-Gang, and CHEN Yun-Zhen

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Low Density Lipoprotein; Oxidized Low Density Lipoprotein; HepG2 Cells; Absorbance; MTT Assay; Histochemically assay

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of LDL and ox-LDL on the activity and mRNA expression of hepatic lipase (HL) in HepG2 cells. **Methods** Gradient concentrations (1.7~1758 mg/L) of LDL or ox-LDL was added into the medium and coincubated with HepG2 cell. The cytostasis rate of HepG2 cell was estimated by MTT and the activity and mRNA expression of HL in these cells were measured with cytochemistry and RT-PCR respectively. **Results** In the 27.47 mg/L and 54.95 mg/L LDL groups, the mRNA expression of HL was up-regulating 2.8 times and 2.3 times respectively to the cell control. In the 109.8 mg/L LDL, the mRNA expression of HL decreased 20% to the cell control. The HL activity in HepG2 cells incubated with LDL was negative related with the LDL concentration ($r = -0.95614$, $P < 0.05$). The cytostasis rate in LDL increased by dose-dependent model ($r = 0.91199$, $P < 0.05$). In the ox-LDL group, the mRNA expression of HL was inhibited at all concentrations. In 27.47 mg/L and 54.95 mg/L ox-LDL, the activity of HL was 3~4 times as much as that of LDL groups. Moreover, at the same concentration of 54.95 mg/L, the cytostasis rate in the ox-LDL group was one time higher than in the LDL group. **Conclusions** At the appropriate range of concentration, LDL can induce the up-regulation of mRNA expression of HL. High concentration of LDL and all concentration of ox-LDL can inhibit not only mRNA expression but the activity of HL in HepG2 cells.

肝脂酶(lipoprotein lipase, HL)由肝细胞合成, 具

有多种脂酶活性, 能分解甘油三酯、磷脂等。肝细胞膜上的肝脂酶还能作为配体参与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)胆固醇的逆转运, 促进低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)及多种脂蛋白残粒的清除^[1]。肝脂酶代谢异常可引起机体脂代谢紊乱^[2]。高分化人肝癌细胞株 HepG2 细胞与肝细胞

[收稿日期] 2002-07-01

[修回日期] 2002-12-19

[作者简介] 张晓刚, 男, 1957 年出生, 重庆市人, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向冠心病和脂代谢。E-mail: zxg0233@sina.com。陈运贞, 女, 教授, 博士研究生导师, 重庆医科大学附属第一医院心血管研究室主任, 中华医学会重庆市分会常务理事, 重庆市心血管专委会主任委员。

一样能合成分泌肝脂酶^[3]。本研究用氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, ox-LDL)和LDL处理HepG2细胞,观察HepG2细胞肝脂酶活性及肝脂酶mRNA表达的变化,探讨ox-LDL、LDL脂毒性对肝细胞肝脂酶合成和活性的影响。

1 材料与方法

1.1 人低密度脂蛋白的提取及氧化型低密度脂蛋白的制备

人LDL提取用改良的张林华等^[4]方法:空腹健康人血浆,用NaBr调制梯密度,4℃超速50 000 r/min离心6 h。取橙黄色LDL($d = 1.05$)带,0.85% NaCl+0.001% EDTA_{Na2}(pH 7.6)溶液4℃透析48 h。氧化酶法测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL cholesterol, LDLC)(Beckman CX-7自动生化分析仪),LDLC占TC的85%以上。0.8%琼脂糖凝胶电泳后考马斯亮兰染色为单一蛋白带。将LDL置于含10 μ mol/L CuSO₄的PBS溶液(pH 7.2)中,37℃温育12 h。氧化后的LDL呈乳白色,在含0.1% EDTA的PBS中透析,4℃24 h。用硫代巴比妥酸反应法测氧化前后丙二醛含量以鉴定LDL的修饰程度,标准品为1,1,3,3,-四乙氧丙烷,紫外分光光度计(Beckmen DU-600型)用532 nm读吸光度值。根据吸光度值计算LDL、ox-LDL的丙二醛含量。用Lowry法,以牛血清白蛋白作标准品测ox-LDL、LDL蛋白含量均为1.758 g/L。0.2 μ m微孔滤膜除菌分装所获ox-LDL、LDL,-20℃储藏备用。

1.2 细胞增殖抑制率测定

生长良好的致密单层HepG2细胞(重庆医科大学肝炎研究所提供),0.25%胰蛋白酶消化,用无血清RPMI-1640培养基洗2次。10%胎牛血清RPMI-1640培养基调细胞浓度为 1×10^7 个/L,200 μ L/孔加入96孔培养板,37℃,5% CO₂,20 h。弃培养基,PBS洗3次,分组加入含不同种类及浓度脂蛋白的无血清RPMI-1640培养基200 μ L/孔。LDL组:加入无血清RPMI-1640培养基,LDL终浓度分别为0、1.72、3.43、6.87、13.74、27.47、54.95、109.89、219.8、439.9、879.1、1758.2 mg/L,每个浓度4个复孔。ox-LDL组:加入无血清RPMI-1640培养基,ox-LDL终浓度同LDL组。37℃、5% CO₂培养8 h,弃培养基,PBS洗3次,加入5 g/L MTT(Fluka产品)20 μ L/孔,37℃、5% CO₂培养4 h。弃MTT液,加入二甲基亚砜(Merck公司产品)150 μ L/孔,震荡10 min,结晶物充分溶解后在酶标仪上测定吸光度值,测定波长为570 nm。

比较各浓度4个平行孔平均吸光度值与细胞对照孔吸光度值的大小,对吸光度值差异有显著性的LDL、ox-LDL浓度,根据以下公式计算细胞增殖抑制率:

细胞增殖抑制率 = (细胞对照孔吸光度值 - 观察浓度孔吸光度值) \div 细胞对照孔吸光度值 $\times 100\%$

1.3 HepG2细胞肝脂酶活性检测

10%胎牛血清RPMI-1640培养基调细胞浓度为 1×10^7 个/L。24孔板每孔中放入盖玻片,加入细胞 1×10^4 个/孔,补10%胎牛血清RPMI-1640培养基2 mL/孔。37℃、5% CO₂培养20 h,弃培养基,PBS洗3次,分组加入含不同种类及浓度脂蛋白的无血清RPMI-1640培养基2 mL/孔。LDL组:加入无血清RPMI-1640培养基,LDL终浓度分别为0、6.87、13.74、27.47、54.95、109.89 mg/L,每个浓度4个复孔。ox-LDL组:加入无血清RPMI-1640培养基,ox-LDL终浓度同LDL组。37℃、5% CO₂培养8 h,弃培养基,PBS洗3次。10%甲醛钙固定10 min,取出长满细胞的盖玻片。用吐温60与细胞一起孵育,37℃孵育12 h,加2%硝酸铅处理10 min,以铅置换钙,经1%硫化铵液作用形成棕色至棕黑色的硫化铅。细胞经核固红复染5 min,常规脱水透明封固。光镜($\times 25$)下每张片取2个视野每种浓度共8个视野,北航CM-2000B生物医学图像分析管理系统分析棕色至棕黑色目标个数/统计场面积,即数密度(N/A)。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测细胞肝脂酶mRNA

10%胎牛血清RPMI-1640培养基调HepG2细胞浓度为 1×10^7 个/L,加入6孔板6 mL/孔,补10%胎牛血清RPMI-1640培养基2 mL/孔。37℃、5% CO₂培养20 h。弃培养基,PBS洗3次,分组加入含不同种类及浓度脂蛋白的无血清RPMI-1640培养基6 mL/孔。LDL组:无血清RPMI-1640培养基中LDL终浓度分别为0、6.87、13.74、27.47、54.95、109.89 mg/L,每个浓度2个复孔。ox-LDL组:无血清RPMI-1640培养基中ox-LDL终浓度同LDL组。37℃、5% CO₂培养8 h,弃培养基,0.25%胰蛋白酶消化,PBS洗3次。加入TRIZOL(上海生物工程公司产品)分离总RNA。RNA 5 μ g中加入寡聚核苷酸引物oligo(dT) 18 0.5 μ g,用无核酸酶双蒸水调节体积到12 μ L,70℃水浴5 min,加入5 \times 逆转录缓冲液4 μ L,核酸酶抑制剂20 u,10 mmol/L dNTP混合液2 μ L,37℃孵育5 min后加入M-MuLV逆转录酶100 u,37℃孵育1 h,70℃水浴10 min终止反应。聚合酶链反应(PCR)扩增肝脂酶基因片段,所用肝脂酶基因特别引物序列:HL-1为5'-GCC ATT TGC AAG AAG AGC -3',位于外显子2中;HL-2为5'-CCA CCG ATG GAA CTG CCG GC-3',

位于外显子 4 中。扩增片段长度为 459 bp, 含一个完整的外显子 3。条件为上下游引物各 1 μL、2.5 μL dNTP、2.5 μL MgCl₂、10 × PCR 缓冲液 2.5 μL 和 0.5 μL Taq DNA 聚合酶(以上试剂购于上海生物工程公司), 加入 cDNA 2.5 μL 为模板, 用双蒸水补足反应体积 25 μL。94 °C 变性 5 min 一个循环, 94 °C 变性 1 min、50 °C 退火 2 min、72 °C 聚合 3 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。扩增 β-actin 838 bp 的 DNA 片段做内参。人 β-actin 基因引物序列是: 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3' (上游引物); 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3' (下游引物), 扩增条件同肝脂酶基因, 反应条件为 94 °C 变性 4 min 一个循环, 94 °C 变性 1 min、55 °C 退火 2 min、72 °C 聚合 3 min, 共 30 个循环, 72 °C 延长 10 min。PCR 产物在含溴乙锭的 2% 琼脂糖/TBE 胶上电泳, 电压 70 V, 时间 50 min, 在凝胶成像仪下观察分析, Pharmacia LKB 紫外光密度扫描系统比较各标本吸光度值, 以半定量肝脂酶 mRNA 表达强度。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 相关性分析采用直线相关分析。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

随 LDL、ox-LDL 浓度增加细胞增殖抑制率也增加, 两者呈正相关关系 (r 分别为 0.91199 和 0.93604, $P < 0.05$)。脂蛋白浓度为 54.95 mg/L 时, ox-LDL 对细胞增殖抑制率是 LDL 对细胞增殖抑制率的 2 倍(表 1, Table 1)。

2.2 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对肝脂酶活性及其 mRNA 表达的影响

随着 LDL 浓度增加, 细胞肝脂酶活性逐渐降低, 两者呈负相关关系($r = -0.95614$, $P < 0.05$)。随着 ox-LDL 浓度增加, 细胞肝脂酶活性逐渐降低, 两者也呈负相关关系($r = -0.83915$, $P < 0.05$); 当脂蛋白浓度为 27.47~109.89 mg/L 时, LDL 组 HepG2 细胞肝脂酶活性是 ox-LDL 组的 3~4 倍(表 2, Table 2)。LDL 组逆转录聚合酶链反应产物吸光度值明显高于细胞对照孔($P < 0.05$), 其中 LDL 为 27.47 及 54.95 mg/L 时逆转录聚合酶链反应产物吸光度值是细胞对照孔的 2.8 倍及 2.3 倍; LDL 为 109.89 mg/L 时逆转录聚合酶链反应产物吸光度值与细胞对照孔比较降低 20%。ox-LDL 组逆转录聚合酶链反应产物最大

吸光度值明显低于细胞对照孔($P < 0.05$), 也明显低于 LDL 组($P < 0.05$), ox-LDL 浓度为 109.89 mg/L 时 HepG2 细胞肝脂酶 mRNA 表达极低。

表 1. 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对 HepG2 细胞的增殖抑制率

Table 1. The cytostasis rate of HepG2 cells incubated with LDL and ox-LDL ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

浓度 (mg/L)	LDL group	ox-LDL group
0	0	0
1.72	13.5% \pm 2.2%	11.7% \pm 3.5%
3.43	10.5% \pm 3.5%	12.8% \pm 4.0%
6.87	11.8% \pm 4.1%	14.2% \pm 5.2%
13.74	12.6% \pm 2.9%	13.4% \pm 8.0%
27.47	14.5% \pm 6.2%	12.4% \pm 6.8%
54.95	12.6% \pm 5.8%	25.5% \pm 8.5%
109.89	22.0% \pm 7.6%	29.2% \pm 8.8%
219.8	25.3% \pm 10.2%	33.7% \pm 5.5%
439.9	36.0% \pm 18.2%	50.61% \pm 25.1%
879.1	71.8% \pm 19.6%	61.5% \pm 16.0%
1758.2	90.6% \pm 28.6%	98.2% \pm 0.1%

表 2. 低密度脂蛋白和氧化型低密度脂蛋白对 HepG2 细胞肝脂酶活性(数密度)及肝脂酶 mRNA 表达的影响

Table 2. HL activity (N/A) and HL mRNA expression (Max A) of HepG2 cells incubated with LDL or ox-LDL

浓度 (mg/L)	LDL 组		ox-LDL 组	
	活性 (n = 8)	mRNA (n = 2)	活性 (n = 8)	mRNA (n = 2)
0	4.53 \pm 0.06	60.213	4.53 \pm 0.06	60.213
6.87	4.26 \pm 0.10	62.102	4.53 \pm 0.09	69.302
13.74	4.32 \pm 0.12	72.641	4.08 \pm 0.10	68.217
27.47	3.68 \pm 0.08	168.022	1.00 \pm 0.01	47.241
54.95	1.20 \pm 0.03	140.173	0.46 \pm 0.00	42.542
109.89	0.52 \pm 0.00	48.140	0.12 \pm 0.00	0

3 讨论

肝脂酶定位于肝窦周间隙内皮细胞表面和窦周间隙腔面的肝细胞微绒毛表面, 与细胞表面的硫酸肝素蛋白聚糖(heperan sulfate proteoglycans, HSPG) 结合成 HSPG-HL 复合物。肝脂酶基因变异是影响肝脂酶活性的常见原因。本研究发现, 高浓度 ox-LDL、LDL 对 HepG2 细胞有毒性作用, 且 ox-LDL、LDL 对

HepG2 细胞增殖未产生明显抑制的情况下对肝脂酶活性已表现出明显抑制作用, 随 LDL、 α -LDL 浓度增加肝脂酶活性降低。在 HepG2 细胞增殖及细胞肝脂酶活性测定实验中, α -LDL 对 HepG2 细胞肝脂酶活性的抑制作用比 LDL 强 3~4 倍。Bourdon 等^[5]发现 α -LDL 引起 HepG2 细胞血清白蛋白合成降低。范建高等^[6]观察到氧化型极低密度脂蛋白(α -VLDL) 对人肝癌细胞(L-02 细胞) 增殖有明显抑制作用。

本研究发现, LDL 浓度为 27.47 及 54.95 mg/L 时 HepG2 细胞肝脂酶 mRNA 表达上调, 但细胞肝脂酶活性未增加; LDL 浓度在 109.89 mg/L 时细胞肝脂酶 mRNA 表达降低, 细胞肝脂酶活性下降, HepG2 细胞增殖受抑制。用 α -LDL 实验未见到低浓度时细胞肝脂酶 mRNA 表达上调, 高浓度时肝脂酶 mRNA 表达降低的现象。这一结果提示, 一定浓度的 LDL 能刺激肝细胞肝脂酶 mRNA 表达上调并合成无脂酶活性的肝脂酶蛋白。有报道肝细胞膜上肝脂酶与 HSPG 结合后, 肝脂酶除具脂酶活性外还具有配体功能, 能发挥“桥”的作用以促进细胞摄取含载脂蛋白 B 的脂蛋白^[7]。可以推测, 一定浓度范围内的 LDL 刺激肝细胞肝脂酶 mRNA 表达, 肝脂酶合成增加有利于肝细胞摄取并清除环境中的 LDL, 这也许属一种生物自我保护反应。但 α -LDL 刺激肝细胞后不引起这种反应, 且仅表现出细胞毒作用。

本研究结果提示, 环境中 LDL 浓度在一定范围内增加时肝细胞肝脂酶 mRNA 表达水平上调, 肝脂酶蛋白合成增加, 肝脂酶促进细胞摄取清除 LDL 作

用增加, 有益于维持环境中 LDL 水平相对稳定; 如果环境中 LDL 浓度增加过高, LDL 的脂毒性使细胞增殖受抑制, 细胞肝脂酶 mRNA 表达下调, 肝脂酶蛋白合成降低, 肝细胞清除 LDL 作用下降, 使环境中 LDL 浓度进一步增加, 出现恶性循环, 这可能是血脂代谢紊乱的机理之一。 α -LDL 对肝细胞毒性作用强, 可抑制肝脂酶 mRNA 表达及肝脂酶蛋白合成, 不利于对环境中过多脂质的清除。由于本研究未测定 HepG2 细胞膜上肝脂酶蛋白密度, 未测定细胞清除 LDL 量的变化, 故需要进一步验证以上观点。

[参考文献]

- [1] 张晓刚, 陈运贞. 肝脂酶与脂蛋白代谢. 国外医学临床生物化学与检验分册, 2002, 23 (1): 48-49
- [2] Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JL, Lu J, et al. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*, 2000, 41 (2): 245-252
- [3] Busch SJ, Krstenansky JL, Owen TJ, Jackson RL. Human hepatoma (HepG2) cells secrete a single 65 K Dalton triglyceride lipase immunologically identical to postheparin plasma hepatic lipase. *Life Sci*, 1989, 45 (7): 615-622
- [4] 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血清脂蛋白. 生物化学与生物物理学报, 1989, 21 (2): 257-260
- [5] Bourdon E, Loreau N, Davignon J, Bernier L, Blache D. Involvement of oxysterols and lysophosphatidylcholine in the oxidized LDL-induced impairment of serum albumin synthesis by HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (12): 2643-2650
- [6] 范建高, 曾民德, 洪健. TG、VLDL 和 α -VLDL 对 L-02 和 HLF 细胞增殖及合成细胞外基质的影响. 中华消化杂志, 1998, 18 (2): 79-81
- [7] Huff MW, Miller DB, Wolfe BM, Connelly PW, Sawyez CG. Uptake of hypertriglyceridemic very low density lipoproteins and their remnants by HepG2 cells: the role of lipoprotein lipase, hepatic triglyceride lipase, and cell surface proteoglycans. *Journal of Lipid Research*, 1997, 38 (7): 1318-331

(此文编辑 文玉珊)

•资料•

2001 年《中国科学技术论文统计源期刊》生物医学类(三)

军事医学科学院院刊	临床精神医学杂志	临床与实验病理学杂志
军医进修学院学报	临床口腔医学杂志	免疫学杂志
口腔颌面外科杂志	临床麻醉学杂志	内科急危重症杂志
口腔医学纵横	临床泌尿外科杂志	南京铁道医学院学报
口腔正畸学	临床内科杂志	南京医科大学学报
昆明医学院学报	临床皮肤科杂志	南京中医药大学学报
临床儿科杂志	临床神经病学杂志	脑与神经疾病杂志
临床耳鼻咽喉科杂志	临床外科杂志	青岛大学医学院学报
临床放射学杂志	临床消化病杂志	人类学学报
临床骨科杂志	临床心血管病杂志	山东医科大学学报
临床检验杂志	临床血液学杂志	山东医药