

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.028

HPLC 法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出的实验研究*

马卫列¹, 龚晓华¹, 李观强², 丁航¹, 兰柳波¹, 陈小谊¹, 张志珍^{1△}

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东东莞 523808;

2. 深圳市龙岗区人民医院检验科, 广东深圳 518172)

[摘要] **目的** 建立用高效液相色谱(HPLC)法测定载脂蛋白 A-1(apoA-1)介导的泡沫细胞内胆固醇流出率的实验方法。**方法** 人单核细胞 THP-1 用 160 nmol/L 佛波酯(PMA)诱导 24 h 分化为贴壁巨噬细胞(PMA 组),再用 50 μg/mL 乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)处理 48 h,诱导巨噬细胞变成泡沫细胞(ac-LDL 组);加入含 apoA-1 的 1640 培养基培养 24 h(apoA-1 组)。油红 O 染色和 HPLC 法测定细胞内胆固醇水平,鉴定巨噬细胞源性泡沫细胞模型。采用 HPLC 分析和液体闪烁计数法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率。**结果** THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经油红 O 染色后,细胞内可明显观察到大量红色脂滴存在。胆固醇水平测定显示,ac-LDL 组内游离胆固醇、总胆固醇和胆固醇酯的水平明显高于 PMA 组($P < 0.01$)。ac-LDL 处理细胞 48 h 后,ac-LDL 组内总胆固醇水平为 80.25 μg/mg 细胞蛋白,胆固醇酯水平为 47.65 μg/mg 细胞蛋白,占总胆固醇的 59.38%,与 PMA 组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。HPLC 分析和液体闪烁计数法结果表明,apoA-1 介导泡沫细胞内 apoA-1 组胆固醇流出率分别为 5.63% 和 7.08% ($P < 0.01$)。**结论** 本研究成功建立了酶促反应结合 HPLC 测定泡沫细胞内胆固醇流出的方法,为后续研究细胞脂质代谢提供了实验基础。

[关键词] 色谱法,高效液相;泡沫细胞;载脂蛋白 A-1;胆甾烯酮;胆固醇流出

[中图分类号] Q54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4116-04

Research on the determination of cholesterol efflux from foam cells mediated by apoA-1 using HPLC analysis*

Ma Weilie¹, Gong Xiaohua¹, Li Guanqiang², Ding Hang¹, Lan Liubo¹, Chen Xiaoyi¹, Zhang Zhizhen^{1△}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China;

2. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518172, China)

[Abstract] **Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the cholesterol efflux from macrophage-derived foam cells mediated by apolipoprotein A-1 (apoA-1). **Methods** Human THP-1 monocytic cells, pre-treated with 160 nmol/L phorbol-12-myristate acetate (PMA) for 24 h to differentiate into adherence macrophages, then incubated with 50 μg/mL acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) for 48 h to induce foam cells formation, then added apoA-1 for 24 h, THP-1-derived macrophage foam cells were identified by oil red O-staining, and the cellular cholesterol content by measured by HPLC method. Cholesterol efflux from macrophage foam cells was determined by HPLC analysis and liquid scintillation counting, respectively. **Results** Oil red O-stainable lipid droplet accumulation were observed in entire cytoplasm of THP-1-derived macrophage foam cells. Measuring cellular cholesterol content showed that free cholesterol, total cholesterol and cholesterol ester content in macrophage foam cells were increased remarkably than PMA group macrophages ($P < 0.01$). After treated with ac-LDL for 48 h, the macrophage foam cells accumulated 80.25 μg/mg cell protein and 47.65 μg/mg cell protein respectively, and the cholesterol ester accounted for 59.38% of the cellular total cholesterol ($P < 0.01$). The ratio of cholesterol efflux reached 5.63% and 7.08% respectively by HPLC analysis and liquid scintillation counting using apoA-1 mediation ($P < 0.01$). **Conclusion** Combination of an enzymatic catalysis and HPLC method for determining cholesterol efflux from foam cells is successfully established in this study, thus providing a technical foundation for the further study of cellular lipid homeostasis.

[Key words] chromatography, high pressure liquid; foam cells; apolipoprotein A-1; cholestenone; cholesterol efflux

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是大多数心脑血管疾病发生的前期病理基础^[1-2],在 AS 发生、发展过程中,巨噬细胞来源的泡沫细胞(foam cells)形成是动脉粥样损伤形成的特征性改变,促进细胞内胆固醇和胆固醇酯的流出是调节巨噬细胞胆固醇动态平衡的关键环节,对减少细胞内胆固醇蓄积和 AS 防治意义重大^[3]。一般细胞在摄取胆固醇时会启动胞内胆固醇的正常流出,而泡沫细胞则表现为胆固醇代谢失调,主要是由于细胞内胆固醇酯过度堆积和胆固醇流出受阻,使细胞内

胆固醇酯水平占总胆固醇的 50% 以上^[4]。高密度脂蛋白介导胆固醇从巨噬泡沫细胞流出是清除细胞内过量胆固醇的最主要途径^[5-6],胆固醇以囊泡分泌形式进行转运^[7],在此过程中有高密度载脂蛋白 A-1(apolipoprotein A-1, apoA-1)的介导^[8]。研究 apoA-1 所介导的泡沫细胞胆固醇流出的重要环节之一就是准确测定细胞内各种胆固醇的水平以及胆固醇的流出率,为此,本文的目的就是采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170267);广东省自然科学基金资助项目(S2011010002984);东莞市高等院校科研机构科技计划项目(2012108102037)。作者简介:马卫列(1970—),硕士,副教授,主要从事脂质代谢研究。△ 通讯作者, Tel: (0769)22896339; E-mail: zzzhang@gdmc.edu.cn。

内和培养基中的胆固醇水平,计算胆固醇流出率,从而建立一种非同位素的较准确测定泡沫细胞胆固醇流出率的方法。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 人单核细胞 THP-1 购自湘雅医学院细胞中心;RPMI 1640 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。

1.1.2 试剂 佛波酯(phorbol-1-myristate-13-acetate,PMA)购自 Promega 公司;乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low-density lipoprotein, ac-LDL)购自 Biochemical Technologies 公司; [³H]-胆固醇购自 PerkinElmer 公司;胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、胆甾烯酮标准品、apoA-1 和油红 O 染料购自 Sigma 公司; TritonX-100 购自上海生工公司;HPLC 级甲醇购自天津大茂公司;BCA 试剂盒购自碧云天生物科技公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 主要仪器 1200 型高效液相色谱仪(Agilent 公司);液体闪烁计数器(PerkinElmer 公司);CO₂ 细胞培养箱和生物安全柜(NUAIRE 公司);TS100 倒置相差显微镜(Nikon 公司);5417R 型高速台式离心机(Eppendorf 公司);多功能酶标仪(基因有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立 THP-1 细胞悬浮培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,2~3 d 传代 1 次,3~5 代后可用于建立巨噬细胞源性泡沫细胞。THP-1 细胞传代至 6 孔板(1×10⁶ 个/孔),加入 PMA 至终浓度 160 nmol/L,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h,使悬浮细胞分化为贴壁巨噬细胞。更换培养基,加入 ac-LDL 至终浓度 50 μg/mL,继续孵育 48 h,诱导贴壁巨噬细胞分化为泡沫细胞。同时设 PMA 对照组,每组设 3 个重复孔。

1.2.2 油红 O 染色观察巨噬细胞源性泡沫细胞 吸去 6 孔板中培养基,PBS 漂洗 3 次。泡沫细胞用预冷的 4%多聚甲醛固定 10 min;PBS 洗 1 次,加入 50%异丙醇作用 5 min;吸去异丙醇,加入 0.5%油红 O 室温染色 15 min。60%异丙醇漂洗 3~5 次,苏木素染色 4 min,自来水冲洗反蓝;PBS 漂洗 1 次,置倒置相差显微镜下观察。

1.2.3 HPLC 法测定泡沫细胞内胆固醇水平 参考文献[9]方法,PMA 组和 ac-LDL 组 THP-1 细胞用 PBS 洗 2 次,加入 1 mL 0.1% TritonX-100 裂解,收集至 1.5 mL 离心管,BCA 法测定蛋白水平。取 100 μL 细胞裂解液,加入 10 μL 酶促反应混合液[含 500 mmol/L MgCl₂、500 mmol/L Tris(pH 7.4)、10 mmol/L DTT、5%胆酸钠]混匀。实验分两管,一管加入胆固醇氧化酶(终浓度 0.4 U/mL),37 °C 水浴作用 1 h,用于测定细胞内游离胆固醇(FC);另一管加入胆固醇酯酶(终浓度 0.4 U/mL),37 °C 作用 1 h 后,再加入胆固醇氧化酶于 37 °C 作用 1 h,用于测定细胞内总胆固醇(TC)。之后,两组分别加入 100 μL 甲醇:乙醇(1:1)终止反应,4 °C 静置 30 min,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,HPLC 检测 FC 和 TC 水平。色谱条件:色谱柱(Agilent TC-C₁₈柱,4.6 mm×250.0 mm,质点大小为 5 μm,孔大小为 100 Å);流动相,100%甲醇;流速,1 mL/min;检测波长,240 nm;柱温,25 °C;进样量,标准品 5 μL,细胞样品 50 μL。以胆甾烯酮作为标准品,根据样品峰面积和所测蛋白浓度,计算出 FC 和 TC 水平,以单位质量蛋白质所含胆固醇表示(μg/mg)。胆固醇酯(CE)的水平为 TC 水平减去 FC 水平;CE 百分水平(%)= CE 水平/TC 水平×100%。

1.2.4 HPLC 法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出

THP-1 细胞接种 6 孔板,在 PMA 和 ac-LDL 作用下诱导分化为泡沫细胞;每孔加入 1 mL RPMI 1640 培养基,5% CO₂、37 °C 平衡培养 24 h;用无血清培养基漂洗 1 次,加入 1 mL 含 apoA-1 的 1640 培养基(apoA-1 终浓度为 10 μg/mL),5% CO₂、37 °C 继续培养 24 h。同时设泡沫细胞对照组,每组设 6 个复孔。收集培养基,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 3 倍体积氯仿:甲醇(2:1),混匀,置 4 °C 冰箱过夜后,5 000 r/min 离心 10 min,收集下层有机相;取上层再加入 2 倍体积氯仿,4 °C 冰箱 4~5 h,5 000 r/min 离心 10 min,重复抽提,收集下层有机相;合并两次收集的下层有机相,氮气吹干。将氮气吹干的脂质加入 10 μL 甲醇溶解,再加入 100 μL 0.1% Triton X-100 混匀,HPLC 测定培养基中的 FC 水平,色谱条件同上。细胞内总胆固醇测定方法同上述 1.2.4。

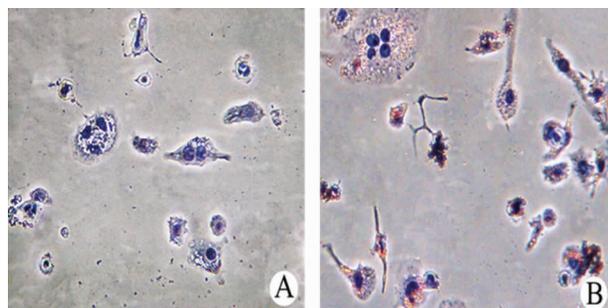
apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出率按下列公式计算:胆固醇流出率(%)= 培养基中 FC 水平/(细胞内 TC 水平+培养基中 FC 水平)×100。

1.2.5 液体闪烁计数法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出 THP-1 细胞接种 24 孔板,PMA 作用 24 h(PMA 组);用无血清培养基洗 1 次,加入 [³H]-胆固醇(终浓度为 0.5 μCi/mL)和 ac-LDL(终浓度为 50 μg/mL),5% CO₂、37 °C 培养 48 h(ac-LDL 组);加入无血清培养基平衡 24 h 后,加入含 apoA-1 的 1640 培养基(apoA-1 终浓度为 10 μg/mL),继续培养 24 h(apoA-1 组)。同时设泡沫细胞对照组,每组设 6 个重复孔。收集细胞培养基,置-20 °C 保存。用无血清 1640 培养基漂洗 1 次,每孔加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 500 μL,反复吹打裂解细胞,室温静置 5 min,收集细胞裂解液至 1.5 mL 离心管中,-20 °C 保存。液体闪烁计数法测定培养基和细胞裂解液中的放射强度,放射强度以 cpm 值计(cpm 值为 [³H]-胆固醇放射强度每分钟计数)。apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出率按下列公式计算:胆固醇流出率(%)= 培养基内 cpm/(细胞内 cpm+培养基中 cpm)×100。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One-way ANOVA 进行显著性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油红 O 染色鉴定巨噬细胞源性泡沫细胞模型 正常培养的 THP-1 细胞呈单个悬浮培养或簇状成团,经 PMA 作用 24 h,细胞诱导为贴壁巨噬细胞,并分化出伪足(图 1 A)。进一步用 ac-LDL 诱导 48 h 后,贴壁巨噬细胞转变为泡沫细胞。经油红 O 染色,细胞内可明显观察到大量红色脂滴存在,胞浆呈现泡沫样改变(图 1 B),提示 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型成功建立。



A:PMA 组;B:ac-LDL 组。

图 1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞油红 O 染色(×200)

2.2 测定胆固醇酯水平鉴定巨噬细胞源性泡沫细胞模型

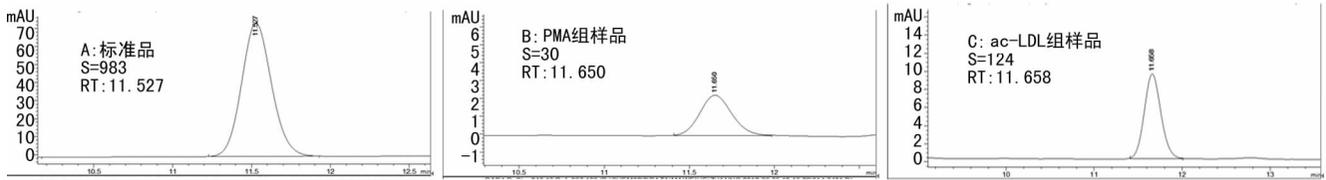
PMA 组和 ac-LDL 组细胞分别用 0.1% TritonX-100 裂解后,经胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶的催化作用,细胞中的胆固醇全部转化为胆甾烯酮。以标准胆甾烯酮作为外标,HPLC 法检测细胞裂解液内胆甾烯酮水平,标准品和细胞裂解液的色谱图见图 2。根据标准品胆甾烯酮峰面积、浓度和所测样品峰面积、蛋白浓度,计算细胞内 FC、TC 和 CE 的水平,结果见表 1。与 PMA 组相比,ac-LDL 组细胞内 FC、TC 和 CE 水平明显高于 PMA 组($P<0.01$)。PMA 组 CE 水平为(8.95 ± 0.67) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 细胞蛋白,占 TC 的 35.31%;ac-LDL 组 CE 水平为(47.65 ± 2.13) $\mu\text{g}/\text{mg}$ 细胞蛋白,占 TC 的 59.38%。ac-LDL 组 CE 的

水平符合泡沫细胞 CE 应占细胞 TC 50% 以上的特征,提示泡沫细胞模型成功建立。

表 1 THP-1 巨噬细胞和泡沫细胞内胆固醇水平($\bar{x}\pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$)

组别	n	FC	TC	CE
PMA 组	6	16.40 \pm 0.90	25.35 \pm 2.36	8.95 \pm 0.67
ac-LDL 组	6	32.60 \pm 2.67 ^a	80.25 \pm 3.48 ^a	47.65 \pm 2.13 ^a

^a: $P<0.01$,与 PMA 组比较。



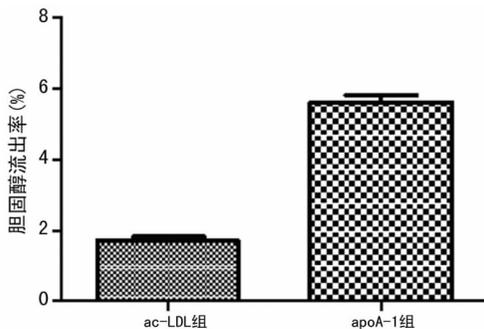
A:胆甾烯酮标准品;B:PMA组;C:ac-LDL组。

图 2 标准品和不同处理组细胞内胆甾烯酮色谱图

2.3 HPLC 法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出 收集 ac-LDL 组和 apoA-1 组的培养基和细胞裂解上清液,酶促反应结合 HPLC 法测定培养基中的 FC 水平和细胞内的 TC 水平,见表 2。根据培养基中 FC 和细胞内 TC 水平,计算 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率。实验结果表明,泡沫细胞胆固醇流出率为(1.70 ± 0.11)%,加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apoA-1 作用 24 h 后,泡沫细胞内胆固醇流出率为(5.63 ± 0.34)%,与 ac-LDL 组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3,提示 apoA-1 可明显介导泡沫细胞内胆固醇流出。

表 2 细胞内和培养基中的胆固醇水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	培养基中 FC (ng/mL)	细胞内 TC(ng/mL)
ac-LDL 组	6	64.17 \pm 5.91	3 713.70 \pm 310.36
apoA-1 组	6	215.30 \pm 11.63	3 619.40 \pm 286.91



^{*}: $P<0.01$,与 ac-LDL 组比较。

图 3 HPLC 法测定泡沫细胞胆固醇流出率

2.4 液体闪烁计数法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出 为评价 HPLC 法测定泡沫细胞内胆固醇流出率的可行性,进一步采用液体闪烁计数法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率。收集 apoA-1 组和 ac-LDL 组的培养基和细胞裂解上清液,液体闪烁计数仪测定培养基和细胞的 cpm 值,见表 3。根据培养基和细胞的 cpm 值,计算 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率。实验结果表明,加入 apoA-1 后可明显介导泡沫细胞内胆固醇流出,流出率为(7.08 ± 0.30)%,差

异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。该结果与上述 HPLC 法测定的结果接近,说明本实验所建立的酶促反应结合 HPLC 法测定泡沫细胞内胆固醇流出率的方法是可行的。

表 3 细胞内和培养基中的 cpm 值($\bar{x}\pm s$)

组别	n	培养基	细胞
ac-LDL 组	6	448.67 \pm 24.22	21 082.00 \pm 531.91
apoA-1 组	6	1 613.33 \pm 70.95	21 168.00 \pm 628.62

^{*}: $P<0.01$,与 ac-LDL 组比较。

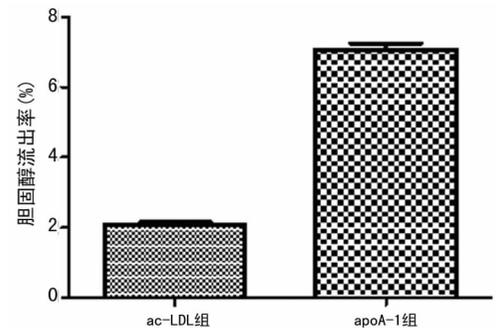


图 4 液体闪烁计数法测定泡沫细胞胆固醇流出率

3 讨论

泡沫细胞形成是 AS 的早期特征性病理性改变,贯穿于 AS 的整个过程,目前 AS 的机制尚未完全清楚,建立稳定可靠的泡沫细胞模型对研究 AS 意义重大。要研究 AS 的发生、发展机制,常借助于实验性动物模型或细胞模型,相比于兔、小鼠、大鼠等动物模型^[10-12],细胞模型更为常用,如人单核 THP-1 细胞、U937 细胞、RAW264.7 细胞以及人 HepG2 细胞和 J744 巨噬细胞等^[13-15]。本实验中,选用人单核细胞 THP-1 建立泡沫细胞模型,首先使用 PMA 诱导悬浮生长的 THP-1 细胞分化为贴壁生长的巨噬细胞,之后再加入 ac-LDL 共同孵育使贴壁巨噬细胞进一步分化为泡沫细胞。实验发现建立该模型时 PMA 诱导分化较为关键,使用 160 nmol/L PMA 作用 24~48 h 可使巨噬细胞吞噬脂质的能力增强,有利于巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。泡沫细胞的生物学特征包括两个方面:

(1)形态学上表现为胞浆内脂质成分明显增多并聚集成滴,经油红 O 染色可观察到红色脂滴,胞浆呈泡沫样改变;(2)细胞内胆固醇水平明显增加,胆固醇酯占总胆固醇的 50% 以上。本实验从这两方面对建立的泡沫细胞模型进行鉴定,油红 O 染色后显微镜下可观察到 ac-LDL 组胞浆内有大量红色脂滴形成,胞浆呈泡沫样改变,证实泡沫细胞模型构建成功。油红 O 染色过程中,先用预冷的 4% 多聚甲醛固定 10 min,之后再 50% 异丙醇固定 5 min 效果较好,若直接用 50% 异丙醇固定细胞会出现脱落、漂浮。0.5% 油红 O 染色、异丙醇漂洗、苏木素复染后不需再用 1% HCl 反蓝,用自来水冲洗一段时间即可,否则红色脂滴可能会消失。

计算细胞内胆固醇酯与总胆固醇的比值即可分析细胞的泡沫化程度,早期国内外学者采用化学显色法测定细胞游离胆固醇和胆固醇酯的水平,但检测的灵敏度低是其主要缺陷。近年来研究者多采用 HPLC 法分析细胞内游离胆固醇和胆固醇酯^[16],HPLC 法由于具有高速、高效、高灵敏度等优势而被广泛使用^[17],但目前在测定胆固醇水平中的不足是:(1)测定细胞内游离胆固醇水平时,以胆固醇作为标准品,测定 210 nm 波长的光吸收,而其他的细胞成分和流动相在此波长会有吸收而影响测定结果。(2)由于细胞内某些胆固醇酯种类尚未完全清楚,缺乏标准品,因而尚不能对细胞内胆固醇酯进行精确定量。(3)现有的测定方法包括冰浴破碎细胞、依次经过 KOH、6% 三氯乙酸、真空冷冻干燥、活性炭去色素、超声除气等实验步骤,操作繁琐,不能满足标准化操作要求。基于此,本实验参考 Cullen 等^[9]方法,改进以上不足,建立了一种新的采用 HPLC 法测定泡沫细胞内胆固醇水平和胆固醇流出率的方法。以胆固醇氧化产物胆甾烯酮作为标准品,简化实验操作步骤,将酶促反应和 HPLC 分析相结合,测定胆甾烯酮在 240 nm 波长处的光吸收,对泡沫细胞内游离胆固醇和总胆固醇水平进行定量。实验中以胆甾烯酮作为标准品的优点是,胆甾烯酮的最大光吸收波长是 240 nm,而在此波长下细胞中其他组份和培养基对测定没有干扰,检测的灵敏度提高。酶促反应的基本原理是:胆固醇酯在胆固醇酯酶的催化下水解为游离胆固醇,游离胆固醇在胆固醇氧化酶的催化下转变为胆甾烯酮,这样上样检测时只需检测 240 nm 处胆甾烯酮的峰面积即可。根据胆甾烯酮的峰面积和上样量,即可计算出游离胆固醇和总胆固醇的水平。进一步收集泡沫细胞培养基,提取脂质后,加入胆固醇氧化酶进行酶促反应,测定胆甾烯酮水平,计算培养基中的游离胆固醇水平,即可准确定量 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率。为了摸索不同胆固醇酯类的水解作用和氧化作用的范围,本研究进行了预实验,选择合适的试剂浓度和反应条件,两个酶促反应都可完成,胆甾烯酮的最终浓度在数量上等于样品中胆固醇的初始浓度。用这种方法测定细胞中总胆固醇和游离胆固醇的水平敏感而且快速,DAD 检测波长在 240 nm 处,得到单一的色谱峰,易于统计和计算。实验结果表明,与对照 PMA 组相比,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ac-LDL 处理 48 h 后,泡沫细胞内游离胆固醇、总胆固醇和胆固醇酯的水平均明显增加,且细胞内胆固醇酯占总胆固醇的 59.38%,进一步证实成功建立了泡沫细胞模型,而且 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率也显著增加($P < 0.01$)。

为评价本实验所建立的 HPLC 法测定泡沫细胞内胆固醇流出率的可行性,进一步采用液体闪烁计数法测定 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出率,以对该法进行验证。液体闪烁计算法用^[3H]标记的胆固醇作为标准,分别测定培养基和泡

沫细胞内^[3H]标记的胆固醇放射剂量 cpm,以培养基中的 cpm 占培养基和细胞内的总 cpm 来表示^[18]。实验中诱导分化的贴壁巨噬细胞用 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ^[3H]-胆固醇和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ac-LDL 共同孵育 48 h,转变为泡沫细胞。当用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apoA-1 介导 24 h 后,泡沫细胞内胆固醇流出率从 2.08% 上升至 7.08%,增加率为 240.38%。尽管同位素测定方法的灵敏度高,但由于其对实验要求较高,且同位素易对环境造成污染,为此需建立一种具有较高灵敏度的非同位素测定胆固醇流出率的方法。本实验采用酶促反应结合 HPLC 方法测定的泡沫细胞内胆固醇流出的增加率为 231.18%,与液体闪烁计数法测定的胆固醇流出增加率具有可比性,进一步证实了其可行性。该方法的建立为研究 AS 的致病机制、开发新的抗 AS 药物及评价药效提供了技术支持。

参考文献

- [1] De Boer SP, Cheng JM, Rangé H, et al. Antibodies to periodontal pathogens are associated with coronary plaque remodeling but not with vulnerability or burden[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(1): 84-91.
- [2] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-325.
- [3] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(3): 173-181.
- [4] Beaufrère H, Nevarez JG, Wakamatsu N, et al. Experimental diet-induced atherosclerosis in Quaker parrots (*Myiopsitta monachus*) [J]. *Vet Pathol*, 2013, 50(6): 1116-1126.
- [5] Calabresi L, Gomaschi M, Simonelli S, et al. HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(1): 13-18.
- [6] Breevoort SR, Angdisen J, Schulman IG. Macrophage-independent regulation of reverse cholesterol transport by liver X receptors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(8): 1650-1660.
- [7] Schmitz G, Grandl M. The molecular mechanisms of HDL and associated vesicular trafficking mechanisms to mediate cellular lipid homeostasis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(11): 1718-1722.
- [8] Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport[J]. *Subcell Biochem*, 2010(51): 183-227.
- [9] Cullen P, Fobker M, Tegelkamp K, et al. An improved method for quantification of cholesterol and cholesteryl esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesteryl ester species by means of secondary ion mass spectrometry[J]. *J Lipid Res*, 1997, 38(2): 401-409.
- [10] Shiomi M, Koike T, Ito T. Contribution of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia, to elucidation of the anti-atherosclerotic effects of statins[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 231(1): 39-47.

意义^[5]。

属于低相对分子质量的 CK 是组成上皮组织中间丝的一种成分,在上皮起源及正常上皮的肿瘤细胞内表达。据相关研究发现结肠癌患者的外周血中的 CK mRNA 能帮助医护人员对结肠癌微转移的监测^[6]。但是门静脉血是回流肝脏的肠道血液的一条必经之路,理论上认为结肠癌微转移会率先在门静脉血中发生,所以相比于外周血的检测,对手术中抽取门静脉血,进行 CK19 mRNA 表达的检测更加具有实际的价值意义^[7]。目前 CK19 mRNA 是研究较多的 CK 分子之一,在恶性上皮组织肿瘤中表达较高,但是在外周血及非上皮细胞内却无表达,本实验拟检测 CK19 基因转录水平,探讨其在结肠癌中的临床意义。

本实验结果发现,CK19 mRNA 在结肠癌患者中的阳性表达率为 48.0%,远远高于结肠息肉患者和健康人的水平,提示 CK19 mRNA 与结肠癌有着一定的相关性。研究结果还发现 CK19 mRNA 的阳性表达情况与结肠癌组织的 Dukes 分期、分化程度及肿瘤转移情况均存在着一定的关联性,说明 CK19 表达情况的检测在肿瘤的分期、分化、转移中均有着重要的意义^[8]。而针对 CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值,作者将其与 CEA 和 CA199 进行了比较,CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值行 ROC 曲线分析,结果提示其敏感性和特异性均显著优于 CEA 和 CA199,提示 CK19 mRNA 其可以作为结肠癌诊断的一项新肿瘤标志物^[9]。还有研究表明,CK19 mRNA 可以作为结肠癌患者外周血中发生微转移情况的一个良好的指标;同时对 CK19 mRNA 的检测还能帮助医护人员识别出具有远处转移倾向或复发的高危结肠癌患者,同时对结肠癌患者术后的化疗具有指导性的作用^[10]。

综上所述,本研究结果发现 CK19 mRNA 在结肠癌中的表达显著升高,且其表达水平与肿瘤的分期、分级及转移有着重要的相关性,其对于结肠癌的诊断价值优于 CEA 和 CA199。

参考文献

[1] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita FJ, García-Salguero L, et al. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells[J]. *J Proteomics*, 2013(83): 15-

25.

- [2] Módos K, Coletta C, Chao CL, et al. P35 cystathionine- β -synthase (CBS)-derived hydrogen sulfide (H_2S) supports cellular bioenergetics in colon cancer cells in vitro[J]. *Nitric Oxide*, 2013, 31 Suppl 2: S50.
- [3] Chattopadhyay M, Kodela R, Kashfi K. P09 therapeutic potential of NOSH-aspirin, a dual nitric oxide- and Hydrogen sulfide-donating hybrid in colon cancer[J]. *Nitric Oxide*, 2013, 31 Suppl 2: S37-38.
- [4] Khan AQ, Bury JP, Brown SR, et al. Keratin 8 expression in colon cancer associates with low faecal butyrate levels [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011(11): 2.
- [5] 张欣, 郑鹏生. 细胞角蛋白 7 和 19 在结肠癌中的表达及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(2): 157-158, 161.
- [6] 张黎明, 吴晓宇, 赖卫强, 等. 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测结肠癌患者血 CK19 mRNA 水平及其意义[J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(1): 106-108.
- [7] Liang Z, Guo YT, Yi YJ, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides target a Fas/caspase dependent pathway to induce apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(9): 3981-3986.
- [8] Li XM, Su JR, Yan SP, et al. A novel inflammatory regulator TIPE2 inhibits TLR4-mediated development of colon cancer via caspase-8[J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(4): 233-240.
- [9] 高阳, 庄竟, 刘永刚, 等. 结肠癌患者实时荧光定量 RT-PCR 检测门静脉血 CK19 mRNA 水平及其临床意义[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(32): 7815-7817.
- [10] Fontana S, Flugy A, Schillaci O, et al. In vitro antitumor effects of the cold-water extracts of Mediterranean species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) on human colon cancer cells[J]. *Int J Med Mushrooms*, 2014, 16(1): 49-63.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-05-27)

(上接第 4119 页)

[11] Hasan ST, Zingg JM, Kwan P, et al. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(1): 40-51.

[12] 郝炎, 杨乔岚, 余翼, 等. 肾动脉狭窄合并动脉粥样硬化大鼠模型的建立[J]. *重庆医学*, 2012, 41(6): 581-583.

[13] Liu HJ, Wang XL, Zhang L, et al. Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of *Ginkgo biloba*, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2/3): 138-145.

[14] Sato K, Fujimoto K, Koyama T, et al. Release of salusin-beta from human monocytes/macrophages [J]. *Regul Pept*, 2010, 162(1/3): 68-72.

- [15] Liu Q, Dai Z, Liu Z, et al. Oxidized low-density lipoprotein activates adipophilin through ERK1/2 signal pathway in RAW264.7 cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(9): 635-645.
- [16] 李国术, 何平平, 王波, 等. 硫化氢上调 ABCA1 表达促进泡沫细胞胆固醇流出的实验研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(30): 3596-3598.
- [17] 陈保林, 马跃东, 熊肇军, 等. 高效液相色谱法检测心肌细胞蛋白降解率[J]. *重庆医学*, 2011, 40(22): 2234-2235.
- [18] Lin G, Bornfeldt KE. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(2): 663-669.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-07-02)