

• 论 著 •

高效液相色谱法测定 A549 细胞中的胆固醇水平研究^{*}

魏思宇^{1,2}, 卢 蕾^{1,2}, 蔺晓菁^{1,2}, 何芸芸^{1,2}, 丁世家³, 阮雄中¹, 练雪梅^{1,2,△}

(1. 重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室/感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院/医学与社会发展研究中心/健康领域社会风险预测治理协同创新中心, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘 要:目的 建立检测 A549 细胞内胆固醇水平的高效液相色谱(HPLC)方法,为以胞内胆固醇相对水平变化作为指标鉴定组织细胞泡沫化程度及特定组织细胞泡沫化对组织损伤提供技术支持。**方法** 用氢氧化钾乙醇溶液和三氯乙酸分别除去细胞裂解液中的三酰甘油和蛋白,用正己烷-异丙醇的混合溶剂提取细胞内的胆固醇。胆固醇水平采用 HPLC 法测定,色谱柱为 ZORBAX SB-C18(4.6 mm×150.0 mm,5 μm),流动相为乙腈-异丙醇(67:33,V/V),流速为 1 mL/min,检测波长为 206 nm。**结果** 细胞内胆固醇在 5~100 ng/μL 内线性关系良好($r=0.999\ 9$);相对标准偏差(RSD)均低于 3.0%,平均加样回收率为 94.89%,RSD 为 2.86%($n=6$)。**结论** HPLC 法简便、准确、重复性好,可用于泡沫细胞程度鉴定,为探讨脂质代谢异常与器官损伤及进一步研究胆固醇代谢紊乱与肺损伤奠定基础。

关键词: 高效液相色谱; A549 细胞; 胆固醇

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.07.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)07-0903-04

Study on HPLC method for determining cholesterol level in A549 cells^{*}

WEI Siyu^{1,2}, LU Lei^{1,2}, LIN Xiaojing^{1,2}, HE Yunyun^{1,2}, DING Shijia³, RUAN Xiongzhong¹, LIAN Xuemei^{1,2,△}

(1. Center for Lipid Research of Chongqing Medical University/Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases designated by the Chinese Ministry of Education, Chongqing 400016, China;

2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University/Research Center for Medical and Social Development/Innovation Center

for Social Risk Governance in Health, Chongqing 400016, China; 3. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University/Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for detecting intracellular cholesterol level in A549 cells so as to provide the technical support for the tissue injury by identifying the foaming degree of tissues cells with intracellular cholesterol relative level change as the indicator and specific tissue foaming. **Methods** Protein and triglycerides in the cell lysis solution were removed by using trichloroacetic acid and KOH ethanolic solution, the mixed solvent of normal hexane and isopropanol was used to extract intracellular cholesterol. The cholesterol level was detected by adopting the HPLC method. The chromatographic column was ZORBAX SB-C18(4.6 mm×150.0 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-isopropanol(67:33, V/V), the flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was at 206 nm. **Results** The linear range of intracellular cholesterol level showed good linearity in the range of 5—100 ng/μL($r=0.999\ 9$). RSD was less than 3.0%. The average recovery rate was 94.89% and RSD was 2.86% ($n=6$). **Conclusion** The used method is convenient, simple and accurate with good repeatability, can be used to identify foam cell, and lays the foundation for exploring the lipid metabolism abnormality and organ injury and future studying the cholesterol metabolism disturbance and pulmonary injury.

Key words: high performance liquid chromatography; A549 cells; cholesterol

胆固醇是细胞、动物组织重要的组成物质,不仅是细胞膜形成的重要原料,而且还参与合成体内维生素 D、胆汁酸、性激素和肾上腺皮质激素等各类生命物质^[1]。

大量研究证实,脂质代谢异常可导致多器官损伤,其中对心脑血管、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺损伤的研究比较成熟,国内外对脂代谢异常与肺组织损伤关系的研究才刚起步。高脂状态下的巨噬细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、胰岛 β 细胞及上皮细胞等多种细胞类型异常的脂质蓄积是导致多器官损伤的病理生理学基础^[2]。在细胞内异常聚集的脂质三酰甘油占绝大部分,胆固醇及其相关酯类的比例不到 10%。因此,血脂测定在器

官损伤的发生和发展中的作用一直被广泛重视,而胆固醇在其中的作用往往被忽略。同时,虽然已经有众多研究表明血脂分析与器官损伤关系密切,但是也有文献显示血脂指标正常者中器官病变患者的比例较高。可能是因为组织病变细胞伴随着炎性状态,导致胆固醇在组织器官间重新分配。在医学上,细胞内胆固醇相关酯类占总胆固醇水平的 50% 以上则定义为泡沫细胞,泡沫样变不仅是构成脂质条纹的基础,也是组织损伤的起始^[3]。一般组织内细胞在摄入胆固醇时会自动开启胆固醇的正常流出程序。而泡沫细胞功能上则表现为胆固醇代谢失活,其动力学改变主要包括胆固醇摄入过量及过度堆积、细

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071907);教育部春晖计划合作科研启动项目(Z2012118)。

作者简介:魏思宇,男,在读硕士,主要从事脂代谢与器官损伤方面的研究。△ 通信作者,E-mail:xuemeilian@cqmu.edu.cn。

胞内胆固醇运转异常和流出受阻。细胞内过量的胆固醇聚集能触发内质网应激、氧化应激及细胞凋亡,进一步促进器官损伤的发生^[4]。所以,特定组织细胞泡沫化对组织的损伤成为了研究重点。目前,高效液相色谱(HPLC)法检测巨噬细胞胆固醇的研究已有报道,但不同细胞代谢特点不一样。因此,本试验将 A549 细胞作为肺泡Ⅱ型上皮细胞模型,在高脂状态下观察该细胞内胆固醇的蓄积状态,为进一步探索胆固醇代谢失衡与肺损伤的关系奠定基础。这也将对了解人体细胞泡沫化程度,探讨特定组织细胞泡沫化对组织损伤都能提供一定技术支持。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 采用 HPLC 仪(Agilent 1260),HD3100 超声波破碎仪(德国 Bandelin),5418R 离心机(德国 Eppendorf),MTN-2800D 氮吹仪,PURELAB Classic 超纯水仪(英国 ELGA),DL-01 溶剂过滤器,IKA Genius3 圆周振荡器,电子分析天平。采用 A549 细胞株(美国 ATCC),胆固醇标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer),改良型 RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司),新生牛血清(Gibco 公司),乙腈、异丙醇、正己烷、乙醇为市售色谱纯(Adamas 公司);氢氧化钾、三氯乙酸为市售分析纯(美国 sigma 公司);试验用水均为去离子水;0.45 μm 有机相微孔滤膜。

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制 标准品储备液:称取 1.3 mg 胆固醇标准品,溶解于 13 mL 乙醇配置成 100 ng/ μL 的胆固醇储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存。现配 15% 氢氧化钾(KOH)乙醇溶液:称取 2.785 g KOH,加入 20 mL 氢氧化钠(NaOH)超声溶解。现配 6% 三氯乙酸溶液:称取 1.277 g 三氯乙酸,加入 20 mL 纯水中超声溶解。流动相溶液制备:分别将色谱纯级别的乙腈、异丙醇用溶剂过滤器过滤后进行超声除气。

1.2.2 HPLC 法检测胆固醇的条件 色谱柱:ZORBAX SB-C18 (4.6 mm $\times$ 150.0 mm,5 μm);流动相:乙腈-异丙醇(67:33),等度洗脱;柱温:20 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min;进样量:20 μL ;检测器:二极管阵列检测器(DAD),检测波长 206 nm。

1.2.3 标准曲线的制备 分别精密量取 0.05、0.1、0.2、0.5、1 mL 水平为 100 ng/ μL 的胆固醇标准品储备液至 1.5 mL 规格的进样瓶中,再分别滴入 0.95、0.9、0.8、0.5、0 mL 乙醇得到质量水平分别为 5、10、20、50、100 ng/ μL 的胆固醇标准品系列溶液,将上述标准品系列溶液充分震荡混匀后超声除气,然后分别注入 HPLC 仪,进样量为 20 μL ,按前述色谱条件记录图谱。以胆固醇的质量水平为横坐标(X),其峰面积值为纵坐标(Y),绘制标准曲线。

1.2.4 A549 细胞的培养^[5-6] A549 细胞利用改良型 RPMI-1640 培养基(含 L-谷氨酰胺,不含硝酸钙),10.0% 新生牛血清培养,将细胞重悬均匀,放置于含 5% CO_2 ,温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的孵箱中培养,每 2 天换一次培养液。待细胞长满壁且贴壁完全。采用胰酶消化法,收集细胞沉淀,并使用加样枪加入适量磷酸盐缓冲液(PBS)吹打冲洗至重悬,然后 1 000 r/min 离心 3 min,重复 3 次。细胞计数后,分装至 EP 管。

1.2.5 细胞内胆固醇提取^[7-8] 将 EP 管置于 4 $^{\circ}\text{C}$,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,沉淀用 1 mL 0.9% NaCl 溶液重悬。重悬后的细胞,在-80 $^{\circ}\text{C}$ 与常温之间反复冻融 3 次,用超声破碎仪在冰水浴中进行破碎,能量参数 27%,时间 2 min,破停时间 1 s、1 s。将成功破碎后的细胞放入 4 $^{\circ}\text{C}$,8 000 r/min 离心 7.5 min,提取上清,利用 BCA 法进行蛋白水平测定。破碎后

的细胞溶解液分装至新 EP 管中,加入等体积 15% KOH 乙醇溶液,握旋 5 min 至清亮后,进行 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴超声皂化 1 h。加入数滴 6% 三氯乙酸除去蛋白,继续握旋 5 min 至清亮。等体积加入提取剂,正己烷-异丙醇(3:2),握旋混合后,12 500 r/min 离心 15 min。吸取收集上层有机相,下层水相按上述操作步骤重复抽提 4 次。合并有机相,氮气吹干,加入 1 mL 流动相组成乙腈-异丙醇(67:33)进行复溶,后超声除气,12 500 r/min 离心 15 min,收取上清,进样。

2 结果

2.1 专属性考察 分别精密吸取胆固醇标准品溶液、等量空白乙醇溶剂、上述方法中 1.2.4 项进行预处理过的样品溶液和空白细胞上清液分别注入 HPLC 仪,按照色谱条件 1.2.2 进行测定,胆固醇峰的保留时间为 8.2 min。记录其色谱图,见图 1~4。

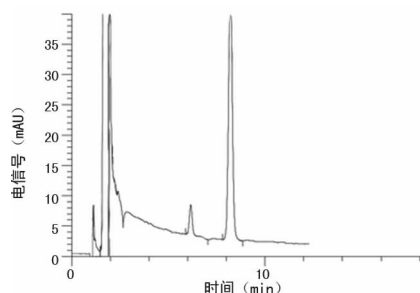


图 1 胆固醇标准品对照色谱图

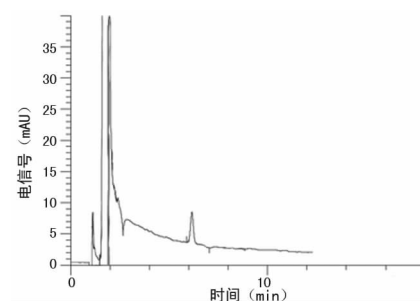


图 2 空白乙醇溶剂对照色谱图

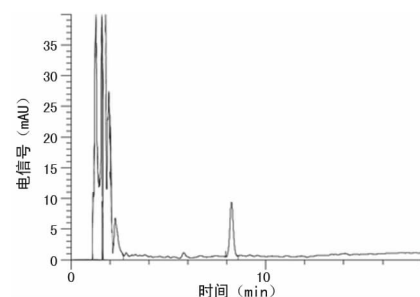


图 3 A549 细胞内胆固醇对照色谱图

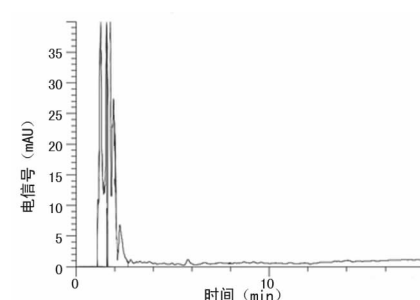


图 4 空白细胞上清液对照色谱图

2.2 方法学考察

2.2.1 HPLC 法测定胆固醇的线性关系及定量限 将已配制好的质量水平分别为 5、20、50、100 ng/μL 的胆固醇标准品系列溶液,按上述方法中 1.2.2 色谱条件进行 HPLC 测定。以标准品峰面积值 Y 对质量水平 X 进行线性回归,曲线在 5~100 ng/μL 范围内线性关系良好,求得回归方程 $Y = 6.119\,74X - 0.525\,19$,相关系数 $r^2 = 0.999\,9$ 。按照液相色谱检测限定义为 10 倍信噪比,对色谱系统进行基线检测,结果测得定量限为 10.197 ng/μL(S/N=10)。见图 5。

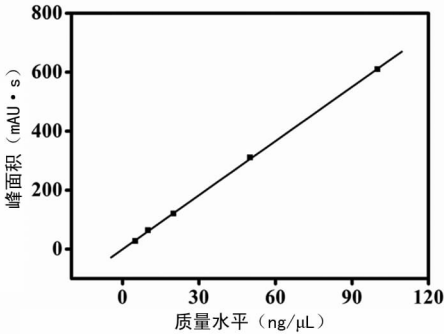


图 5 根据胆固醇标准品质量水平与峰面积绘制的标准曲线

2.2.2 精密度试验 精密吸取质量水平为 50 ng/μL 的胆固醇标准品溶液,按照 1.2.2 项色谱条件,连续进样 6 次,结果显示其相对标准偏差(RSD)为 0.93%(n=6),表明该方法精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 精密吸取质量水平为 100 ng/μL 的样品溶液,按照 1.2.2 项色谱条件,分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样。结果显示,稳定性的 RSD 为 0.52%(n=6),表明该样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 取同一批次的细胞,按照上述方法中 1.2.4 进行预处理,平行制备 6 例,以 1.2.2 项色谱条件进行检测,结果测得,样品平均水平为 10.779 ng/μL,重复性试验 RSD 为 2.57%(n=6),表示该方法有较好的重复性。

2.2.5 回收率试验 取已知胆固醇水平的细胞提取液 6 例,各精密添加入等量胆固醇标准品,按照方法 1.2.4 预处理后,在 1.2.2 项色谱条件下进行检测,计算回收率及 RSD,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

样品编号	样品水平 (ng/μL)	添加水平 (ng/μL)	实测值 (ng/μL)	回收率 (%)
1	10.779	10	20.084	93.04
2	10.779	10	20.100	93.20
3	10.779	10	20.094	93.14
4	10.779	10	20.128	93.48
5	10.779	10	20.483	97.03
6	10.779	10	20.727	99.47

注:平均回收率为(94.89±2.72)%,RSD 为 2.86%。

2.3 样品检测 取相同批次的细胞,按照方法 1.2.4 项制备 6 例样品溶液,每例样品细胞数为 2×10^6 个,进行 BCA 法蛋白测定后,在 1.2.2 项色谱条件下进行 HPLC 检测,结果见表 2。

表 2 细胞内胆固醇水平测定结果

样品编号	1	2	3	4	5	6	平均值
胆固醇水平(ng/μL)	10.656	10.579	10.383	11.028	11.016	11.010	10.779
蛋白水平(μg/μL)	0.504	0.474	0.461	0.478	0.480	0.457	0.476

3 讨 论

3.1 胆固醇皂化及提取方法 在细胞内胆固醇的提取过程中,醇溶性的氢氧化钾溶液可用于皂化反应除去其中的三酰甘油成分^[9]。本试验通过单因素对比发现,在一定时间、温度范围内,时间越长,温度越高,皂化过程越彻底。笔者选择温度为 40℃,时间为 1 h 的条件,可达到最佳皂化效果,皂化完成后溶液澄清无沉淀。由于胆固醇分子结构为非极性,采用极性相对较小的溶剂对胆固醇有更强的溶解性。因此,本试验采用正己烷-异丙醇(3:2)混合液作为胞内胆固醇提取剂。

3.2 色谱条件的筛选 色谱条件建立的过程中,流速可以改变出峰的时间,利于快速检测方法的建立。本试验在方法建立过程中发现,流速为 0.5 mL/min 时,胆固醇峰会与溶剂峰,杂质峰相重叠。当流速分别设为 1.5 mL/min 和 2 mL/min 时,胆固醇出峰时间相较靠后,峰形稍有拖尾。由于选用的流动相组成中有异丙醇,流速如果选在 2 mL/min,会升高柱压,不利于色谱柱及色谱仪的维护。综合考虑,流速参数设为 1 mL/min,出峰时间较快,且峰形良好。

流动相组分的选择在一定程度上对胆固醇保留时间的影响也很关键,由于胆固醇分子结构的特殊性,其疏水性较强,常用的流动相组成很难在疏水性太强的色谱柱上将其洗脱^[10]。因此,本试验将流动相组分确定为溶解能力及洗脱能力均较强的乙腈和异丙醇。试验中发现,增加流动相中异丙醇的比例,胆固醇在色谱图上的出峰时间会相应提前,说明异丙醇对其洗脱能力比乙腈要强。但是异丙醇黏度较大,流动相组成中,异丙醇比例过高,会导致柱压升高。因此综合考虑,本试验流动相组成选定为乙腈-异丙醇(67:33)。

3.3 质量控制 本试验建立的胆固醇检测方法在 5~100 ng/μL 范围内呈良好的线性关系,所测样品内胆固醇水平也均在此范围之内,精密度、重复性、稳定性试验均符合要求。有文献报道,用 HPLC 法测定胆固醇测定所需细胞数目较多,至少为 1×10^8 个^[11],而本试验检测所需细胞量为 2×10^6 个,测得的 A549 细胞内胆固醇平均水平为 22.64 μg/mg 细胞蛋白。

传统检测胆固醇的方法,会使胆固醇氧化、衍生,抑或反应生成中间产物与显色剂发生显色反应,检测到的数值一般都是间接测定的结果,受到试剂的影响大,干扰因素较多,不利于胞内微量分析^[12]。而本试验建立的 HPLC 检测法,与传统方法比较,可将胆固醇能与其他杂质良好分离且能客观准确定性定量分析。在检测过程中,胞内胆固醇的纯化和提取一直是重点难点。与国内已报道的 HPLC 法比较,本试验为了更好地减少在提取过程中胆固醇的损失,浓缩挥干过程中利用氮气吹干仪避免目标物氧化。并且,尽量让样品在整个提取过程中均保持在 0~4℃的环境中。浓缩后复溶进样的过程中,较多现已报道的方法只用单一溶剂进行复溶,本试验采用流动相组成对其进行复溶,不仅避免更多的溶剂峰对目标物色谱峰的干扰,对色谱柱也在一定程度上减少了损耗。结果显示,峰形无拖尾,溶剂峰及杂质峰无干扰,色谱重现性好,二极管阵列检测胆固醇峰纯度良好,同时也说明细胞内胆固醇的提取方法能够有效地排除干扰物质。本检测方法从细胞内胆固醇(下转第 908 页)

法学参考。本研究发 现,湖北地区人群 sdLDL-C 水平随年龄增加有增高趋势,与相关研究报道的 70 岁以上人群 sdLDL-C 水平有所下降不一致^[2]。年龄小于 50 岁的人群中,男性的 sdLDL-C 水平高于同龄女性,年龄大于 60 岁女性 sdLDL-C 水平的增幅远高于相同年龄阶段的男性,sdLDL-C 的表达和在血清中水平的高低是否受激素水平的影响有待进一步调查研究。建立本地区的生物水平参考区间对个体化医疗发展有重大意义。

参考文献

[1] King RI, Florkowski CM, Yeo J, et al. What is the best predictor of the atherogenic LDL subclass phenotype 'pattern B' in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Ann Clin Biochem, 2011, 48(Pt2): 166-169.

[2] 陈力平, 林杰, 孔维菊, 等. 不同血脂水平人群小而密 LDL 胆固醇分布及其与血脂组分的相关性[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 354-358.

[3] 黎晓绮, 郭翼华, 熊燕, 等. 不同人群 sdLDL-C 水平及其与血脂组分的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 4(4): 472-474.

[4] 李俊菠, 李晓颖, 傅强, 等. 高脂血症 LDL 亚类与血脂关系的研究[J]. 西部医学, 2011, 23(6): 1022-1025.

[5] 濮伟, 沈昊, 银李琼, 等. 血清小而密低密度脂蛋白胆固醇和同型半胱氨酸与颈动脉斑块的关系[J]. 中国医药导

报, 2015, 12(26): 58-60.

[6] 沈昊, 沈国荣, 杨鸿林, 等. 小颗粒致密低密度脂蛋白与颈动脉斑块形成及危险因素的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(11): 926-928.

[7] 王刚林, 张淑香, 潘能科, 等. 小而密低密度脂蛋白胆固醇临床研究进展[J]. 检验医学与临床, 2015, 6(12): 1804-1806.

[8] 周丽娟, 韩崇旭. 小而密低密度脂蛋白胆固醇与冠心病关系的研究[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(2): 112-113.

[9] 朱同华, 沈昊, 沈国荣, 等. 老年脑梗死患者血清小而密低密度脂蛋白胆固醇水平与颈动脉狭窄的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(24): 5405-5406.

[10] 王连升, 庄兴, 张琦, 等. 阿伐他丁对急性冠状动脉综合征患者血清 sdLDL-C 的影响[J]. 检验医学, 2011, 26(11): 726-729.

[11] 于群, 王惠民, 季伙燕, 等. 直接法测定小而密低密度脂蛋白的方法学评价[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6): 54-56.

[12] Renjith RS, Jayakumari N. A simple economical method for assay of atherogenic small dense Low-Density Lipoprotein-Cholesterol (sdLDL-C) [J]. Indian J Clin Biochem, 2011, 26(4): 385-388.

(收稿日期: 2016-12-26 修回日期: 2017-01-17)

(上接第 905 页)

醇的提取, 目标物的纯化, 再到检测条件的建立, 均是稳定可行的, 可以应用于定性定量分析细胞内的胆固醇。

参考文献

[1] 姜利英, 姚斐斐, 陈青华, 等. 胆固醇检测技术研究现状[J]. 传感器世界, 2010, 16(1): 6-9.

[2] 朱婷婷. 高脂高胆固醇饮食导致 C57BL/6J 小鼠肺脂质蓄积及其机制的初步研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012: 1-58.

[3] 杨晓青, 王佐, 吴峻. HPLC 法测定 RAW264. 7 源性泡沫细胞中胆固醇酯的含量[J]. 中国药房, 2008, 19(4): 259-261.

[4] Zhang H, Ching S, Chen Q, et al. Localized inflammation in peripheral tissue signals the CNS for sickness response in the absence of interleukin-1 and cyclooxygenase-2 in the blood and[J]. Neuroscience, 2008, 157(4): 895-907.

[5] 王术玲, 潘华新, 王培训. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 281-284.

[6] 张庆林, 吴祖泽, 曹菊荣, 等. 高效液相色谱法分析人胎肝细胞培养液中 7-铜基胆固醇[J]. 军事医学科学院, 1997, 21(2): 49-51.

[7] Araki N, Horiuchi S, Takata K, et al. Microquantification of cholesterol and cholesteryl esters in rat peritoneal macrophages by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1990, 185(2): 339-345.

[8] Cheng B, Kowal J. Analysis of adrenal cholesteryl esters by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Lipid Res, 1994, 35(6): 1115-1121.

[9] Vercaemst R, Union A, Rosseneu M, et al. Quantitation of plasma free cholesterol and cholesteryl esters by high performance liquid chromatography[J]. Atherosclerosis, 1989, 78(2/3): 245-250.

[10] Vercaemst R, Union A, Rosseneu M. Separation and quantitation of free cholesterol and cholesteryl esters in a macrophage cell by high performance liquid chromatography[J]. Chromatogr, 1989, 494(494): 43-52.

[11] 梁中书, 杨侃, 陈本美. 液相色谱-质谱联用法测定 U937 细胞内胆固醇[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(20): 51-56.

[12] 郭玮, 陈方俊, 潘柏申. 胆固醇检测方法的发展历史及标准化[J]. 检验医学, 2013, 28(11): 970-974.

(收稿日期: 2016-10-25 修回日期: 2016-12-19)