

体内巨噬细胞来源的胆固醇逆向转运效率监测方法

倪占玲^{1,2}, 赵水平², 彭道泉², 董静², 聂赛²

(1. 河南省人民医院心内科, 河南省郑州市 450003; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内科学; 巨噬细胞; 胆固醇逆转运; 低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 测定小鼠血清、肝脏及粪便中³H-胆固醇占经腹腔注射³H-胆固醇总量的百分比, 探讨直接检测活体内巨噬细胞来源的胆固醇逆向转运方法。**方法** 16只 C57BL/6 小鼠随机分为两组, 分别经腹腔注射普通培养基(对照组)或乙酰化低密度脂蛋白及³H-胆固醇处理过的 RAW264.7 细胞悬液(实验组), 单独笼养 12 h 和 24 h 后取血, 酶法测定血清脂质; 收集血清、肝组织、0~24 h 粪便, 用液闪计数器测定各样本的³H-胆固醇含量(以占注射总量百分比计算)。**结果** 24 h 后实验组小鼠血清、肝脏及粪便中均可检测到³H 的放射活性, 分别占注射总量的 2.810% ± 0.060%、0.680% ± 0.030% 及 0.690% ± 0.030%, 且明显高于对照组。**结论** 经腹腔注射乙酰化低密度脂蛋白及³H-胆固醇处理过的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞悬液, 24 h 后可以分别检测到小鼠血清、肝组织、0~24 h 粪便中³H-胆固醇含量, 是一种直接检测小鼠体内巨噬细胞来源的胆固醇逆向转运的可行方法。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

A Method to Measure the Rate of Reverse Cholesterol Transport from Macrophage to Feces in Vivo

NI Zhan Ling^{1,2}, ZHAO Shui Ping², PENG Dao Quan², DONG Jing², and NIE Sai²

(1. Department of Cardiology, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, Henan, China; 2. Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Reverse Cholesterol Transport; Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To set up a method to measure the rate of reverse cholesterol transport from macrophage to feces in vivo, serum lipid profiles of mice was tested and the ³H-contents was quantitated in serum, liver and feces in mice after 24 hours intraperitoneally were injected macrophages which were labeled with ³H-cholesterol. **Methods** 16 C57BL/6 mice were divided into two groups at random and one group was injected intraperitoneally with RAW264.7 macrophages which were loaded with cholesterol by incubation with acetylated low density lipoprotein (acLDL), labeled with ³H-cholesterol. As a control, another group was injected with culture media instead. Serum lipid profiles were quantitated by enzymatic method; serum and liver tissues were harvested at 24 hours, feces were collected (0~24 h), and all were analyzed for tracer counts (all were expressed as the percent of the total injected counts per minute). **Results** After being injected intraperitoneally 24 h with DMEM or RAW264.7 macrophages, the serum lipid profiles of two groups have no difference ($P > 0.05$). ³H-cholesterol could be detected in the plasma, liver, and feces of the mice in tested group, and the percents of the total injected counts per minute were 2.810% ± 0.060%, 0.680% ± 0.030% and 0.690% ± 0.030% respectively, also were higher than that of control group. **Conclusions** After being injected intraperitoneally with ³H-cholesterol labeled RAW264.7 macrophages, the radioactivity could be detected in the plasma, liver, and feces of the mice. This method could be taken as a kind of feasible way to measure the rate of reverse cholesterol transport from macrophages into feces.

胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)是指机体将过多的胆固醇从外周细胞转运至肝脏,继而分泌至胆汁,最后经由粪便排出体外的过程^[1,2]。RCT牵涉到胆固醇与脂蛋白代谢的重要环节,与动脉粥样硬化疾病的发生发展密切相关,检测活体 RCT 效率对研究动脉粥样硬化机制及探寻有

效的干预措施具有重要的意义,但是至今尚未有直接测定活体内 RCT 的方法。我们参考国外新近文献^[3,4],试图建立一种在体检测 RCT 的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

16只 10 周龄健康雄性 C57BL/6J 小鼠购自北京协和医科大学实验动物中心,体重 20~23 g,饲养在中南大学湘雅二医院实验动物中心 SPF 级动物房。RAW264.7 巨噬细胞株购自中国科学院上海细胞库。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公

[收稿日期] 2006-10-23 [修回日期] 2007-12-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30470705)

[作者简介] 倪占玲, 博士, 主治医师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 nightingale_ni@hotmail.com。通讯作者赵水平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂代谢异常与动脉粥样硬化。

司,³H-胆固醇购自美国 Sigma 公司,乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, ac-LDL)购自中国科学院协和生物化学研究所,其余试剂为国产分析纯。液体闪烁计数器为芬兰 WALLAC1409 型。

1.2 细胞培养及干预

RAW264.7 巨噬细胞培养条件为 37℃、5% CO₂、100% 湿度培养箱、含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。干预液制备:取终浓度 50 mg/L ac-LDL 于 15 mL 离心管,加入³H-胆固醇(干预浓度 5 mCi/L),37℃ 孵育 30 min;再加入 DMEM 培养基,混匀;将制备好的干预液加至培养瓶,细胞置于 37℃ 培养箱培育 48 h。加入胰酶使贴壁细胞脱落和分散,继之以 DMEM 冲洗 2 遍后,将细胞悬浮于不含胎牛血清的 DMEM,调整细胞数为 10.0 × 10⁹/L 后,细胞悬液转移至 1 mL 注射器(置于冰上);剩余的细胞悬液分别测定细胞及上清的放射活性,保证上清所占比例少于 5%,注射悬液的放射活性为 6.2 × 10⁶ cpm。吸取剩余的细胞悬液 80 μL,分别放置于 3 个微量离心管中,离心后,各吸取 10 μL 上清,用液闪计数器进行计数,吸除剩余上清,加入 200 μL 正己烷/异丙醇(3:2),混匀,离心,吸取有机相于液闪瓶内(重复萃取 2 遍),真空干燥,加入闪烁液进行计数(取三个样品平均值,计算出细胞和上清液放射活性的比例,细胞所占比例应 > 95%)。

1.3 动物干预

16 只 10 周龄 C57BL/6 小鼠适应环境后随机分为两组,均饲以普通饲料,自由饮水。细胞悬液制备完善以后,每只小鼠分别经腹腔注射细胞悬液 0.5 mL(实验组)或普通 DMEM 培养基 0.5 mL(对照组)。之后单独笼养 24 h。24 h 后称重,经腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉后取血,置微量离心管(冰上放置)。

1.4 血清处理

血样冰上静置 1 h,1 200 r/min 离心 5 min,20 μL 血清直接进行液闪计数,计算血液总放射活性及占注射总量的百分比。取血清上样于全自动生物化学分析仪,酶法检测血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)含量。

1.5 粪便处理

用镊子拣取小鼠 0~24 h 粪便并称重,将粪便转移至组织匀浆器或者研钵中,加入 50% 乙醇溶解粪便使浓度为 0.114 kg/L,充分混匀 1~2 min,取 300 μL 混匀液至 20 mL 液闪瓶中,加入 10 mL 液体闪烁

液,振荡混匀,过夜;第二天再振荡液闪瓶,并进行液闪计数,计算粪便总放射活性及占注射总量的百分比。

1.6 肝脏脂质抽提

小鼠处死后,取肝脏组织,冰生理盐水洗去血迹,用滤纸吸干,精确称重,-20℃ 保存;准确称取部分冰冻肝组织放入玻璃匀浆器,加入正己烷/异丙醇(3:2)^[5],充分混匀 10 min,离心,收集上清液,再重复抽提 2 遍,真空干燥,将干燥脂质溶于 2 mL 闪烁液,充分振荡混匀即可进行液闪计数,计算肝脏总放射活性及占注射总量的百分比。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计分析,对主要指标进行正态性检验,组间比较采用配对 *t* 检验。实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的血脂水平

两组小鼠血脂水平无明显差异(表 1)。

表 1. 小鼠的血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L, *n* = 8)

分组	TC	HDLC	LDLC	TG
对照组	2.71 ± 0.43	1.61 ± 0.21	0.47 ± 0.06	1.16 ± 0.21
实验组	2.71 ± 0.54	1.60 ± 0.10	0.47 ± 0.05	1.15 ± 0.21

2.2 小鼠³H-胆固醇分布

实验组小鼠血清、肝脏和粪便³H-胆固醇的放射活性明显强于对照组(*P* < 0.01, 表 2)。

表 2. 小鼠³H-胆固醇分布

分组	血清	肝脏	粪便
对照组	0.006% ± 0.002%	0.008% ± 0.001%	0.007% ± 0.001%
实验组	2.81% ± 0.06% ^a	0.68% ± 0.03% ^a	0.69% ± 0.03% ^a

a 为 *P* < 0.01, 与对照组比较。

3 讨论

胆固醇逆转运是机体排出过多胆固醇的唯一途径,也是机体抗动脉粥样硬化最重要的机制之一。其主要过程包括多余的胆固醇经转运体如 ATP 结合盒转运子 A1、G1 和清道夫受体 B 族 I 型(SR-BI)等介导从外周细胞流出,转移至 HDL,随血液循环至肝脏,与肝细胞表面 HDL 受体如 SR-BI 结合,被选

择性摄取后转变为胆汁酸盐,继而经由粪便排出体外。自从 1973 年 Glomset 等^[6]第一次提出这个概念后,此途径作为消退动脉粥样硬化的治疗策略靶点受到越来越多地重视。理论上讲,荷脂的巨噬细胞可以通过胆固醇外流途径的激活释放脂质, HDL 是 RCT 过程的最初胆固醇载体,但是直到现在这种说法的确凿证据还很缺乏,因为没有适当的方法检测胆固醇从外周组织至粪便的转运效率。最近 Zhang 等^[3]和 Naik 等^[4]发现给小鼠腹腔注射³H-胆固醇标记的巨噬细胞后,可以通过检测血清及粪便中氘的放射活性来反映胆固醇的逆转运效率。本研究在参考 Zhang 等^[3]和 Naik 等^[4]方法的基础上,建立了一种可以进行活体测定胆固醇逆转运的方法。首先培养并以同位素标记同源巨噬细胞,之后收获细胞进行腹腔注射,最后收集粪便测定相应的同位素活性。通过对干预后 C57BL/6 小鼠血清、肝脏、粪便中氘活性的测定,证明了这种方法检测胆固醇逆转运的可行性及可靠性。

此方法选用同位素³H 标记,它的放射能量低,对实验操作者的损害相对较小。方法中的关键步骤有三个:第一是体外干预细胞之前,需将 ac-LDL 与³H-胆固醇共同温孵 30 min,使得³H-胆固醇与 LDL 有一定结合,因为巨噬细胞易于摄取修饰的 LDL,这样可以保证³H-胆固醇进入细胞比较充分;第二是需要检测标记细胞悬液的放射活性,要求细胞内³H-胆固醇计数的比例应> 95%,上清所占比例少于 5%,即保证同位素标记的胆固醇是在细胞内;第三是粪便中胆固醇的提取及测定,以前多采用很复杂的抽提过程^[3,4],需要用到高效液相色谱仪或气相色谱仪;考虑到已经作了同位素标记,我们只需要测定粪便中所有同位素标记的胆固醇的液闪计数值,不必区分出每种胆固醇的具体含量。我们应用 50% 乙醇溶解粪便,直接检测定量混悬液的液闪计数值,作

为粪便中氘的放射活性,经反复试验,结果可靠。方法更为简便。此外,小鼠生活习性不同导致不同粪便量对实验结果无明显影响,要求精确称取各只小鼠粪便的总重量,我们的实验中小鼠粪便的重量为 0.26~ 1.63 g 不等,经反复试验发现理想的粪便浓度是 1.6 g/14 mL 溶剂,相当于 0.114 kg/L。

至今为止, RCT 是人们所知机体抗动脉粥样硬化消退动脉粥样硬化斑块最重要的机制之一^[1],针对其中不同步骤的干预措施注定成为备受重视的治疗靶点,事实上目前已经研发几种很有前景的药物,比如,升高 HDL 的措施(胆固醇酯转运蛋白抑制剂、静脉输注载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AI 模拟肽及重组 HDL 等)、肝 X 受体激动剂等^[7,8]。建立在体检测 RCT 的动物模型对研究动脉粥样硬化机制、开发有效的治疗措施及判断干预措施的效果都具有非常重要的意义。

[参考文献]

- [1] 陈思锋. 动脉粥样硬化性初期斑块的逆转原理[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (7): 530-531.
- [2] Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis [J]? *Circulation*, 2006, 113 (8): 2 548-555.
- [3] Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (10): 2 870-874.
- [4] Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphie CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo [J]. *Circulation*, 2006, 113 (8): 90-97.
- [5] 韩菊,魏福祥,云自厚. 采用低毒溶剂提取脂质[J]. 分析化学研究简报, 2002, 30 (4): 450-453.
- [6] Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology [J]. *Adv Lipid Res*, 1973, 11: 1-65.
- [7] 赵水平. 高密度脂蛋白的研究现状[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (6): 673-675.
- [8] Duffy D, Rader DJ. Emerging therapies targeting high density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport [J]. *Circulation*, 2006, 113 (8): 1 140-150.

(此文编辑 文玉珊)