

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 02- 0107- 04

• 实验研究 •

磷脂对高密度脂蛋白 3 介导大鼠 腹腔巨噬细胞内胆固醇流出的影响

李剑军, 陈佩芳, 吴满平, 楼 滨

(上海医科大学药学院生物化学教研室, 上海市 200032)

[主题词] 巨噬细胞, 腹腔; 胆固醇; 卵磷脂; 鞘磷脂; 脂蛋白, 高密度; 大鼠

[摘 要] 为了研究卵磷脂和鞘磷脂对高密度脂蛋白 3 介导大鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇流出的影响, 测定了细胞内胆固醇含量、磷脂含量及游离胆固醇- 胆固醇酯平衡的变化。结果发现, 各组细胞内胆固醇含量从 79.75 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 变为 42.79、37.16、31.53 $\mu\text{g}/\text{皿}$; 高密度脂蛋白 3 组和卵磷脂组中卵磷脂含量分别为 13.95 和 16.28 $\mu\text{g}/\text{皿}$; 高密度脂蛋白和鞘磷脂组中鞘磷脂含量分别为 5.03 和 7.01 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。细胞与 BSA、卵磷脂、鞘磷脂单独孵育后, 细胞内胆固醇含量分别为 75.30、74.65 和 73.09 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 游离胆固醇/总胆固醇比值分别为 59.42%、56.95% 和 64.77%。结果提示卵磷脂和鞘磷脂均能促进高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇流出, 后者强于前者, 而卵磷脂和鞘磷脂单独不能促进细胞内胆固醇的流出。鞘磷脂促进细胞内胆固醇酯向游离胆固醇转化, 卵磷脂促进细胞内游离胆固醇向胆固醇酯转化。

[中图分类号] Q548.1

[文献标识码] A

Effect of Phospholipids on the Cholesterol Efflux from Macrophages Mediated by High Density Lipoprotein- 3

LI Jian- Jun, CHEN Pei- Fang, WU Man- Ping, and LOU Bin

(Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

MeSH Macrophages, Peritoneal; Cholesterol; Phosphatidylcholine; Sphingomyelin; Lipoprotein, HDL; Rat**ABSTRACT** **Aim** To study the effect of phospholipids on the cholesterol efflux from rat macrophages mediated by HDL₃.

Methods Measure the cholesterol content, cellular phospholipid content, and the balance between free cholesterol and cholesteryl ester when phosphatidylcholine (PC) or sphingomyelin (SPM) was added to the medium. **Results** The cholesterol content changed from 79.95 $\mu\text{g}/\text{plate}$ to 42.79, 37.16 and 31.53 in HDL₃, HDL₃ + PC and HDL₃ + SPM group respectively. The cellular phosphorous content in PC (PC- p) were 13.95 and 16.28 $\mu\text{g}/\text{plate}$ in HDL₃ and HDL₃ + PC group respectively. The cellular phosphorous content in SPM (SPM- p) were 5.03 and 7.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ in HDL₃ and HDL₃ + SPM group respectively. After macrophages were incubated with BSA, PC and SPM alone, the cellular cholesterol content were 75.30, 74.65 and 73.09 $\mu\text{g}/\text{plate}$ respectively and the ratio of free cholesterol to total cholesterol were 59.42%, 56.95% and 64.77% respectively.

Conclusion PC and SPM couldn't mediate directly cellular cholesterol efflux, but they could enhance cellular cholesterol efflux from macrophages mediated by HDL₃, and the ability of SPM was stronger than PC. SPM could induce cholesteryl ester convert into free cholesterol. In macrophages and PC could induce free cholesterol convert into cholesteryl ester.

高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 介导肝外细胞内胆固醇 (cholesterol) 的流出是胆固醇逆向转运过程中一个重要环节, 从而使 HDL 呈现抗动脉粥样硬化作用^[1,2]。我们实验室研究已证实 HDL 中载脂蛋白 AI 是介导细胞内胆固醇外流的主要物质^[3]。但是关于胆固醇外流的调节至今研究很

少, 本实验将以大鼠腹腔巨噬细胞为研究对象, 探讨卵磷脂 (phosphatidylcholine, PC) 和鞘磷脂 (sphingomyelin, SPM) 对 HDL₃ 介导细胞内胆固醇流出的影响及其调节机理, 以寻找防治动脉粥样硬化的有效药物。

1 材料与试剂

1.1 材料

健康人血由上海市中心血站提供。Wistar 大鼠由我校实验动物部提供。RPMI- 1640 培养基系

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (基金编号 39570158)

[作者简介] 李剑军, 男, 上海医科大学药学院生物化学教研室 99 届研究生。

GIBCO 产品。胰蛋白酶系 Difco 进口分装。卵磷脂、鞘磷脂系 Sigma 产品。胆固醇酶联试剂盒系上海十八药厂产品。薄层层析硅胶板系山东烟台市芝罘黄务硅胶开发实验厂产品。超速离心机系 Beckman 产品。CO₂ 培养箱系日本 Tabaiespec 公司产品。D-Hanks 液(pH7.4)含 0.8% NaCl、0.04% KCl、0.006% Na₂HPO₄·H₂O、0.006% KH₂PO₄、0.035% NaHCO₃ 和 0.002% 酚红。细胞培养基为含 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 液。

1.2 无载脂蛋白 E-高密度脂蛋白 3 的制备与纯化

参照我室方法^[3,4]。人新鲜血浆经超速离心后,取密度在 1.125~1.210 kg/L 部分,经肝素-Sephacrose CL-4B 亲和层析制备。本实验所用 HDL₃ 均为无载脂蛋白 E-HDL₃。

1.3 大鼠腹腔巨噬细胞制备

以 85% 普通饲料、2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠和 12.5% 猪油配成的高脂饲料喂养老鼠,建立高脂模型。实验前 4 天,大鼠腹腔注射 3% 无菌硫代乙醇酸钠肉汤,诱导巨噬细胞产生。实验时将大鼠乙醚麻醉处死,用 D-Hanks 液腹腔灌洗收集腹腔巨噬细胞,1 000 r/min 离心 10 min,将沉淀用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基制成悬液,调节细胞浓度 3×10^9 个/L,接种于直径 35 mm 培养皿中。置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养,3 h 后洗去未贴壁的细胞,加入 2 mL 培养基,预培养 24 h 后加入各种样品。

1.4 细胞内游离胆固醇和胆固醇含量的测定

用 1 mL 0.5% 胰蛋白酶消化贴壁细胞,洗涤,超声波粉碎,离心后取上清液,按游离胆固醇-酶联法、胆固醇-酶联法测定游离胆固醇和胆固醇含量。

1.5 细胞内磷脂含量测定

取细胞,用无酚红 D-Hanks 液洗三遍,加入 1 mL 50% 甲醇使细胞脱离培养皿底,重复一次。用 2 mL 100% 甲醇回收细胞,重复一次。N₂ 保护下超声波粉碎。加入 10 mL CHCl₃,充入 N₂,4℃过夜。弃上层,加入 0.2 倍体 0.88% KCl 洗涤。弃上层,N₂ 保护下吹干,用 0.2 mL CHCl₃ 溶解,取 10 μL 用于薄层层析点样。对照品为分析纯卵磷脂和鞘磷脂,展开剂为氯仿/甲醇/冰醋酸/水(体积比 65:25:8:4),显色剂为碘蒸气。显色后将相应斑点刮下来,洗脱。沸水浴蒸干,加入消化剂,测定磷的含量。

1.6 磷脂对高密度脂蛋白 3 介导巨噬细胞内胆固醇流出的影响

取 18 皿细胞,分成三组,分别加入 100 μg

HDL₃、100 μg HDL₃+100 μg 卵磷脂、100 μg HDL₃+100 μg 鞘磷脂。37℃培养 24 h,测定细胞内胆固醇、卵磷脂的磷含量和鞘磷脂的磷含量。

1.7 磷脂对细胞内游离胆固醇-胆固醇酯平衡的影响

取 18 皿细胞,分成三组,分别加入 100 μg BSA、100 μg 卵磷脂、100 μg 鞘磷脂。37℃培养 24 h,测定细胞内游离胆固醇和胆固醇含量。同时测定培养前细胞内游离胆固醇和胆固醇的含量。

1.8 统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析来分析组间平均数据的差异。

2 结果

2.1 薄层层析图谱

细胞内磷脂经提取后薄层层析图谱见图 1(Figure 1),可以见到卵磷脂和鞘磷脂得到很好的分离。

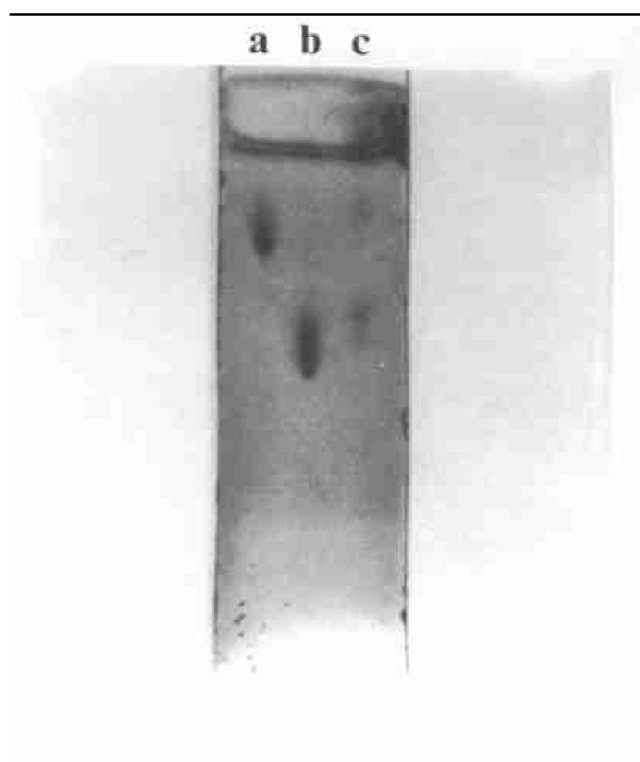


图 1. 细胞内磷脂薄层层析图谱。

Figure 1. Separation of PC and SPM by thin-layer chromatography. a: Standard PC; b: Standard SPM; c: Cell extract.

2.1 磷脂对高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇流出的影响

表 1(Table 1)可见,HDL₃ 中加入卵磷脂或鞘磷脂后,细胞内胆固醇含量从 42.79 μg/皿降至 37.16 和 31.53 μg/皿,统计检验均有显著性差异($P < 0.05$)。结果提示卵磷脂与鞘磷脂均能促进细胞内胆

固醇的流出,且鞘磷脂作用比卵磷脂强。细胞与卵磷脂或鞘磷脂共育后细胞内卵磷脂的磷含量或卵磷

脂的磷含量显著增加($P < 0.05$),提示卵磷脂与鞘磷脂能进入细胞内。

表 1. 磷脂对高密度脂蛋白 3 介导细胞内胆固醇流出的影响。

Table 1. Effect of phospholipids on the cholesterol efflux from macrophages in the presence of HDL₃ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	before incubation ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			after incubation ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		
	cholesterol	PC- p	SPM- p	cholesterol	PC- p	SPM- p
HDL ₃	79.95 \pm 2.76	14.35 \pm 0.37	5.28 \pm 0.50	42.79 \pm 3.59	13.95 \pm 0.30	5.03 \pm 0.82
HDL ₃ + PC	79.95 \pm 2.76	14.35 \pm 0.37	5.28 \pm 0.50	37.16 \pm 3.70 ^a	16.28 \pm 0.61 ^a	-
HDL ₃ + SPM	79.95 \pm 2.76	14.35 \pm 0.37	5.28 \pm 0.50	31.53 \pm 3.49 ^{ab}	-	7.01 \pm 0.63 ^a

a: $P < 0.05$, compared with HDL₃ group, b: $P < 0.05$, compared with HDL₃ + PC group.

2.2 磷脂对细胞内游离胆固醇-胆固醇酯平衡的影响

从表 2 (Table 2) 中可以看到, PC、SPM 和 BSA (对照组) 分别与细胞共育 24 h 后, 细胞内胆固醇含量分别为 74.65、73.09 和 75.30 $\mu\text{g}/\text{皿}$, 统计检验无显著性差异($P > 0.05$)。细胞内游离胆固醇占总胆固醇的比例分别为 56.95%、64.77% 和 59.42%, 统计检验有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2. 磷脂对细胞内游离胆固醇/胆固醇酯平衡的影响。

Table 2. Effect of phospholipids on the balance between free cholesterol and cholesteryl ester ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	FC ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TC ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	FC/TC (%)
BSA	45.86 \pm 2.74	77.41 \pm 3.77	59.24
BSA	44.74 \pm 3.68	75.30 \pm 3.50	59.42
100 μg PC	42.51 \pm 3.47	74.65 \pm 3.71	56.95 ^a
100 μg SPM	47.34 \pm 3.68	73.09 \pm 2.76	64.77 ^{ab}

a: $P < 0.05$, compared with BSA group, b: $P < 0.05$, compared with PC group.

3 讨论

磷脂可以直接与脂质和蛋白相结合。很多文献报道载脂蛋白与 PC、SPM 的重组体能有效介导细胞内胆固醇的流出。我们的实验结果(表 1)也证明了这一点。向 HDL₃ 中加入 PC 和 SPM, 细胞内胆固醇含量从 42.49 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 降至 37.16 和 31.53 $\mu\text{g}/\text{皿}$ ($P < 0.05$)。这说明 HDL₃ 能介导巨噬细胞内胆固醇流出, PC 与 SPM 均能加强 HDL₃ 这一功能, 且 SPM 作用显著强于 PC。但 PC 与 SPM 单独并不具备促进细胞内胆固醇流出功能, 即 PC 与 SPM 不能单独作为细胞流出胆固醇的受体。细胞内胆固醇浓度与

介质中胆固醇接受体的游离胆固醇/P 比值有关, 游离胆固醇/P 的降低有利于细胞内胆固醇流出^[5]。用磷脂酶 A₂ 处理 HDL₃, 使游离胆固醇/P 升高, 从而引起胆固醇外流降低^[6]。

胆固醇是以非酯化形式, 即游离胆固醇形式离开细胞的。细胞内胆固醇处于游离胆固醇被酰基辅酶 A 胆固醇转移酶不断酯化成 CE 和 CE 被胆固醇酯酶不断水解成游离胆固醇的动态平衡之中。当细胞间液存在胆固醇受体时, 胆固醇外流, CE 不断水解成游离胆固醇而流出细胞。有报道认为细胞内 SPM 是调节酰基辅酶 A 胆固醇转移酶活性阈值的重要物质^[7]。细胞内 SPM 增加, 酰基辅酶 A 胆固醇转移酶阈值上调, 需更多的游离胆固醇才能激活酰基辅酶 A 胆固醇转移酶。本实验中细胞与 PC、SPM 共育后, 细胞内游离胆固醇/胆固醇的比值分别为 56.95% 和 64.77%, 有显著性差异($P < 0.05$), 这可能是 SPM 比 PC 更能促进细胞内胆固醇外流的原因。当细胞与 PC 或 SPM 共育后细胞内 PC- p 或 SPM- p 含量显著增加($P < 0.05$), 说明 PC 与 SPM 能进入细胞内, 通过影响酰基辅酶 A 胆固醇转移酶的活性而调节细胞内游离胆固醇-CE 平衡, 影响细胞内胆固醇流出。

参考文献

- [1] Miller NE, Vile AL, Crook D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high density lipoprotein in rabbit [J]. *Nature*, 1985, **314**: 109- 111
- [2] Oram JF, Mendez JA, Slotte JP, et al. HDL apolipoproteins mediated removal of sterol from intracellular pools but not from plasma membranes of cholesterol- loaded fibroblasts [J]. *Arterioscler Thromb*, 1991, **11**: 403- 413
- [3] 成安, 吴满平, 陈佩芳. HDL 氧化修饰对大鼠巨噬细胞胆固醇流出影响及其机理探讨 [J]. 上海医科大学学报, 1997,

- 24: 335- 337
- [4] 魏强, 吴满平, 陈佩芳, 等. HDL受体和肝性脂酶在肝选择性摄取HDL₂-CE中的协同作用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28: 659- 662
- [5] Arbogast LY, Rothblat GH, Ceslie MH, et al. Cellular cholesteryl ester accumulation induced by free cholesterol- rich lipid dispersion [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1976, 73: 3 680- 690
- [6] Slotte JP, Oram JF, Bieman EL, et al. Building of HDL to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to cell surface [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 12 904- 3 001
- [7] Okwu AK, Xu XX, Shirator Y, et al. Regulation of the threshold for lipoprotein- induced acylCoA: cholesterol acyltransferase stimulation in macrophages by cellular sphingomyelin content [J]. *J Lipid Res*, 1994, 35: 644- 657
- (1999- 12- 06收到, 2000- 05- 03修回)
- (此文编辑 朱雯霞)

欢迎订阅《中国动脉硬化杂志》!

欢迎向《中国动脉硬化杂志》投稿!

欢迎引用发表在《中国动脉硬化杂志》上的文章!

欢迎在《中国动脉硬化杂志》上刊登医药卫生广告!

《中国动脉硬化杂志》是中国科学技术协会主管、中国病理生理学会主办、衡阳医学院承办的全国性高级学术性期刊, 1993年12月创刊, 国内外公开发行人。设有【专家评述】、【实验研究】、【临床研究】、【诊治经验】和【文献综述】等多个栏目。作为华人世界中唯一的防治动脉硬化性疾病的专业性期刊, 自创刊以来, 以办刊严谨、内容丰富、编排新颖、对稿件处理快速及时、文章发表周期短、可读性强而深受广大作者和读者厚爱。

《中国动脉硬化杂志》的报道范围广泛, 凡中医药学、预防医学、基础医学、临床医学、护理学、药学和特种医学中有关防治动脉硬化性疾病的基础理论和临床研究论文、诊治经验和方法技术等方面的文稿都可向她投稿。

《中国动脉硬化杂志》的读者对象为各级各类医院的心血管专科医师及其他医护人员、中高等医药院校的教师和高年级学生、以及心血管领域的医药卫生研究人员和管理人员。由于动脉硬化性疾病是中老年人的常见病、多发病, 《中国动脉硬化杂志》是这一领域的专业杂志, 用了不少的篇幅介绍动脉硬化性疾病的防治, 因此, 《中国动脉硬化杂志》也适合广大中老年人阅读。

《中国动脉硬化杂志》为季刊, 每季末月出版, A4(大16)开本, 每期定价8.50元, 全年34.00元。由湖南省报刊发行局发行, 全国各级各地邮局均可订阅。中国动脉硬化杂志编辑部热忱欢迎全国同仁和社会各届朋友到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期, 可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。个人向编辑部订阅, 给予4元优惠。编辑部设湖南省衡阳市、衡阳医学院内, 邮政编码为421001, 电话号码为(0734)8281289, E-mail为dmzzbjb@163.net。编辑部现尚有少量1993~1997年出版的各期杂志共16期, 其中1993~1994年4期, 1995、1996和1997年各4期。需要者可直接与编辑部联系购买, 平均每期定价7.50元(含邮资)。中国动脉硬化杂志编辑部热情欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用发表在《中国动脉硬化杂志》上的文章: 凡在中国科技论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了《中国动脉硬化杂志》的文章者, 凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年的《中国动脉硬化杂志》一份。