

氧化型低密度脂蛋白中不同氧化产物对小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体胆固醇蓄积的影响

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] 病理学与病理生理学; 氧化型低密度脂蛋白不同氧化产物对胆固醇蓄积的作用; 小鼠腹腔巨噬细胞; 溶酶体; 胆固醇; 组织蛋白酶 L

[摘要] 为研究氧化型低密度脂蛋白中不同氧化产物对小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体胆固醇蓄积的影响。分别用 100 mg/L 的铜氧化的低密度脂蛋白和次氯酸钠氧化的低密度脂蛋白处理小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 分别测定巨噬细胞溶酶体中胆固醇和总蛋白的含量以及溶酶体中组织蛋白酶 L 的活性。结果发现, 铜氧化型低密度脂蛋白和次氯酸钠氧化型低密度脂蛋白均可引起总胆固醇和总蛋白在溶酶体蓄积(实验组总胆固醇分别为 $16.90 \pm 0.15 \mu\text{g}$ 和 $15.11 \pm 0.54 \mu\text{g}$, 对照组为 $3.28 \pm 0.08 \mu\text{g}$, $P < 0.01$; 实验组总蛋白分别为 $17.93 \pm 1.66 \mu\text{g}$ 和 $21.00 \pm 1.68 \mu\text{g}$, 对照组为 $13.39 \pm 2.64 \mu\text{g}$, $P < 0.01$)。但蓄积的胆固醇类型有所不同, 前者以游离胆固醇为主(游离胆固醇为 $14.13 \pm 0.14 \mu\text{g}$, 胆固醇酯为 $4.77 \pm 0.33 \mu\text{g}$); 后者则以胆固醇酯为主(游离胆固醇为 $5.01 \pm 0.30 \mu\text{g}$, 胆固醇酯为 $10.10 \pm 0.48 \mu\text{g}$)。铜氧化低密度脂蛋白可造成溶酶体组织蛋白酶 L 活性明显下降($11.1 \pm 2.3 \text{ kau/g}$ 比 $73.2 \pm 15.0 \text{ kau/g}$, $P < 0.01$), 而次氯酸钠氧化低密度脂蛋白的作用不明显(73.6 ± 9.5 比 73.2 ± 15.0 , $P > 0.05$)。以上结果提示, 不同氧化产物引起溶酶体胆固醇蓄积的种类不同, 而蛋白降解受阻可能是氧化型低密度脂蛋白所致溶酶体胆固醇蓄积的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

文献[1]报道, 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)能引起小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophages, MPM)溶酶体内胆固醇蓄积, 这种蓄积以游离胆固醇(free cholesterol, FC)为主。通常, 将 LDL 制备成 ox-LDL 是加 CuSO_4 氧化 24 h 来完成的, 氧化的主要是 LDL 中的脂质成份。如果改变 LDL 中的氧化成份, 是否会对溶酶体蓄积胆固醇产生影响? 本文对其进行探讨。

1 材料与方法

实验参照文献[1]进行, 现简述。

1.1 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

取体重为 20~25 g 昆明种小鼠(购自中山大学实验动物中心), 断髓处死后参照文献[2]制备 MPM, 然后置 DMEM 培养基中, 在 5% CO_2 和 37 °C 条件下继续培养。

1.2 低密度脂蛋白的分离和氧化修饰

取健康人血浆(购自广州市中心血站)用密度梯度离心法分离 LDL 后^[3], 采用 Cu^{2+} 氧化法制备 ox-LDL; 采用醋酸酐法制备乙酰化 LDL(acetylated LDL, ac-LDL)^[4]。

1.3 次氯酸钠氧化型低密度脂蛋白的制备^[4]

调节 LDL 蛋白含量在 0.5~2.0 g/L。在 pH 为 7.4, 温度为 4 °C 下, 加入 NaOCl 储备液, 使其终浓度为 1.5 mmol/L, 短暂混匀, 静置 15 min, 37 °C 孵育 30 min, 然后用 10 mmol/L PBS 透析, 即成次氯酸钠 ox-LDL (NaOCl-ox-LDL), 除菌后 4 °C 避光保存备用。

1.4 脂蛋白的纯度和氧化程度鉴定

用 Bradford 法测定 LDL、ac-LDL、ox-LDL 和 NaOCl-ox-LDL 的蛋白含量。测定硫代巴比妥酸反应物质值发现, LDL 和 ac-LDL 分别为 1.369 和 1.415, Cu^{2+} 氧化制备的 ox-LDL 为 6.528, NaOCl 氧化制备的 ox-LDL 为 2.808。

1.5 实验分组及处理

将 MPM 分为 4 组: 对照组、ac-LDL 处理组、Cu-ox-LDL 处理组和 NaOCl-ox-LDL 处理组。给予 100 mg/L 相应的 LDL 处理 24 h 后, 收获细胞, 制备溶酶体进行指标测定。

1.6 小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体的制备及完整性

参照文献[5], 在 37 °C 下将匀浆缓冲液悬浮并用超声破碎机进行超声破碎, 经低温离心所得沉淀

[收稿日期] 2003-06-05 [修回日期] 2003-07-11

[基金项目] 国家杰出青年基金(30025037)资助, 申请人为凌文华。

[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, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与营养预防。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。

物即为溶酶体。经数次评价,完整性在 95% 以上。

1.7 溶酶体胆固醇含量的测定^[6]

取溶酶体悬浮液,用甲醇/氯仿法抽提脂质,用无水乙醇作为溶剂。FC 和总胆固醇(total cholesterol, TC)的测定采用酶法。胆固醇酯(cholesterol ester, CE)是以 TC 含量与 FC 含量的差值来表示。

1.8 溶酶体组织蛋白酶 L 活性的测定

溶酶体组织蛋白酶 L 酶活性的测定采用荧光法^[7],酶活性用 kau/g 蛋白表示。

1.9 数据处理与统计分析

用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,组间显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

用次氯酸钠制备的 ox-LDL (NaOCl -ox-LDL) 处理 MPM 后,溶酶体内组织蛋白酶 L 的活性并未下降,但溶酶体中总蛋白明显增加,显著高于正常对照组和 ac-LDL 组,同时出现溶酶体胆固醇蓄积,并以胆固醇酯为主(表 1, Table 1)。该结果提示,以蛋白氧化为主的 NaOCl -ox-LDL,在溶酶体内的降解也受到阻碍,并伴有以胆固醇酯为主的胆固醇蓄积,但不是通过抑制溶酶体组织蛋白酶活性。

表 1. 次氯酸钠氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体组织蛋白酶 L 的活性、总蛋白含量和胆固醇的影响

Table 1. Effects of NaOCl -ox-LDL on cathepsin activity, total protein, and cholesterol content of the lysosome in MPM

分 组	组织蛋白酶 L (kau/g)	总蛋白 (μg)	FC (μg)	CE (μg)	TC (μg)
对照组	73.2 ± 15.0	13.39 ± 2.64	2.60 ± 0.10	0.68 ± 0.02	3.28 ± 0.08
乙酰化型 LDL	83.0 ± 16.2	13.39 ± 2.64	2.54 ± 0.20	0.62 ± 0.04	3.16 ± 0.16
铜氧化型 LDL	11.1 ± 2.3 ^a	17.93 ± 1.66 ^a	14.13 ± 0.14 ^a	4.77 ± 0.33 ^a	16.90 ± 0.15 ^a
次氯酸氧化型 LDL	73.6 ± 9.5 ^b	21.00 ± 1.68 ^a	5.01 ± 0.30 ^{ab}	10.10 ± 0.48 ^{ab}	15.11 ± 0.54 ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组和乙酰化型 LDL 组比较; b: $P < 0.01$, 与铜氧化型 LDL 组比较。

3 讨论

用次氯酸钠氧化 LDL 被氧化的是蛋白质成份。本文发现,两类 ox-LDL 均可引起胆固醇在溶酶体蓄积,但蓄积的胆固醇类型不同,铜氧化型 ox-LDL 以 FC 为主,次氯酸钠 ox-LDL 则以 CE 为主。这说明,两类 ox-LDL 虽然均可致蛋白和胆固醇在溶酶体蓄积,的机理以及表现形式存在很大差别,此种差别则是由两类 ox-LDL 中的氧化产物不同,通过不同的机制在起作用。

研究证实,两类 ox-LDL 均表现出一定程度的溶酶体总蛋白含量增加,意味着载脂蛋白降解过程受阻,但两者发生的机理有所差异。以脂类氧化为主的 ox-LDL 对溶酶体组织蛋白酶 L 活性具有明显的抑制作用,这可能脂类氧化产物的作用,使载脂蛋白的空间结构发生改变,因此,溶酶体组织蛋白酶降解效率变低,进而表现出蛋白蓄积^[8]。可见,该型 ox-LDL 在溶酶体降解障碍涉及酶活性抑制和抵抗力增加两种机制。以蛋白氧化为主的 NaOCl -ox-LDL 不抑制溶酶体组织蛋白酶 L 活性,因此,该类 ox-LDL 在溶酶体的降解受阻只能用对降解酶的抵抗力增加来解释。

综上所述,ox-LDL 在溶酶体内的降解受阻是由

脂类和蛋白氧化产物共同决定的,而对蛋白水解酶的抑制则取决于脂类氧化产物。ox-LDL 中无论何种氧化产物通过何种途径造成载脂蛋白在溶酶体降解受阻,均可以前述机械屏障作用影响 CE 的脂解而蓄积。

[参考文献]

- [1] 艾宝民, 夏敏, 唐志红, 凌文华. 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. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (2): 114-117
- [2] Gelissen IC, Brom AJ, Mander EL, Leonard K, Dean RT, Jessup W. Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, 1996, 271: 17 852-860
- [3] 王淳本, 宗义强, 吴万生. 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: 169-171
- [4] 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: 557-569
- [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: 654-664
- [6] 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: 185-187
- [7] Barrett AJ, Krische H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymol*, 1981, 80 (Pt C): 535-61
- [8] Loughheed M, Zhang HF, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages. *J Biol Chem*, 1991, 266: 14 519-525

(此文编辑 胡必利)