

本文引用: 刘意秋, 耿长鑫, 王蕾, 等. 获得富含胆固醇脂蛋白颗粒的单步密度梯度离心法[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(4): 344-351. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.04.008.

· 方法学研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2026)34-04-0344-08

## 获得富含胆固醇脂蛋白颗粒的单步密度梯度离心法

刘意秋<sup>1,2</sup>, 耿长鑫<sup>3</sup>, 王蕾<sup>1</sup>, 张昭强<sup>3</sup>, 张亚<sup>4</sup>, 谢丽丽<sup>4</sup>, 杨泽<sup>4</sup>, 张科<sup>5</sup>, 于杨<sup>2</sup>, 张继国<sup>1</sup>

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)药学院(药物研究所), 2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(省实验动物中心), 3. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院, 山东省济南市 250117; 4. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)第二附属医院, 山东省泰安市 271000; 5. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)附属省立医院, 山东省济南市 250021

**[摘要]** **[目的]** 建立获得富含胆固醇的非高密度脂蛋白(CR-nHDL)颗粒的单步密度梯度离心法,并探究氧化CR-nHDL促泡沫细胞形成的效果。**[方法]** 采用碘佛醇作为密度介质建立单步密度梯度离心法,从健康志愿者餐后血浆中分离出密度小于1.008 g/mL的CR-nHDL,测定其组分密度,通过酶学法检测胆固醇含量,利用Western blot和蛋白组学分析检测颗粒中的脂蛋白含量。将分离得到的CR-nHDL氧化后与小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)共培养,并与氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的作用进行比较,通过细胞内脂质蓄积量评估氧化CR-nHDL诱导巨噬细胞泡沫化的能力。**[结果]** 本法可获得密度小于1.008 g/mL的CR-nHDL。Western blot结果显示,该组分中含有载脂蛋白B100(ApoB100)和载脂蛋白B48(ApoB48),但不含有载脂蛋白A I(ApoA I)。蛋白组学分析结果显示,采用碘佛醇单步法制备的CR-nHDL与经典两步法制备的低密度脂蛋白(LDL)在主要载脂蛋白成分上无显著差异;脂质组学分析结果显示,碘佛醇单步法制备的CR-nHDL中胆固醇酯含量显著高于经典两步法制备的LDL,这提示该方法富集含胆固醇脂蛋白颗粒的效率更高,且由此获得的CR-nHDL经氧化后,相比ox-LDL更能促进巨噬细胞源性泡沫细胞内的脂质蓄积。**[结论]** 碘佛醇单步密度梯度离心法可快速获取CR-nHDL,其氧化形式具有更强的促巨噬细胞泡沫化能力。

**[关键词]** 单步密度梯度离心法; 富含胆固醇的非高密度脂蛋白; 泡沫细胞; 碘佛醇; 动脉粥样硬化

**[中图分类号]** R5;Q-33

**[文献标识码]** A

### Single-step density gradient centrifugation method for obtaining cholesterol-rich lipoprotein particles

LIU Yiqiu<sup>1,2</sup>, GENG Changxin<sup>3</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, ZHANG Zhaoqiang<sup>3</sup>, ZHANG Ya<sup>4</sup>, XIE Lili<sup>4</sup>, YANG Ze<sup>4</sup>, ZHANG Ke<sup>5</sup>, YU Yang<sup>2</sup>, ZHANG Jiguo<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy(Institute of Materia Medica), 2. School of Laboratory Animal(Shandong Laboratory Animal Center), 3. School of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University(Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan, Shandong 250117, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Tai'an, Shandong 271000, China; 5. Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan, Shandong 250021, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To establish a single-step density gradient centrifugation method for isolating cholesterol-rich non-high density lipoprotein (CR-nHDL) particles and investigate the effect of oxidized CR-nHDL on foam cell formation.

**Methods** A single-step density gradient centrifugation method using ioversol as the density medium was established to iso-

**[收稿日期]** 2025-12-01

**[修回日期]** 2026-01-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81970385);山东省自然科学基金项目(ZR2023MH361、ZR2022MH202);山东省医药卫生科技发展计划项目(202002040923);泰安市科技发展计划引导项目(2020NS232);泰安市发展创新发展项目(2023NS379);泰安市农业和社会发展领域科技创新发展项目(2024NS463)

**[作者简介]** 刘意秋,硕士研究生,研究方向为脂类代谢与动脉粥样硬化相关疾病,E-mail:408603062@qq.com。耿长鑫,本科在读,研究方向为脂类代谢与动脉粥样硬化相关疾病,E-mail:changxingenggex@163.com。刘意秋和耿长鑫为并列第一作者。通信作者于杨,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为脂类代谢与动脉粥样硬化相关疾病,E-mail:yyu@sdfmu.edu.cn。通信作者张继国,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管药理和神经精神药物药理学,E-mail:jiguotsmc@163.com。

late CR-nHDL with a density of less than 1.008 g/mL from postprandial plasma of healthy volunteers. The density of the fraction was measured, and the cholesterol content was detected enzymatically. The lipoprotein content in the particles was analyzed by Western blot and proteomics. The isolated CR-nHDL was oxidized and co-cultured with mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM), and its effect was compared with that of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

The ability of oxidized CR-nHDL to induce macrophage foam cell formation was assessed by measuring intracellular lipid accumulation. **Results** This method successfully isolated CR-nHDL with a density of less than 1.008 g/mL. Western blot results showed that this fraction contained apolipoprotein B100 (ApoB100) and apolipoprotein B48 (ApoB48) but not apolipoprotein A I (ApoA I). The results of proteomic analysis showed that there was no significant difference in the major apolipoprotein components between CR-nHDL prepared by ioversol method and low density lipoprotein (LDL) prepared by classical two-step method; lipidomics analysis results showed that the cholesterol ester content in the CR-nHDL prepared by the ioversol method was significantly higher than that in the LDL prepared by the classical method, which suggested that this method was more efficient in enriching cholesterol-containing lipoprotein particles, and the oxidized CR-nHDL obtained from this method could promote lipid accumulation in macrophage derived foam cells more than ox-LDL.

**Conclusion** The single-step density gradient centrifugation of ioversol can quickly isolate CR-nHDL, and its oxidized form has a stronger ability to promote macrophage foam cell formation.

[**KEY WORDS**] single-step density gradient centrifugation method; cholesterol-rich non-high density lipoprotein cholesterol; foam cell; ioversol; atherosclerosis

动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular diseases, ASCVD)是一种以动脉粥样硬化为主要病理基础的慢性炎症性疾病,在其发病机制中,脂质代谢紊乱发挥着核心作用<sup>[1]</sup>。近年来,残余胆固醇与低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)并列,被视为 ASCVD 发展的致病性危险因素<sup>[2]</sup>。这些颗粒可侵入并滞留在动脉内膜,被巨噬细胞吞噬后会驱动泡沫细胞形成,进而加速斑块的形成与发展<sup>[3]</sup>。目前,临床实践中对残余胆固醇的定量仍依赖于间接推算<sup>[4]</sup>,不仅缺乏能够直接测量的标准化方法,更无法直接评估其促泡沫细胞形成作用。本研究拟优化密度梯度离心法,获得健康志愿者餐后血浆中富含胆固醇的非高密度脂蛋白(cholesterol-rich non-high density lipoprotein, CR-nHDL)颗粒,通过组学评估该颗粒成分,并检测其氧化后促泡沫细胞形成的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、试剂与仪器

6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司。小鼠饲养于无特定病原体环境中,室内温度湿度恒定,并维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律,饲喂标准啮齿类饲料。所有动物实验均遵循现行动物福利伦理准则,并经由山东第一医科大学动物实验伦理委员会批准,批准号为 W202211230334。

健康人血浆样本来自近期在山东第一医科大

学第二附属医院参与研究的志愿者。相关实验程序在山东第一医科大学第二附属医院伦理审查委员会的监督与指导下开展,伦理批准号为 2022-162,本研究的临床试验注册号为 ChiCTR2300077726。

超高速冷冻离心机、超速离心管(贝克曼库尔特国际贸易有限公司);电泳仪(韦克斯科技有限公司);高通量三通道读板仪(广州索璞生物科技有限公司);光学显微镜(广州明美光电技术有限公司);油红 O 染色液、透析袋 MD34(北京索莱宝科技有限公司);PVDF 膜、24 孔细胞培养板、4% 多聚甲醛及细胞培养瓶(武汉塞维尔生物科技有限公司);DMEM 培养液、CCK-8、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司);蛋白上样缓冲液、Omni-ECL 超灵敏化学发光检测试剂盒、BCA 蛋白试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);异丙醇(天津富宇精细化工有限公司);载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I) 多克隆抗体(赛默飞世尔科技有限公司);载脂蛋白 B (apolipoprotein B, ApoB) 多克隆抗体和载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 多克隆抗体(爱博泰克生物);胆固醇测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);35% (w/v) 碘佛醇注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司);重组小鼠单核细胞集落刺激因子(翌圣生物科技股份有限公司)。

### 1.2 脂蛋白颗粒的制备与纯化

向超速离心管中加入 9 mL 碘佛醇-血浆溶液(最终密度为 1.067 g/mL),并小心地将 3 mL 碘佛醇溶液(最终密度为 1.008 g/mL)置于上层。将离心管置于接近水平的转子中,并确保其处于平衡状

态,随后在超高速冷冻离心机中以 288 200 g、4 ℃ 的条件离心 17 h。离心结束后,小心取出离心管,避免扰动样品,收集中间层的脂蛋白颗粒<sup>[5]</sup>。将收集到的脂蛋白颗粒置于含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 溶液中透析 24 h。随后用 PBS 溶液透析去除 EDTA,透析时长同样为 24 h,期间每 4 h 更换一次透析液,整个过程均在 4 ℃ 条件下进行。之后,将透析后的脂蛋白颗粒转移至 EP 管中,采用 BCA 法测定蛋白浓度,充入氮气后于 4 ℃ 保存,以备后续使用。

### 1.3 脂蛋白颗粒的氧化修饰

在不超过 25 ℃ 的条件下,采用高频超声(412 kHz, 40 W)处理 10 min 制备氧化型脂蛋白颗粒,经滤菌后充入氮气,于 4 ℃ 避光保存备用<sup>[6]</sup>。其氧化程度通过丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒检测。

### 1.4 泡沫细胞模型的诱导与鉴定

**1.4.1 细胞培养** 从雄性 C57BL/6J 小鼠的胫骨和股骨中分离骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM),并将其置于含完全巨噬细胞培养基(由 DMEM、10% 热灭活胎牛血清及 25 μg/L 巨噬细胞集落刺激因子组成)的无菌培养皿中培养;细胞提取后第 3 天更换培养基,第 5 天接种至细胞培养板。所有细胞均置于 37 ℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

**1.4.2 诱导泡沫细胞形成** 将培养瓶中贴壁的 BMDM 重新悬浮于培养液中,随后以每孔  $5 \times 10^4$  的细胞密度接种至 24 孔细胞培养板,每孔加入培养液至 0.5 mL,置于含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,在 37 ℃ 恒温条件下培养过夜。待细胞用不含血清的高糖培养液培养 12 h 后,向每孔中加入 100 mg/L 脂蛋白颗粒。实验分为对照组和实验组:对照组分为 LDL 组和 CR-nHDL 组,其中 LDL 组加入 100 mg/L LDL, CR-nHDL 组加入 100 mg/L CR-nHDL;实验组分为 ox-LDL 组和 ox-CR-nHDL 组,其中 ox-LDL 组加入 100 mg/L ox-LDL, ox-CR-nHDL 组加入 100 mg/L ox-CR-nHDL。每个处理组设置 3 个孔,将培养板置于 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,在 37 ℃ 恒温环境下孵育 48 h。孵育结束后,在显微镜下观察各组细胞形态,并结合油红 O 染色结果、细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC)及游离胆固醇(free cholesterol, FC)的含量,通过胆固醇酯(cholesterol ester, CE)与 TC 的比值是否大于 50% 来判断泡沫细胞模型的诱导是否成功<sup>[7]</sup>。

**1.4.3 CCK-8 细胞活力检测** 取 BMDM 以每孔 10 000 个细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中,培养过夜。实验分为对照组和实验组:对照组分为 LDL 组和 CR-nHDL 组,其中 LDL 组加入 100 mg/L LDL,

CR-nHDL 组加入 100 mg/L CR-nHDL;实验组分为 ox-LDL 组和 ox-CR-nHDL 组,其中 ox-LDL 组使用 100 μL 剂量为 100 mg/L、经超声氧化后的经典两步法制备的 LDL(即 ox-LDL)诱导细胞;ox-CR-nHDL 组使用 100 μL 剂量为 100 mg/L、经超声氧化后的碘佛醇单步法制备的 CR-nHDL(即 ox-CR-nHDL)诱导细胞,两组均在培养箱中孵育 48 h。孵育结束后,弃去旧培养液,用 PBS 清洗 1 次,每孔加入 100 μL 新鲜培养液和 10 μL CCK-8 溶液,继续孵育 1~4 h。使用酶标仪在波长 450 nm 处测定各孔的吸光度值,并计算各组细胞存活率,细胞存活率=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%<sup>[8]</sup>。

**1.4.4 油红 O 染色测定细胞内脂质蓄积** 取 1.4.2 中诱导的各组细胞,弃去上清液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min。随后用 PBS 再次洗涤细胞 2 次,加入 60% 异丙醇进行分化处理。之后加入油红 O 染色液浸染 30 min,操作过程中需注意避光。用蒸馏水洗去浮色后,在光学显微镜下观察各组细胞内脂质蓄积情况,其中鲜红色部分为脂滴<sup>[6]</sup>。

### 1.5 Western blot 检测蛋白表达水平

取 1.2 中制备的脂蛋白颗粒,依次加入蛋白上样缓冲液与含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,于 95 ℃ 下变性 15 min。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离蛋白质,并电转移至 PVDF 膜上。取下转膜后的 PVDF 膜,置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中,室温封闭 2 h。封闭完成后,4 ℃ 过夜孵育一抗,经 TBST 缓冲液漂洗 3 次,再将膜放入相应二抗中室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,最后通过 ECL 化学发光法检测目的蛋白的表达水平。

### 1.6 蛋白质组学和脂质组学分析

蛋白质与脂质组学数据的生物信息学分析通过 Majorbio Cloud 平台完成。采用 R 语言 *t*-test 包计算两组间的 *P* 值与差异倍数(fold change, FC),并设定差异倍数阈值(>1.2 或 <0.83)且 *P*<0.05 作为差异表达的筛选标准。主成分分析(principal component analysis, PCA)通过 R 软件包 ropls (Version 1.6.2) 进行,同时利用 7 次循环交互验证评估模型的稳定性。

### 1.7 统计学分析

使用 Image J 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件对所有数据进行统计分析和绘图。实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 比较碘佛醇单步法与经典两步法制备脂蛋白颗粒的差异

超速离心法是制备脂蛋白颗粒最常用的方法,其原理基于脂蛋白颗粒的密度差异,通过调整溶液的密度梯度,借助超速离心机产生的高离心力,可实现不同脂蛋白组分的分离。经典两步法的操作流程如下:首先在 4℃ 条件下对血浆样本进行首次离心,使乳糜微粒(chylomicron, CM)和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)在离心过程中上浮至管顶,形成清晰的脂质层。随后,将分离后的剩余血浆样本与密度调节介质溴化钾溶液混合,将混合液密度调整至 1.063 g/mL,并在相同条件下进行二次离心,此时脂蛋白颗粒会形成特征性的黄色条带<sup>[9-10]</sup>。因去除了血浆中的 CM、VLDL 组分,导致无法分离出完整的非高密度脂蛋白颗粒。基于人群的研究发现,非高密度脂蛋白颗粒胆固醇和 ApoB 水平作为 ASCVD 风险标志物<sup>[11-12]</sup>均被证

明优于低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。本研究通过向超速离心管中先加入 9 mL 密度为 1.067 g/mL 的碘佛醇-血浆溶液,再小心地将 3 mL 密度为 1.008 g/mL 的碘佛醇溶液铺于上层。将离心管置于超高速冷冻离心机中,在 288 200 g、4℃ 条件下离心 17 h 后,收集中间呈淡黄色的脂蛋白颗粒<sup>[5]</sup>,成功建立了一种基于碘佛醇为密度介质的单步密度梯度离心法(图 1A)。该方法无需预先去除其他脂蛋白组分,可直接通过一步操作快速分离出脂蛋白颗粒,其特征性黄色条带与经典两步法分离出的脂蛋白颗粒一致,且密度小于 1.008 g/mL(图 1B 和 1C)。通过酶学法检测各组制备的不同脂蛋白组分中的胆固醇含量,结果表明碘佛醇单步法制备的 CR-nHDL 中胆固醇含量与经典两步法制备的 LDL 无显著差异(图 1D 和 1E)。该方法简化了操作步骤,将总离心时间缩短约 6 h,血浆上样量仅为经典两步法的 60%,但制备的脂蛋白颗粒中胆固醇的含量却能达到与经典两步法相当的水平。

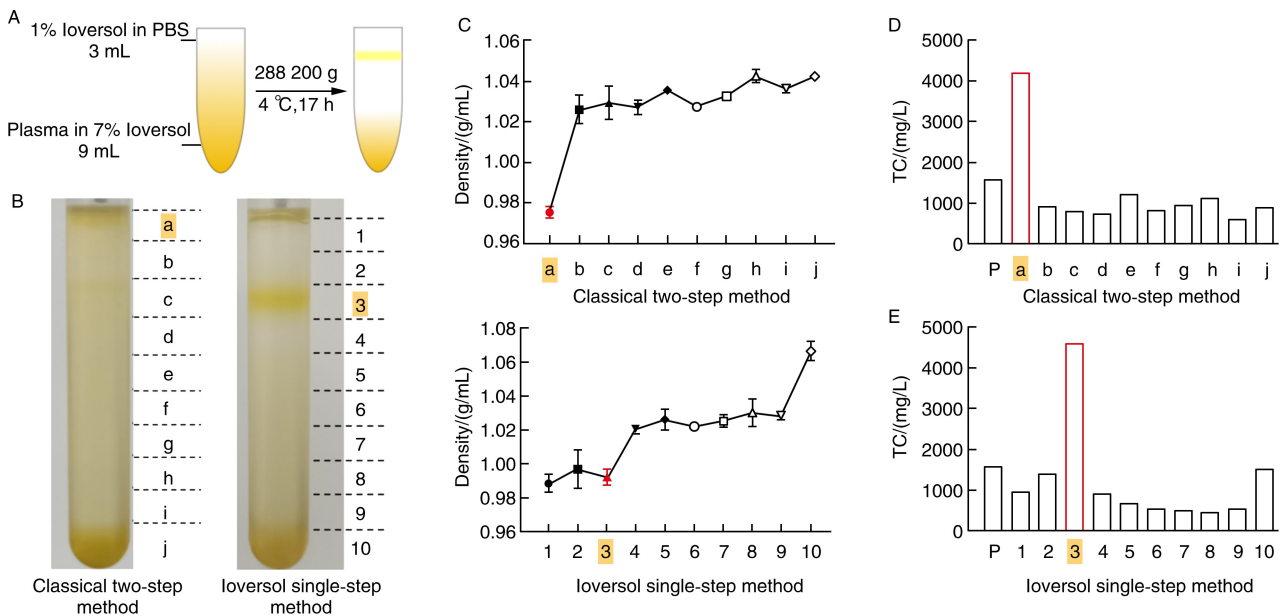


图 1. 比较经典两步法和碘佛醇单步法制备的脂蛋白颗粒的外观颜色、密度及 TC 含量

A 为碘佛醇单步密度梯度离心法流程图;B 为经典两步法和碘佛醇单步法获得的脂蛋白颗粒外观颜色,a-g 表示将经典两步法分离后获得的每毫升组分,分别检测各组分中密度和 TC 含量,其中 a 为经典两步法获得的 LDL;1-10 表示将碘佛醇单步法分离后获得的每毫升组分,分别检测各组分中中密度和 TC 含量,其中第 3 层为碘佛醇单步法获得的 CR-nHDL; C 为检测血浆离心后各组获得的不同脂蛋白组分的密度(n=3);D 为检测经典两步法离心血浆后获得的不同脂蛋白组分的 TC 含量;E 为检测碘佛醇单步法离心血浆后获得的不同脂蛋白组分的 TC 含量。P: 正常人血浆。

Figure 1. Comparison of color, density and TC content of lipoprotein particles prepared by the classical two-step method and the ioversol single-step method

### 2.2 评估碘佛醇单步法制备的脂蛋白颗粒中主要载脂蛋白的表达水平

载脂蛋白是血浆脂蛋白的重要结构组成部分,

通过调节脂蛋白代谢,影响正常人体血管生物学和 ASCVD 的病理生理变化。与脂质代谢和动脉粥样硬化生成相关的主要载脂蛋白包括 ApoB100、

ApoB48、ApoAI及 ApoE 等,其中,ApoB100 是 VLDL 和 LDL 的主要结构成分<sup>[13]</sup>;ApoB48 是 ApoB100 的截断异构体,是构成 CM 的骨架<sup>[14]</sup>;ApoAI调控高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)代谢并逆转胆固醇转运;ApoE 参与富集甘油三酯的脂蛋白代谢。本研究采用 Western blot 对碘佛醇单步法分离得到的不同脂蛋白组分中主要载脂蛋白的水平进行分析,结

果显示,第3层脂蛋白颗粒在富集胆固醇的同时,呈现出最强的 ApoB100 信号,且同时检测到 ApoB48,这表明该方法未遗漏 VLDL 和 CM 残粒;与经典两步法在第一步即弃去最上层 CM 和 VLDL 的操作相比,该方法能够高效保留包括 VLDL、CM 残粒在内的残余胆固醇。此外,未检测到 ApoAI的表达,这进一步证实该方法成功分离出了 CR-nHDL(图2)。

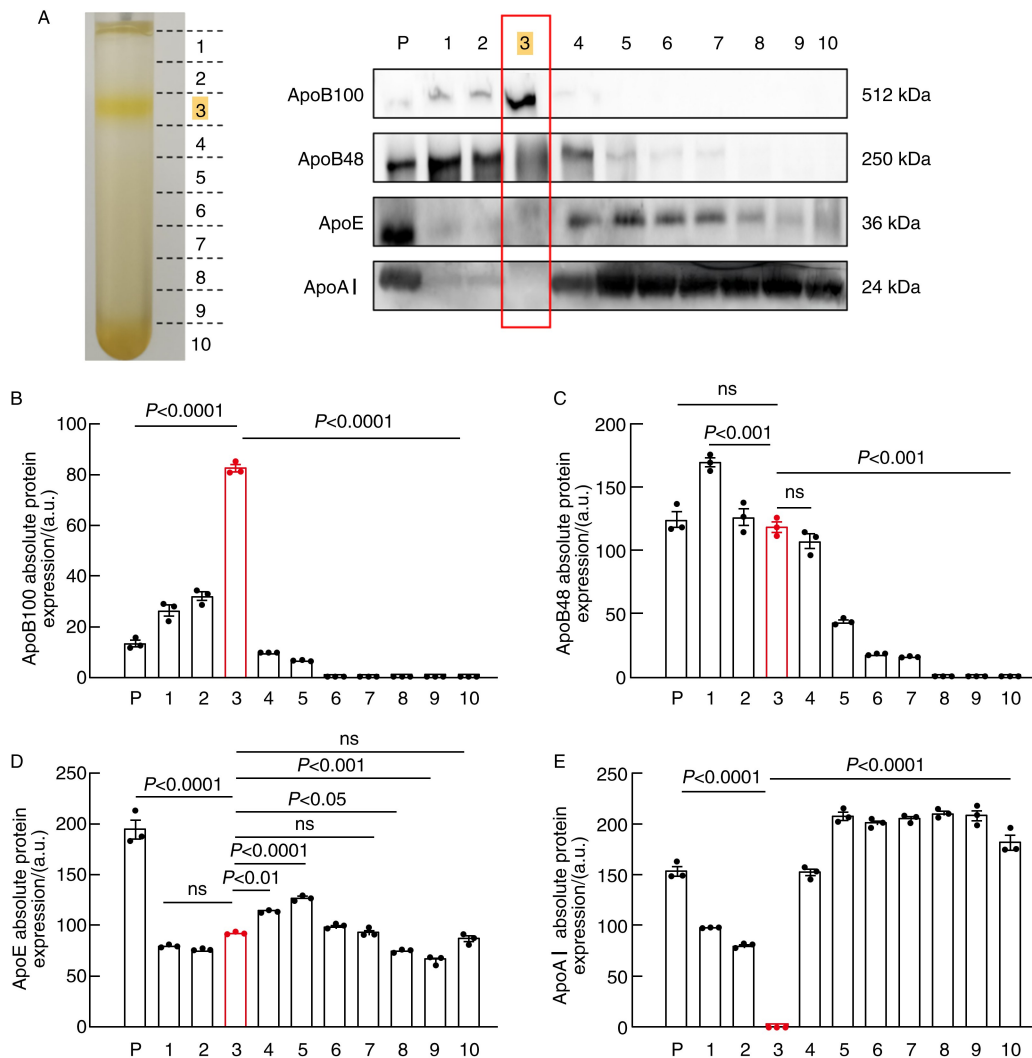


图2. 评估碘佛醇单步法制备的脂蛋白颗粒中 ApoB100、ApoB48、ApoE 及 ApoA I 的水平

A 为检测碘佛醇单步法获得的不同脂蛋白组分中主要载脂蛋白的表达水平;B-E 为 ApoB100、ApoB48、ApoE 及 ApoA I 蛋白印迹条带的光学密度统计结果。 $n=3$ 。1-10 表示将碘佛醇单步法分离后获得的每毫升组分,分别检测各组分中中密度和 TC 含量,其中第3层为碘佛醇单步法获得的 CR-nHDL。P: 正常人血浆。

Figure 2. Assessment of the expression levels of ApoB100, ApoB48, ApoE and ApoA I in lipoprotein particles prepared by the ioversol single-step method

### 2.3 脂蛋白颗粒的蛋白质组学和脂质组学分析

PCA 检测结果显示,碘佛醇单步法样本的均一性高于经典两步法(图3A)。火山图定量分析结果显示,主要载脂蛋白 ApoB、ApoE、ApoC 等均无显著差异(图3B);在差异蛋白中,碘佛醇单步法中有 21

种蛋白(FCN2 等)显著高于经典两步法,55 种蛋白(RBPR、IGFBP5 等)显著低于经典两步法。脂质组学 PCA 分析同样显示,碘佛醇单步法样本分布更为集中,均一性和重复性优于经典两步法(图3C)。定量分析显示,碘佛醇单步法制备的 CR-nHDL 中

CE 含量显著高于经典两步法。由于 CE 作为胆固醇在脂蛋白颗粒内部的主要存在形式,提示该方法

富集含胆固醇的脂蛋白颗粒的效率更高。

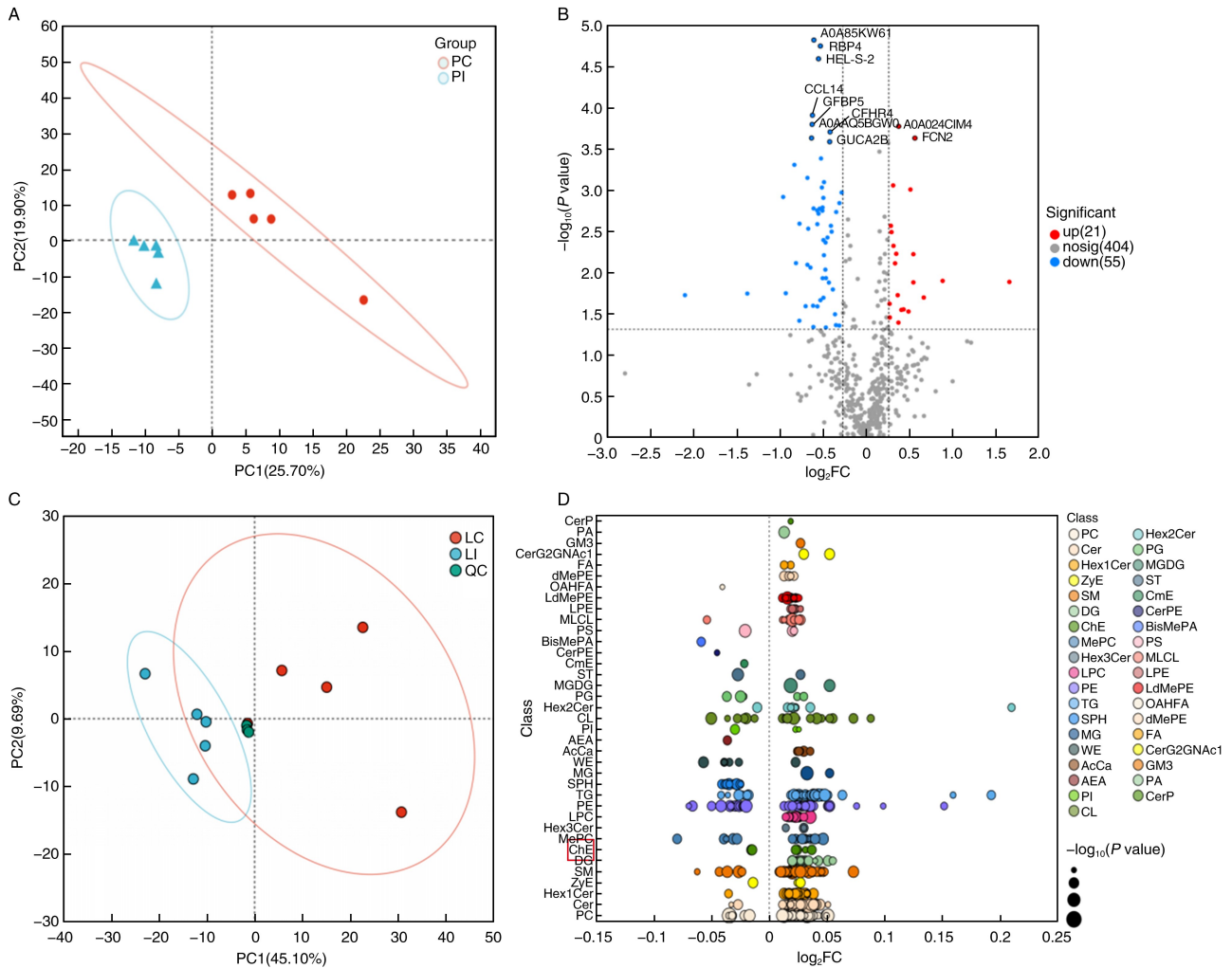


图 3. 比较经典两步法和碘佛醇单步法获得的脂蛋白颗粒的蛋白质组学和脂质组学分析

A 为蛋白 PCA 分析;B 为蛋白火山图分析;C 为脂质 PCA 分析;D 为脂质差异分析气泡图。n=3。PC:经典两步法获得的 LDL 的蛋白质组学;PI:碘佛醇单步法获得的 CR-nHDL 的蛋白质组学;LC:经典两步法获得的 LDL 的脂质组学;LI:碘佛醇单步法获得的 CR-nHDL 的脂质组学。

Figure 3. Comparison of proteomic and lipidomic analyses of lipoprotein particles obtained by the classical two-step method and the ioversol single-step method

### 2.4 小鼠 BMDM 源性泡沫细胞形成

CCK-8 细胞活力检测结果显示,经氧化处理的脂蛋白颗粒诱导后,BMDM 的存活率与对照组相近,表明采用该方法制备的脂蛋白颗粒对 BMDM 无明显细胞毒性(图 4H)。利用 MDA 对 ox-LDL 和 ox-CR-nHDL 的氧化水平进行了定量检测,结果显示,经超声氧化处理后,两者的 MDA 水平均显著高于对照组,表明氧化成功(图 4G)。本研究观察到,经 100 mg/L 氧化脂蛋白颗粒处理后的 BMDM 体积显著增大,细胞形态由不规则伸展状转变为圆形或椭圆形,胞质内出现大量透亮空泡,呈现典型的泡沫状外观。经油红 O 染色后,观察到各实验组 BMDM 的细

胞质内充满鲜红色脂滴,其中 ox-CR-nHDL 组 BMDM 内的脂滴蓄积量显著高于 ox-LDL 组(图 4A-B)<sup>[6,15]</sup>。固定 BMDM 后,使用异丙醇提取脂质,通过在 520 nm 处测量吸光度来量化细胞内脂质。结果表明,与对照组相比,各实验组的 OD<sub>520 nm</sub> 值均显著升高,且 ox-CR-nHDL 组的 OD<sub>520 nm</sub> 值显著高于 ox-LDL 组(图 4C)。细胞泡沫化的另一显著特征是细胞内 TC 含量明显升高,且 CE/TC 比值超过 50%。通过检测细胞内 TC 及 FC 含量,结果显示实验组 TC 含量显著上升,且 CE/TC 比值均大于 50%,表明泡沫细胞模型成功建立(图 4D-F)。上述结果表明,ox-CR-nHDL 促泡沫细胞形成的效果更明显。

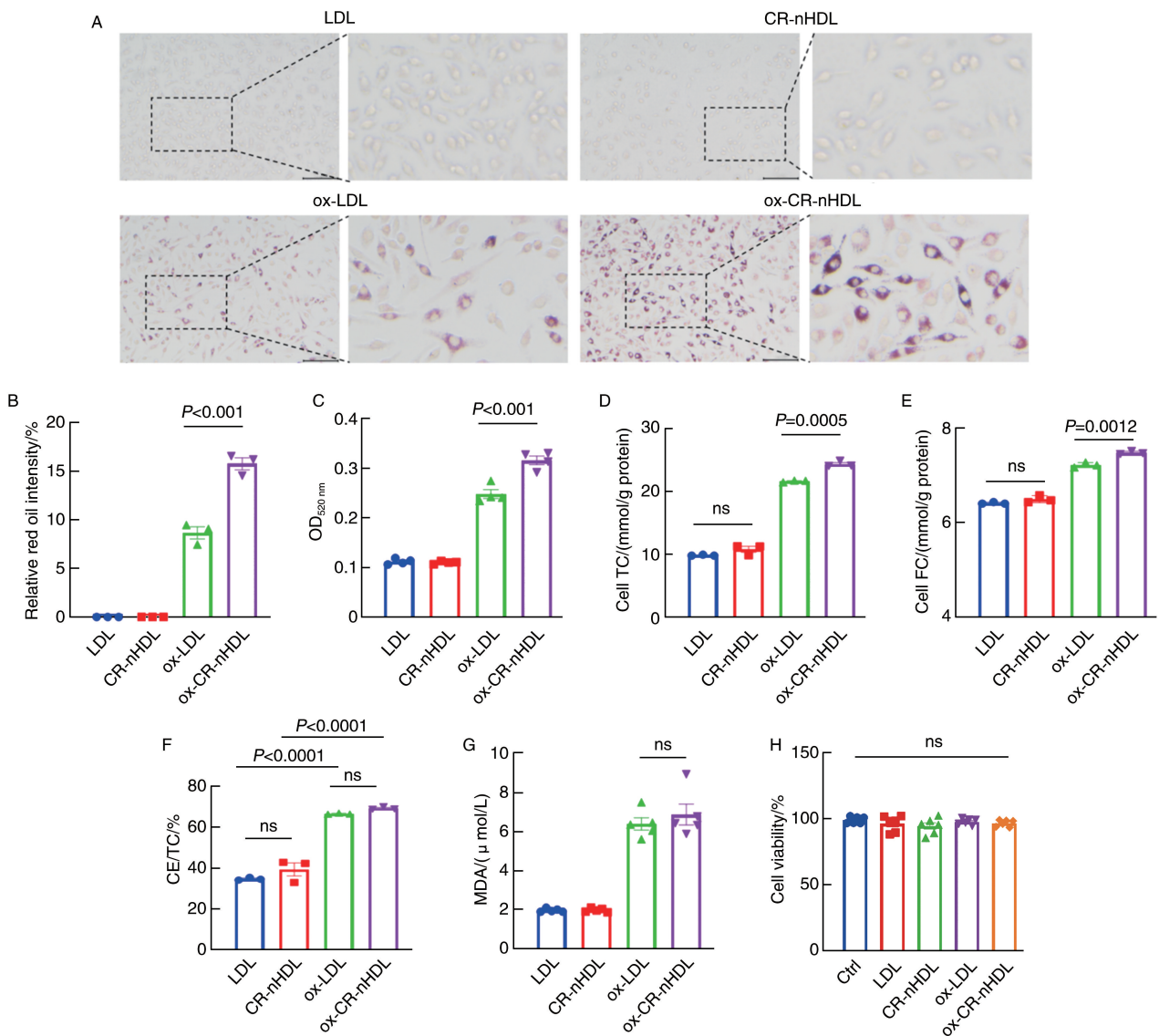


图 4. 氧化修饰的脂蛋白颗粒诱导 BMDM 源性泡沫细胞形成

A、B 为油红 O 染色及定量分析 ( $n=3$ ), 标尺 = 100  $\mu$ m; C 为油红 O 含量测定的异丙醇提取物在 520 nm 处的吸光度值 ( $n=3$ ); D 为各组 BMDM 内 TC 含量 ( $n=3$ ); E 为各组 BMDM 内 FC 含量 ( $n=3$ ); F 为各组 BMDM 内 CE/TC 比值 ( $n=3$ ); G 为经超声氧化后的脂蛋白颗粒的氧化程度, 以 MDA 表达水平表示 ( $n=4$ ); H 为 CCK-8 检测各组氧化的脂蛋白颗粒对 BMDM 的细胞毒性作用, 以细胞存活率评估 ( $n=5$ )。

Figure 4. Oxidized lipoprotein particles induce the formation of BMDM-derived foam cells

### 3 讨论

多项临床试验发现, 即使显著降低 LDLC 水平, 患者仍面临 ASCVD 残余风险<sup>[16-18]</sup>。非高密度脂蛋白胆固醇相较于 LDLC, 具有更强的 ASCVD 风险预测能力<sup>[19]</sup>, 其中包含了 VLDL 和 CM 残粒所携带的胆固醇, 即残余胆固醇。有研究发现, 残余胆固醇每升高 1 mmol/L, 冠心病风险会增加 15%, 这一风险增幅高于 LDLC 升高带来的冠心病风险; 同时, 残余胆固醇与 ApoB 的比值高于 LDLC 与 ApoB 的比值, 提示每个脂蛋白颗粒携带的胆固醇更多, 因此具有更强的致动脉粥样硬化作用<sup>[20]</sup>。为探究包含

残余胆固醇脂蛋白在内的非高密度脂蛋白颗粒的成分及潜在病理生理学作用, 本课题组开发了一种以碘佛醇为密度介质的单步密度梯度离心法。该方法在碘克沙醇法的基础上, 通过更换密度介质为碘佛醇, 可从健康志愿者餐后血浆中高效分离 CR-nHDL<sup>[5]</sup>。研究表明, 与经典两步法相比, 该方法不仅简化了操作步骤, 还将总离心时间缩短约 6 h, 血浆上样量仅为经典两步法的 60%, 通过酶学法检测发现制备的 CR-nHDL 中胆固醇含量与经典两步法制备的 LDL 无明显差异, 能够保留包括 LDL、CM 残粒在内的多种富含胆固醇的致动脉粥样硬化的脂蛋白颗粒组分, 表明该方法制备的 CR-nHDL 中更适

于探究胆固醇对心血管风险的机制研究。

碘佛醇单步法分离得到的脂蛋白颗粒组分中同时存在 ApoB100 和 ApoB48, 且不含 ApoA I。表明该方法不仅分离了富含 ApoB 的颗粒, 还有效排除了 HDL 颗粒的污染, 明确了所获组分为非高密度脂蛋白颗粒; 同时, 该方法能够有效保留并富集包含 LDL、VLDL(含 ApoB100)、CM 残粒(含 ApoB48) 在内的致动脉粥样硬化的脂蛋白颗粒。与临床实践中将非高密度脂蛋白胆固醇作为关键风险指标相符, 克服了经典两步法在第一步即弃除 CM 和 VLDL, 从而导致残粒颗粒丢失的局限。蛋白质组学分析显示, 碘佛醇单步法在主要载脂蛋白(如 ApoB、ApoE) 的富集程度上与经典两步法无显著差异, 但样本均一性更高, 表明该方法在保证脂蛋白核心组分的同时, 具有较好的重复性。同时, 脂质组学分析显示, 碘佛醇单步法获得的脂蛋白颗粒中 CE 含量显著高于经典两步法, 提示该方法富集含胆固醇的脂蛋白颗粒效率更高。

在本研究中, 通过 BMDM 泡沫化实验证实, 经碘佛醇单步法制备的 CR-nHDL 在氧化后, 对促进巨噬细胞源性泡沫细胞内脂质蓄积的效果更强。氧化后的 CR-nHDL 被 BMDM 表面的清道夫受体识别并大量摄取, 导致细胞内胆固醇(尤其是 CE) 堆积, 形成大量脂质空泡, 增加动脉粥样硬化斑块形成的风险。油红 O 染色和细胞内异丙醇提取脂质定量结果一致, 且在此过程中未表现出明显的细胞毒性。

综上所述, 本课题组开发了一种以碘佛醇为密度介质的单步密度梯度离心法, 能高效富集包括 VLDL、LDL、CM 残粒在内的 CR-nHDL。该方法相对简便省时, 重复性较好, 旨在为研究 ASCVD 领域提供一种获取富含胆固醇的脂蛋白颗粒的新手段, 其应用效果有待后续研究进一步验证。

#### [参考文献]

[1] CHEN S H, HABIB G, YANG C Y, et al. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon[J]. *Science*, 1987, 238(4825): 363-366.

[2] HUH J H, HAN K D, CHO Y K, et al. Remnant cholesterol and the risk of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a nationwide longitudinal cohort study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 228.

[3] PINTÓ X, FANLO M, ESTEVE V, et al. Remnant cholesterol, vascular risk, and prevention of atherosclerosis[J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2023, 35(4): 206-217.

[4] SUCATO V, COMPARATO F, ORTELLO A, et al. Residual cardiovascular risk: role of remnants cholesterol, monocyte/HDL ratio and lipoprotein ratios on personalized cardiovascular prevention[J]. *J Pers Med*, 2024, 14(5): 460.

[5] ANGAYARKANNI N, ANAND BABU K. Oxidized low-density lipoprotein: preparation, validation, and use in cell models[J]. *Methods*

*Mol Biol*, 2024, 2816: 223-239.

[6] LI Y, YANG W, ZHANG X, et al. High-frequency ultrasound induced the preparation of oxidized low density lipoprotein[J]. *Ultrasound Sonochem*, 2025, 115: 107303.

[7] 石萌萌, 黄锐, 黄子乐, 等. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞泡沫化和氧化应激的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(9): 747-755.

SHI M M, HUANG R, HUANG Z L, et al. Effects of theaflavin on ox-LDL-induced foam cell formation and oxidative stress in THP-1 derived macrophages[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(9): 747-755.

[8] 梁慧, 王蕾, 刘培庆, 等. 超声处理的聚苯乙烯纳米塑料对巨噬细胞脂质蓄积的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(6): 500-506.

LIANG H, WANG L, LIU P Q, et al. Effect of ultrasound treated polystyrene nanoplastics on lipid accumulation in macrophages[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(6): 500-506.

[9] YAO S, YANG N, SONG G, et al. Minimally modified low-density lipoprotein induces macrophage endoplasmic reticulum stress via Toll-like receptor 4[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(7): 954-963.

[10] RAMJI D. *Atherosclerosis: methods and protocols*[M]. New York: Humana, 2022.

[11] VARBO A, BENN M, TYBJÆRG-HANSEN A, et al. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(4): 427-436.

[12] DE NIJS T, SNIDERMAN A, DE GRAAF J. ApoB versus non-HDL-cholesterol: diagnosis and cardiovascular risk management[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(6): 163-171.

[13] YOUNG S G. Recent progress in understanding apolipoprotein B[J]. *Circulation*, 1990, 82(5): 1574-1594.

[14] NAKAJIMA K, NAGAMINE T, FUJITA M Q, et al. Apolipoprotein B48: a unique marker of chylomicron metabolism[J]. *Adv Clin Chem*, 2014, 64: 117-177.

[15] 潘显梅, 夏明峰, 李静. 丹酚酸 B 介导巨噬细胞 Piezo1/MAPK/YAP 轴对动脉粥样硬化的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(1): 17-23.

PAN X M, XIA M F, LI J. Protective effect of salvianolic acid B mediating the macrophages Piezo1/MAPK/YAP axis in regulating atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(1): 17-23.

[16] HOOGEVEEN R C, BALLANTYNE C M. Residual cardiovascular risk at low LDL: remnants, lipoprotein(a), and inflammation[J]. *Clin Chem*, 2021, 67(1): 143-153.

[17] HONG S, HAN K, PARK J H, et al. Higher non-high-density lipoprotein cholesterol was higher associated with cardiovascular disease comparing higher LDL-C in nine years follow up: cohort study[J]. *J Lipid Atheroscler*, 2023, 12(2): 164-174.

[18] JIA Y P, WANG J M, LYU J Q, et al. Triglyceride-rich lipoproteins cholesterol, 10-years atherosclerotic cardiovascular disease risk, and risk of myocardial infarction and ischemic stroke[J]. *J Lipid Res*, 2024, 65(11): 100653.

[19] HANSEN M K, MORTENSEN M B, WARNAKULA OLESEN K K, et al. Non-HDL cholesterol and residual risk of cardiovascular events in patients with ischemic heart disease and well-controlled LDL cholesterol: a cohort study[J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2024, 36: 100774.

[20] QUISPE R, MARTIN S S, MICHOS E D, et al. Remnant cholesterol predicts cardiovascular disease beyond LDL and ApoB: a primary prevention study[J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42): 4324-4332.

(此文编辑 文玉珊)