

文章编号: 1005-8982(2004)20-0051-03

## 液相色谱-质谱联用法测定 U937 细胞内胆固醇

梁中书<sup>1</sup>, 杨侃<sup>1</sup>, 陈本美<sup>2</sup>

(1.中南大学湘雅三医院 心内科, 湖南 长沙 410013;

2.中南大学现代分析测试中心, 湖南 长沙 410013)

**摘要:** 目的 利用液相色谱-质谱联用法测定细胞内胆固醇及胆固醇酯, 建立一种精确鉴定泡沫细胞的方法。方法 用氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 干预 U937 巨噬细胞诱导泡沫细胞形成, 然后用己烷/异丙醇(体积比 3/2) 抽提细胞内胆固醇及胆固醇酯, 抽提液经真空干燥后再溶于甲醇, 用液相色谱-质谱联用法直接测定细胞内游离胆固醇, 胆固醇酯经胆固醇酯酶水解后测定总胆固醇, 总胆固醇减去游离胆固醇即胆固醇酯。抽提脂质后的沉淀物溶于氢氧化钠溶液中, 用 BCA 法测定蛋白含量, 胆固醇及胆固醇酯用  $\mu\text{g}/\text{mg}$  细胞蛋白为单位来表示。结果 氧化低密度脂蛋白干预后的巨噬细胞内存在高水平胆固醇及胆固醇酯的蓄积。在  $100\ \mu\text{g}$  的 oxLDL 处理组中, 胆固醇酯与阴性对照组差异存在显著性 [ $25.733\pm 2.970$ ]  $\mu\text{g}/\text{mg}$  细胞蛋白 vs ( $13.024\pm 2.875$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  细胞蛋白,  $P<0.01$ ], 同样胆固醇的水平差异也存在显著性 [ $18.675\pm 1.315$ ]  $\mu\text{g}/\text{mg}$  细胞蛋白 vs ( $24.428\pm 2.370$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  细胞蛋白,  $P<0.01$ ]。结论 液相色谱-质谱联用法测定细胞内胆固醇是一种鉴定泡沫细胞简便而精确的方法。

**关键词:** 液相色谱-质谱联用法; 泡沫细胞; U937 细胞; 胆固醇; 胆固醇酯

中图分类号: R446.113

文献标识码: A

## Cholesterol in U937 foam cells assayed in liquid chromatographic-mass spectrometry

LIANG Zhong-shu<sup>1</sup>, YANG Kan<sup>1</sup>, CHEN Ben-mei<sup>2</sup>

(1. Department of Endocardiology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, P.R.China; 2. Modern Analysis Center of Central South University, Changsha, Hunan 410008, P.R.China)

**Abstract: Objective:** To assess the merits of liquid chromatographic-mass spectrometry and to explore a useful and precise method to assay the cholesterol and cholesterol ester in foam cells. **Methods:** U937 cells incubated with oxidized LDL were induced to form foam cells, and the cell monolayer was extracted with hexane/isopropanol 3/2(v/v). Free and total cholesterol were assayed in liquid chromatographic-mass spectrometry. To assay total cholesterol, the cellular extracts were evaporated to dryness and the residue was hydrolyzed by cholesterol esterase. Cholesterol ester levels were obtained by subtracting free cholesterol from total cholesterol levels, cholesterol was used as an external standard. After the lipid extraction, the cell pellet was solubilized with sodium hydrate solutions, and then protein content was determined. Results were normalized by cell protein. **Results:** Oxidized LDL caused a higher degree of cholesterol ester accumulation in the U937 macrophage-like cells [ $25.733\pm 2.970$ ]  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein in cells incubated with oxidized LDL vs ( $13.024\pm 2.875$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein in cells without oxidized LDL,  $P<0.01$ ]. The levels of free cholesterol in the same cells also had significant differences [ $18.675\pm 1.315$ ]  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein vs ( $24.428\pm 2.370$ )  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein,  $P<0.01$ ]. **Conclusions:** The liquid chromatographic-mass spectrometry is a useful and precise method to identify foam cell.

**Key words:** liquid chromatographic-mass spectrometry; cholesterol; cholesterol ester; foam cell

**CLC number:** R 446.113

**Document code:** A

在动脉粥样硬化形成早期,在多种因素作用下,单核细胞接触并粘附到损伤部位的血管内皮,继而进入动脉壁的内膜下间隙,激活并分化成巨噬细胞。巨噬细胞产生许多物质如脂肪酶、活性氧或自由基,进一步使低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)分子氧化成 oxLDL,通过其表面的清道夫受体不断摄取 oxLDL,造成脂质的堆积<sup>[1]</sup>,当细胞内胆固醇酯占总胆固醇比例超过 50.0%后转变为泡沫细胞<sup>[2]</sup>,泡沫细胞的形成标志着动脉粥样硬化的起始,是构成动脉粥样脂质条纹的基础。因此,研究泡沫化过程的一个重要方面是精确地测量细胞内微量的脂质。质谱法以其优越性在生物医学中已经得到广泛应用,但目前尚未见有应用于细胞内胆固醇测定的报道。我们利用液相色谱-质谱联用法建立了一种精确测定泡沫细胞内的胆固醇及胆固醇酯的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

U937 单核细胞株购于中国典型培养物保藏中心,IMDM 培养基、转铁蛋白(含人胰岛素)、卵磷脂、牛血清白蛋白、佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)、胆固醇均为美国 Sigma 公司产品,胆固醇酯酶购于 Worthington Biochemical 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于江苏碧云天,其余试剂为国产分析纯。CQ250 超声清洗器,LCMS-2010 液相-质谱仪(C18 柱)、UVS400A 真空干燥机和 UV-2550 紫外可见分光光度计由日本岛津公司制造。

### 1.2 方法

**1.2.1 氧化修饰低密度脂蛋白的制备** 新鲜血浆购自长沙市中心血站,用溴化钠溶液(NaBr)调节密度。采用密度离心提取 LDL,然后在体外用铜离子氧化制备 oxLDL<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 U937 细胞的培养** U937 细胞用 IMDM 培养基(Iscove's modified Dulbecco's medium)培养(含 10.0%的胎牛血清,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 u/ml),在 37℃,5.0%CO<sub>2</sub> 的条件下培养。细胞呈悬浮生长,每隔 2 d 换 1 次培养液。至 U937 细胞生长旺盛时,用含 0.16 μmol/L<sup>[4]</sup>的 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)培养基培养 72 h,促使其向巨噬样细胞分化和清道夫受体的表达。细胞贴壁后用灭菌

0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffer Saline, PBS)洗涤 3 次,再用无血清培养基(serum-free medium, SFM)<sup>[5]</sup> [IMDM + 牛血清白蛋白(0.4%) + 人转铁蛋白(25 μg/ml) + L- 磷脂酰胆碱(1 μg/ml) + 人胰岛素(25 μg/ml) + 氯化亚铁(0.07 nmol/L)]培养基。

**1.2.3 U937 巨噬细胞的干预** 将 PMA 处理<sup>[6]</sup>72 h 后的 U937 细胞( $1 \times 10^6$ ),在 SFM 中分别加入 50, 100, 50 和 200 μg 的 oxLDL 来干预,以 SFM 作对照。再在 37℃,5.0%CO<sub>2</sub> 的条件下继续培养 48 h。

**1.2.4 胆固醇标准品的制备** 准确称量 500 mg 的标准胆固醇溶于甲醇中,逐步稀释成 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00 和 10.00 μg/ml 的工作浓度,用液相-质谱联用法(LC/MS)测定其浓度并记录其峰面积,再用浓度和峰面积制作标准曲线。

**1.2.5 U937 巨噬细胞内胆固醇及胆固醇酯的提取** 将 oxLDL 干预 48 h 后 U937 巨噬样细胞转入 1.5 ml 的离心管中,3 000 r/min 离心 5 min 后吸出培养基。沉淀细胞用 PBS 洗涤两次,再用己烷/异丙醇<sup>[7]</sup>3:2 (体积比)提取脂质。将离心管置于超声清洗器的超声发射处,维持 3 min 使其充分混匀,然后 3 000 r/min,15℃离心 5 min,收集有机相,在真空干燥机中干燥。以上过程重复 2 次。

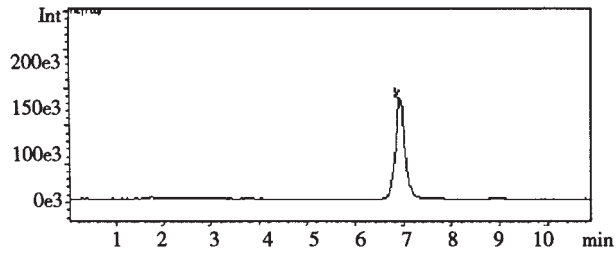
**1.2.6 LC/MS 测定细胞内胆固醇及胆固醇酯** 干燥后的样品加入 500 μl 的甲醇溶解,取其中 100 μl 直接测定细胞内游离胆固醇;另取 100 μl 在真空干燥机中干燥加入 0.8 U 的胆固醇酯酶,置于 37℃反应 60 min,再用己烷萃取胆固醇,干燥后加入 100 μl 甲醇溶解用于测定总胆固醇。以胆固醇作外参,根据峰面积与标准胆固醇浓度的标准曲线得出样品胆固醇的浓度,然后按上述方法测定总胆固醇,用总胆固醇减去游离胆固醇代表胆固醇酯的量。抽提脂质后的细胞沉淀溶于 500 μl 的 1 mol/L NaOH 中,用 BCA 法测定其蛋白质的含量,胆固醇及胆固醇酯的定量以 μg/mg 细胞蛋白为单位。

## 2 结果

### 2.1 胆固醇峰的鉴定及标准曲线的绘制

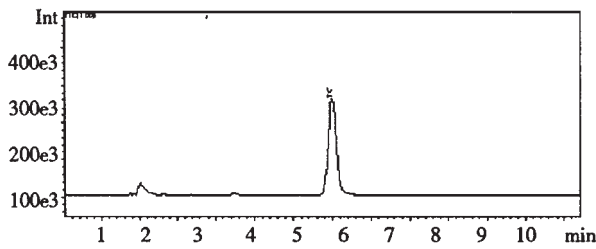
首先进 1 针标准品,记录其质谱图,可见明显升高的峰就是胆固醇峰。进标准胆固醇后,大约在 7 min 后出现 1 个明显的质谱峰(见图 1A),连续检

测 30 min 未见其他质谱峰出现。该峰处的分子量为 369(胆固醇分子量为 387,电离时脱 1 分子 H<sub>2</sub>O)。采用选择性离子(质/荷为 369)模式来检测,其它物质则不会干扰测定。如图 1 所示,A 图是 oxLDL 处理后细胞内游离胆固醇的质谱图,B 是总胆固醇的质谱图,峰高而且窄说明胆固醇分离得很好,几乎没有杂质的干扰。



在 7 min 处可见胆固醇峰。FC 代表游离胆固醇,TC 代表总胆固醇

图 1A 100 μg oxLDL 处理后的 U937 细胞内游离胆固醇质谱分析图



总胆固醇峰明显高于游离胆固醇峰,这与泡沫化的细胞内的胆固醇酯增多相符

图 1B 等量的样品用胆固醇酯酶水解后质谱分析图

在所选定的标准胆固醇的浓度范围内,胆固醇的浓度与质谱峰面积有很好的线性关系(见图 2,  $R^2=0.982$ )。

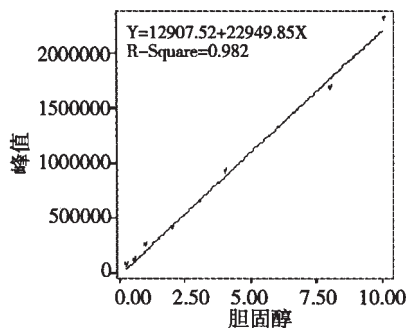


图 2 根据标准胆固醇浓度(μg/ml)与质谱峰值绘制的标准曲线

## 2.2 胆固醇及胆固醇酯的测定结果

用 LC/MS 测定各组及 oxLDL 的各剂量组细胞内游离胆固醇(FC)和总胆固醇(TC),用 TC 减去 FC 得到胆固醇酯(CE)的含量,并计算 CE/TC。从附

表可见,除 50 μg 剂量组外,其余各组的 U937 细胞经 oxLDL 处理后,CE/TC 均大于 50%,说明已经转化为泡沫细胞。

附表 各组 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯的比值

组别	FC(μg/mg)	TC(μg/mg)	CE/TC(%)
SFM	18.675± 1.315	31.699± 3.167	41.09
50 μg oxLDL	18.270± 1.120	32.231± 3.223	43.32
100 μg oxLDL	24.428± 2.370	50.161± 5.001	51.31
150 μg oxLDL	30.420± 4.042	61.962± 5.424	50.91
200 μg oxLDL	32.771± 4.253	72.410± 6.587	54.74

## 2.3 LC/MS 检测胆固醇极限

根据我们的标准曲线及实验结果,胆固醇浓度在 0.25 ~ 10.00 μg/ml 之间与相应的质谱峰面积具有很好的相关性。就对 U937 细胞而言可以检测到 10<sup>5</sup> 个细胞内的胆固醇,甚至更低。

## 3 讨论

传统胆固醇测定是首先使胆固醇氧化或者分解,产生的中间产物再与显色剂反应,一方面得到的值是间接测定的结果,受试剂的影响大,干扰因素多;另一方面,所需样品量较大,不利于微量分析。因此,已不大采用。国内王佐等<sup>[6]</sup>首次用高效液相色谱法测定细胞内的胆固醇,并证明其是一种有效的方法。但是,由于胆固醇是非极性分子,对柱子和流动相的液体均有严格的要求。由于质谱分析法在微量测量中优势,在分析化学尤其是生物医学中应用越来越广。因此,我们探索用液-质联用法测定细胞内胆固醇,并成功摸索出实验条件。质谱法不需要对柱子作特别的要求,C18 柱子已经广泛应用,有利于降低成本。液-质联用法直接测定胆固醇很方便,由于胆固醇酯不是单一的物质,而且胆固醇酯的各个组分没有标准品,因此就不能直接测出胆固醇酯。我们用胆固醇酯酶把胆固醇酯水解成胆固醇后,在测定总胆固醇后间接测出胆固醇酯,这个问题也就迎刃而解。因此,液-质联用法测定胆固醇及胆固醇酯都很方便快捷。

液-质联用法测定细胞内胆固醇,相对其它传统的检测方法而言有以下几点优点:一是灵敏度高,重复好;二是所需细胞量少,液相色谱法<sup>[6]</sup>需要细胞数至少 10<sup>8</sup>,这个数量级需要多瓶(50 ml 培养瓶至多达 10<sup>7</sup>)细胞混合后检测,而质谱法 10<sup>5</sup> 个细胞甚至更少都可检测到,因此质谱法更为方便细胞干预

(下转第 56 页)

者。全突变患者中约 15% 个体部分细胞存在前突变,为嵌合型。在全突变中 CPG 岛发生异常甲基化,可使 FMR-1 基因蛋白(FMRP)减少或缺如,影响 FMRP 结合 RNA 功能而导致脑及发育不良,这可能是导致 Fra(X)综合征的根本原因<sup>[5]</sup>。

Fra(X)综合征临床表型多种多样,差异很大,正常男性传递者及大部分女性携带者表型正常,易被忽视,而本病在人群中不断传递,危害极大,有必要对所有先天性智力低下患者、育龄妇女、新生儿乃至所有人群进行 Fra(X)综合征筛查,及早诊断,以减少该病患者的出生。理想的筛查方法应该是简便,经济,漏诊率低。目前,细胞遗传学上主要是用 G 显带技术发现 Xq27 的脆性位点,但该位点出现频率较低,易产生假阴性,分子遗传学水平上,用 Southern Blot 可以检测 CGG 扩增和甲基化,但需较大量的 DNA 和放射性同位素,花费大,周期长,不适合于大量人群的筛查,RT-PCR 可检测 FMR-1 基因表达,但该技术要求较高,不适合于临床开展。我们根据 NCBI 上所查得的 FMR-1 基因全序列<sup>[6]</sup>在 FMRI 基因内设计三条引物,其中 1 条引物作为另两条引物的共同上游引物:设计引物 EAG-U 与 FC 扩增(CGG)<sub>n</sub>重复区,引物 EAG-U 与 EAG-L 扩增内对照片段,只有当所有样品均扩增出 225 bp 的内对照片段时,才可以说明 DNA 模板的质量及 PCR 体系正常工作,并在 PCR 反应体系中用 7-deza-dGTP 替

代 dGTP,改善 GC 富集区的扩增效果,这种复合 PCR 方法检测的结果显示正常人及前突变携带者均将可以看到内对照及包含有可变 CGG 重复区的较大的 DNA 片段,全突变将由于无法被扩增,将仅出现内对照引物。初步研究结果表明这方法简便易行,适合于在智力低下儿童群体中进行大面积的 Fra(X)综合征筛查,至少适合对男性群体的筛查。

#### 参 考 文 献:

- [1] Hagerman R J. Fragile X syndrome. *Curr Probl Pediatr*, 1987, 17: 621
- [2] Haddad L A, Mingroni-Netto RC, Vianna-Mogrante AM, et al. A PCR-based test suitable for screening for fragile x syndrome among mentally retarded males [J]. *Hum Genet*, 1996, 97: 808-812.
- [3] Dierick H, Stul M, De Kelder W, et al. Incorporation of dITP or 7-deza dGTP during PCR improves sequencing of the product[J]. *Nucleic Acids*, 1993, 21: 4427-4428.
- [4] Oostra BA, Willemsen R. The X chromosome and fragile X mental retardation [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 99(1-4): 257-264.
- [5] Huber KM, Gallagher SM. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation [J]. *Proc natl Acad Sci, USA*, 2002, 99: 7746-7750.
- [6] Verkerk AJ, Piereti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile x syndrome[J]. *Cell*, 1991, 65: 905-914.

(唐小玲 编辑)

(上接第 53 页)

后细胞内脂质的检测;三是选择性强,干扰少,因测定时采用选择离子(质/荷为 369,见图 1)方式,其它物质则不会干扰测定。因此,用质谱法测定细胞内胆固醇是很理想的方法。

#### 参 考 文 献:

- [1] 张正生,冯毅,刘乃丰.髓性过氧化物酶与动脉粥样硬化相关性研究进展[J].*现代医学*,2004,32:136-138.
- [2] Batt KV, Avella M, Moore EH, et al. Differential effects of low-density lipoprotein and chylomicron remnants on lipid accumulation in human macrophages[J]. *Exp Biol Med*, 2004, 229(6): 528-537.
- [3] Kennedy S, Fournet-Bourguignon MP, Breugnot C, et al. Cells

derived from regenerated endothelium of the porcine coronary artery contain more oxidized forms of apolipoprotein-B-100 without a modification in the uptake of oxidized LDL[J]. *J Vasc Res*, 2003, 40(4): 389-398.

- [4] Fu T, Borensztajn J. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions [J]. *Biochem J*, 2002, 366: 195-201.
- [5] Virella G, Atchley D, Koskinen S, et al. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL [J]. *Clinical Immunology*, 2002, 105(1): 81-92.
- [6] 王佐,李全忠,杨向东,等.高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯[J].*中国动脉硬化杂志*,1998,6(4):317-320.

(曾文军 编辑)