

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0917-04

• 实验研究 •

## 应用骨髓移植研究巨噬细胞脂蛋白脂酶对严重高甘油三酯血症小鼠脂代谢的作用

张玲, 冼勋德, 丁银元, 刘国庆

(北京大学医学部心血管研究所, 北京市 100191)

[关键词] 巨噬细胞; 脂蛋白脂酶; 甘油三酯; 胆固醇; 骨髓移植

**[摘要]** 目的 研究骨髓中巨噬细胞来源的脂蛋白脂酶(LPL)对遗传性极高甘油三酯血症小鼠血浆脂蛋白代谢的作用。方法 将8只雌性脂蛋白脂酶基因缺陷(LPL<sup>-/-</sup>, LK)小鼠随机分为两组,用1 000 rad<sup>137</sup>Cs照射,6 h后分别尾静脉注射脂蛋白脂酶基因缺陷的雄性小鼠及野生型(WT)雄性小鼠的骨髓。骨髓移植后通过眶静脉采血收集小鼠血浆,监测血浆甘油三酯、胆固醇、血浆脂蛋白脂酶活性等指标的变化,并用快速液相色谱技术检测血浆脂蛋白的分布。结果 移植后第4周,与LPL<sup>-/-</sup>→LPL<sup>-/-</sup>骨髓移植组相比,WT<sup>+</sup>→LPL<sup>-/-</sup>骨髓移植组小鼠血浆甘油三酯水平降低83.2% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ),胆固醇水平降低74.4% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。与骨髓移植前相比,WT<sup>+</sup>→LPL<sup>-/-</sup>骨髓移植组小鼠血浆甘油三酯水平降低86.2% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ),胆固醇水平降低78.8% ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ ),脂蛋白脂酶活性增加4.5倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。LPL<sup>-/-</sup>→LPL<sup>-/-</sup>骨髓移植组小鼠血浆甘油三酯、胆固醇水平以及血浆脂蛋白脂酶活性较移植前均无明显改变。结论 骨髓巨噬细胞来源的脂蛋白脂酶对脂代谢具有重要的调节作用,可有效改善遗传性极高甘油三酯血症小鼠的高脂血症。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effect of Bone Marrow Derived Lipoprotein Lipase on Lipid Metabolism in Severe Lipoprotein Lipase Deficient Hypertriglyceridemic Mice

ZHANG Ling, XIAN Xun-De, DING Yin-Yuan, and LIU Guo-Qing

(Institute of Cardiovascular Sciences, Health Science Center, Beijing University, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Lipoprotein Lipase; Triglyceride; Cholesterol; Bone Marrow Transplantation

**[ABSTRACT]** **Aim** To study the effects of macrophage-derived lipoprotein lipase (LPL) on the lipid metabolism in inherited hypertriglyceridemic mice. **Methods** After lethal irradiation, 8 female LPL-deficient (LPL<sup>-/-</sup>, LK) mice were divided into two groups and reconstituted by bone marrow transplantation (BMT) from male C57BL/6 (LPL<sup>+/+</sup>, WT) and LK mice, respectively. Plasma levels of triglyceride, total cholesterol were surveyed, plasma lipoprotein profile was detected by fast protein liquid chromatography (FPLC), and LPL activities were assayed at week 4 post-BMT. **Results** It was demonstrated that plasma triglyceride (TG) and cholesterol (Chol) levels in BMT (WT<sup>+</sup>→LPL<sup>-/-</sup>) mice were reduced by 83.2% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) and 74.4% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) compared with those in LPL<sup>-/-</sup>→LPL<sup>-/-</sup> mice, while similar reduction by 86.2% and 78.8% in TG and Chol before and after BMT were observed in WT<sup>+</sup>→LPL<sup>-/-</sup> mice. Post-heparin plasma LPL activities were increased by 4.5-fold after BMT. There were no effects of BMT in LK<sup>+</sup>→LK mice on TG, Chol and LPL activities. **Conclusion** Macrophage-derived LPL plays a significant role in the lipid metabolism, and improves lipoprotein disorder in inherited hypertriglyceridemic mice.

脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL) 是血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 代谢的核心酶, 其在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 中的作用机制一直有争议。自 Linton 应用骨髓移植方法研究巨噬细胞特异性的载脂蛋白 E 表达逆转载脂蛋白 E 基因缺陷小

鼠的动脉硬化以来, 骨髓移植作为一种有效研究方法, 在动脉硬化的研究中得到了广泛应用<sup>[1,2]</sup>。已知 LPL 也在巨噬细胞中表达, 因此, 骨髓移植也应用于对 LPL 在 As 作用的进一步研究中。Babaev 和 Wilson 等分别以野生型、低密度脂蛋白受体和载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠作为接受体, 证实骨髓来源的巨噬细胞 LPL 能促进泡沫细胞的形成和 As 的发生, 同时有轻度的 TG 和胆固醇改变<sup>[3-5]</sup>。

然而, 在 LPL 缺陷伴有严重高甘油三酯血症时, 巨噬细胞来源的 LPL 可能对血浆脂代谢产生何种影响尚不知晓。我们应用腺病毒介导的有益突变

[收稿日期] 2009-08-21 [修回日期] 2009-10-29

[作者简介] 张玲, 主管技师, 研究方向为严重高甘油三酯血症及其所致多器官损害的机制, Email 为 zhlqku@bjnu.edu.cn。冼勋德, 研究方向为原发性 LPL 缺陷和严重高甘油三酯血症的中枢神经系统损伤及其机制, Email 为 xianxund@163.com。通讯作者刘国庆, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为严重高甘油三酯血症及其所致多器官损害的机制, Email 为 georgeli@bjnu.edu.cn。

体细胞基因转移技术,建立了 LPL 基因缺陷的严重高甘油三酯(LK)小鼠模型,并应用于动脉硬化、胰腺炎和神经功能障碍的研究<sup>[6-8]</sup>。在本实验中,我们应用该小鼠模型作为接受体,通过骨髓移植的手段,比较了骨髓来源巨噬细胞的 LPL 对血浆脂代谢的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

C57/BL6 背景的 LK 小鼠由加拿大 Michael Hayden 实验室引进,6~8 周龄的 SPF 级雌性小鼠作为骨髓移植受体。SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠由北京大学医学部动物实验中心提供,6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠和雄性 LK 小鼠为骨髓供体。

### 1.2 骨髓移植及分组

断颈处死供体 C57BL/6 及 LK 小鼠,无菌条件下采集野生型(WT)小鼠和 LK 小鼠股骨及小腿骨。将股骨两端软骨剪去,露出红色的骨髓腔。用 1 mL 无菌注射器吸取含 2% 小牛血清及肝素的 RPMI 1640 液,轻轻插入骨髓腔,反复冲出骨髓腔内的骨髓,用 ACK 缓冲液溶解红细胞。PBS 洗涤 2 次,计数并用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度为  $1.7 \times 10^{10}$  个/L 备用。放射线照射前 5 天至移植后 1 周,受体小鼠均饮用加有新霉素(100 mg/L)和多粘菌素 B(10 mg/L)的灭菌蒸馏水(pH 5.2)。铯 137 放射源(Gama Cell 100Q Canada)由北京大学医学部辐照中心提供,采用 <sup>137</sup>Cs 全身照射,总剂量 1 000 rad,照射强度根据照射后小鼠存活率进行调整。将 11 只雌性 LK 受体小鼠随机分为两组,照射后 6 h 经尾静脉按照每只小鼠  $5 \times 10^6$  个分别输注 C57BL/6 及 LK 小鼠骨髓细胞。根据外周血白细胞数量变化评估骨髓移植的骨髓重建情况,受体小鼠出现雄性 Y 染色体 Marker 作为移植成功的依据。

### 1.3 甘油三酯及总胆固醇检测

甘油三酯检测试剂盒和胆固醇检测试剂盒由中生北控科技股份有限公司提供,具体方法参见试剂盒说明书,骨髓移植前和移植后每周检测受体鼠血浆甘油三酯及总胆固醇浓度。

### 1.4 脂蛋白酯酶活性测定

根据文献[9],小鼠按照 10 mU/g 剂量静脉注射肝素,10 min 后眼眶取血并在 4℃、12 000 r/min 离心 5 min 分离上层血浆,-20℃冻存。样品管中加入 10 μL 血浆、90 μL PBS 后加入含 3H 甘油三油酸酯、白蛋白、大鼠血浆作为激活物的底物混合液

100 μL,涡旋充分混匀,37℃水浴箱内 100 r/min 孵育 1 h。每管加入 3.25 mL 抽提液,再加入碳酸-硼酸缓冲液(中止液)1.05 mL,涡旋混匀 3 次,每次 15 s。室温下离心 3 000 r/min,15 min。吸取上清 1 mL,分别加入至计数瓶中,每瓶中加入 10 mL 闪烁液计数。LPL 活性(mU) = 净 CPM 值(样品管 - 空白管) × (1/孵育分钟数) × (1 × 10<sup>9</sup>/每 mol 底物 CPM 值)。

### 1.5 雄性性染色体标识物检测

取小鼠血浆,按照血液 DNA 提取试剂盒说明操作,提取血液中的基因组 DNA,测 DNA 浓度后,-20℃保存备用。针对小鼠 Y 染色体特异性基因序列设计上游引物:5'-TAC TCA CAG ACT GAT CCC CAG-3',下游引物:5'-AAG TGC AGT TTC ACC CAT CA-3'。在 0.5 mL 的 EP 管中加入双蒸水(ddH<sub>2</sub>O),上、下游引物,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸(deoxynucleosine triphosphate, dNTP)、10 倍稀释的缓冲液、DNA 和 Taq 酶,总体积为 25 μL。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)条件:94℃ 5 min,94℃ 40 min,56℃ 45 min,72℃ 1 min,30 个循环。血液 DNA 提取试剂盒由安徽优品生物工程有限公司提供,Taq 酶和 dNTP 以及 Marker 购自 Gene Star 公司。

### 1.6 脂蛋白快效液相色谱分析

采用美国 Amersham Biosciences 公司的快效液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)仪检测血浆脂蛋白谱,通过 0.22 μm 直径微型针筒式过滤筒过滤后的小鼠血浆 100 μL,在 Superose 6 HR10/30 色谱柱上样,以每分钟 0.5 mL 的速度自动收集分离组分,每个组份 500 μL,共收集 43 个组份。再参照甘油三酯和胆固醇试剂盒,检测各组份的甘油三酯和胆固醇的浓度,使用 Prism 软件制作血浆脂蛋白的分布图谱。

### 1.7 统计学分析

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 骨髓移植后受体小鼠 Y 染色体标识物检测

骨髓移植前后取受体小鼠的血样本,提取 DNA,用 PCR 进行性别鉴定。在雌性受体小鼠血样品检测到雄性 Y 染色体,说明供体骨髓移植到受体小鼠体内后骨髓重建成功(图 1)。

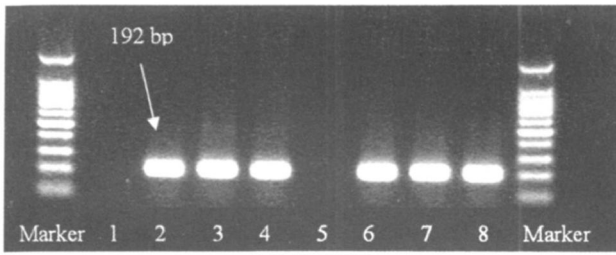


图 1 雌性小鼠血细胞雄性 Y 染色体 Marker 检测 1 为移植前雌性 LK 受体小鼠, 2~4 为骨髓移植后 LK<sup>→</sup>LK 组小鼠, 5 为 WT 雌性小鼠阴性对照, 6~8 为骨髓移植后 WT<sup>→</sup>LK 组小鼠。

### 2.2 骨髓移植后受体小鼠死亡率统计

受体鼠均采用 <sup>137</sup>Cs 全身照射, 总剂量 1 000 rad。将受体小鼠随机分为骨髓移植组(照射组)和对照组。骨髓移植组照射后 6 h 经尾静脉输注 C57BL/6 小鼠骨髓细胞, 对照组小鼠则不作处理。对照组小鼠在照射后 14 天内完全死亡, 表明照射剂量达到致死性, 符合实验要求。骨髓移植组小鼠均能存活 3 周以上, 表明骨髓移植成功(图 2)。

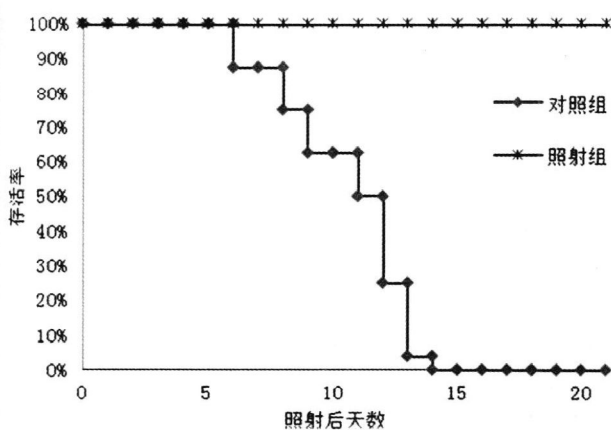


图 2 骨髓移植组与对照组小鼠经致死性照射后生存率比较

### 2.3 骨髓移植后受体鼠外周血白细胞计数的变化

骨髓移植后不同时间点对受体小鼠外周血白细胞进行计数, 并与正常小鼠比较。移植后 1 周, 外周血白细胞明显下降, 仅  $6.9 \times 10^7$  个/L, 第 2 周后白细胞计数开始增加, 第 4 周达到正常小鼠水平, 约  $6.6 \times 10^9$  个/L, 表明骨髓移植后 4 周小鼠骨髓造血系统和免疫系统恢复正常(图 3)。

### 2.4 血浆甘油三酯、血浆胆固醇及血浆脂蛋白酯酶活性检测

受体小鼠随机分为两组, 组间小鼠体重、年龄、血浆甘油三酯和总胆固醇水平均无差异, 分别输注 C57BL/6 及 LK 小鼠骨髓细胞。随骨髓移植时间延长, WT<sup>→</sup>LK 组小鼠血浆甘油三酯和总胆固醇逐渐降低。移植后第 4 周, 与 LK<sup>→</sup>LK 组小鼠相比, WT<sup>→</sup>LK 组小鼠血浆甘油三酯降低 83.2% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ), 血浆总胆固醇降低 74.4% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。WT<sup>→</sup>LK 组小鼠与移植前相比, 血浆甘油三酯降低 86.20% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ), 血浆总胆固醇降低 78.83% ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ ), 血浆 LPL 活性增加 4.5 倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。LK<sup>→</sup>LK 组小鼠骨髓移植前后血浆甘油三酯、总胆固醇和 LPL 活性均无明显差异(表 1)。

WT<sup>→</sup>LK 组小鼠与移植前相比, 血浆甘油三酯降低 86.20% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ), 血浆总胆固醇降低 78.83% ( $P < 0.01$ ,  $n = 4$ ), 血浆 LPL 活性增加 4.5 倍 ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ )。LK<sup>→</sup>LK 组小鼠骨髓移植前后血浆甘油三酯、总胆固醇和 LPL 活性均无明显差异(表 1)。

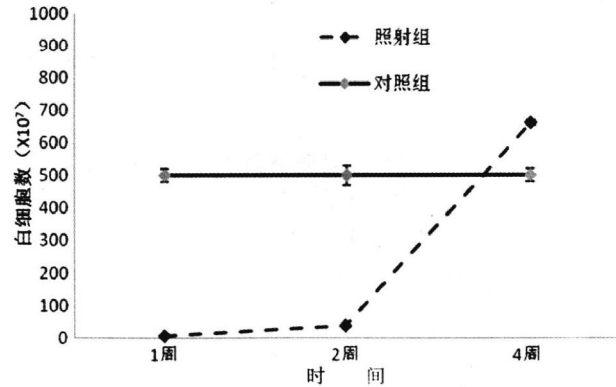


图 3 骨髓移植组与对照组小鼠外周血白细胞计数比较

表 1 两组小鼠移植前后血浆甘油三酯、血浆总胆固醇及血浆脂蛋白酯酶活性变化

时间(周)	分组	总胆固醇 (mg/L)	甘油三酯 (mg/L)	脂蛋白酯酶活性 (U/L)
0	WT <sup>→</sup> LK	3 718.6 ± 273.0	52 014.8 ± 13 373.3	10.56 ± 1.56
	LK <sup>→</sup> LK	3 315.4 ± 302.5	35 643.6 ± 19 902.7	18.35 ± 2.24
2	WT <sup>→</sup> LK	1 169.4 ± 204.3	15 961.7 ± 6 703.9	45.76 ± 8.67
	LK <sup>→</sup> LK	3 636.2 ± 423.9	44 713.4 ± 17 202.0	22.18 ± 3.45
4	WT <sup>→</sup> LK	787.1 ± 162.5 <sup>a,c</sup>	7 189.0 ± 1 237.5 <sup>a,b</sup>	58.65 ± 7.56 <sup>a,b</sup>
	LK <sup>→</sup> LK	3 074.5 ± 1 274.6	42 804.8 ± 16 255.0	22.04 ± 3.30

a 为  $P < 0.05$  与 LK<sup>→</sup>LK 组相比; b 为  $P < 0.05$  与移植前相比; c 为  $P < 0.01$  与移植前相比。

### 2.5 骨髓移植后受体鼠血浆脂蛋白组分的变化

用小鼠血浆作为样本, 通过 FPLC 方法测定血浆中不同组分的脂蛋白(图 4A), LK 小鼠体内无高密度脂蛋白组分, 移植 WT 小鼠骨髓后出现明显高密度脂蛋白的组分。骨髓移植后 LK 小鼠血浆胆固醇中极低密度脂蛋白明显降低。骨髓移植后 LK 小鼠血浆甘油三酯中极低密度脂蛋白明显降低(图 4B)。

## 3 讨论

尽管已有人应用骨髓移植方法, 证实巨噬细胞的 LPL 具有促进 A<sub>s</sub> 的作用, 但我们首次利用 LPL 缺陷的高 TG 小鼠模型作为接受体, 观察了巨噬细胞来源的 LPL 对 LK 小鼠严重高 TG 的影响<sup>[3]</sup>。我

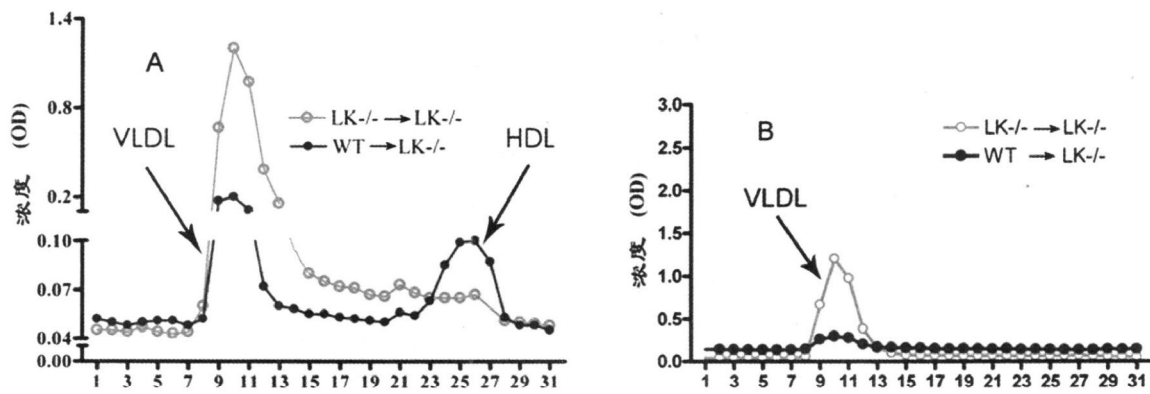


图 4 两组小鼠血浆不同组分脂蛋白比较 A 为胆固醇, B 为甘油三酯。

们首先从受体和供体小鼠年龄的选择、放射线照射剂量的调整、骨髓移植效果的评估等多方面对骨髓移植实验的各个环节进行优化,成功的对 LK 小鼠骨髓进行了重建,从而能特异性研究骨髓巨噬细胞来源的 LPL 的作用。本研究具有重要创新意义的发现是骨髓来源的 LPL 能够明显改善严重的高 TG 血症,经过仅仅 4 周的时间,虽然肝素后血浆的 LPL 活性增加了仅 2 倍,但 WT $\rightarrow$ LK 小鼠的血浆 TG 则降低了 6 倍。FPLC 对脂蛋白谱的分析表明,乳糜微粒/极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 中 TG 和胆固醇明显减少,为整颗粒的清除增强。同时高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 峰也显著增大,说明在骨髓来源的 LPL 作用下, HDL 的生成也增多。

Babaev 和 Wilson 等<sup>[3-5]</sup> 研究分别是以野生型、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受体缺陷或载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因缺陷小鼠作为接受体,因此骨髓移植后巨噬细胞来源的 LPL 缺失对整体的 LPL 的活性没有明显影响,对血浆脂蛋白代谢的影响也不大。而我们的实验由于是在 LPL 活性水平很低的状态下进行比较, LK 小鼠在接受了野生型小鼠骨髓后,整体的 LPL 活性虽然仍较野生型为低,但与接受了 LK 骨髓的小鼠相比就有明显的升高。Hussain 等<sup>[10]</sup> 以往的研究表明,骨髓具有一定清除乳糜微粒的功能。他们将同位素标记的乳糜微粒注入犬、家兔以及其它动物体内后,发现除了肝脏,骨髓也是一个主要摄取标记同位素的部位。当然由于所选用的动物都是 LPL 活性正常,血浆富含 TG 脂蛋白会迅速代谢,因此并不能从质量分析中得出骨髓在富含 TG 脂蛋白代谢中所起的作用。

本研究的另一个重要意义是,尽管生理状态下

骨髓来源的 LPL 活性不高,但在严重高 TG 的病理情况时,将有可能发挥明显的减轻高甘油三酯血症的作用。已知严重高 TG 血症的主要并发症是复发性胰腺炎,其导致的出血坏死性胰腺炎常常是致命的。因此,骨髓移植将有可能作为严重高 TG 血症复发性胰腺炎防治的一种新方法。当然,这需要进一步的实验研究进行验证。

#### [参考文献]

- [1] Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation [J]. *Science* 1995; **267** (5200): 1 034-037.
- [2] Linton MF, Fazio S. Macrophages, lipoprotein metabolism, and atherosclerosis: insights from murine bone marrow transplantation studies [J]. *Curr Opin Lipidol* 1999; **10** (2): 97-105.
- [3] Babaev VR, Fazio S, Gleaves LA, et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo [J]. *J Clin Invest* 1999; **103** (12): 1 697-705.
- [4] Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2000; **275** (34): 26 293-299.
- [5] Wilson K, Fry GL, Chappell DA, et al. Macrophage-specific expression of human lipoprotein lipase accelerates atherosclerosis in transgenic apolipoprotein E knockout mice but not in C57BL/6 mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21** (11): 1 809-815.
- [6] Zhang X, Qi R, Xian X, et al. Spontaneous atherosclerosis in aged LPL-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet [J]. *Circ Res* 2008; **102**: 250-256.
- [7] Xian X, Liu T, Yu J, et al. Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice [J]. *J Neurosci* 2009; **29** (14): 4 681-685.
- [8] Wang Y, Stemfeld L, Yang F, et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells [J]. *Gut* 2009; **58**: 422-430.
- [9] 张爱宏, 刘国庆. 放射性同位素标记法检测脂蛋白脂肪酶活性及其应用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003; **11** (6): 573-576.
- [10] Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, et al. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits: Factors that modify tissue-specific uptake [J]. *J Biol Chem*, 1989; **264** (16): 9 571-582.

(此文编辑 曾学清)