低密度脂蛋白吸收试验

Experiment of Low-density Lipoprotein Absorption

许啸鼎, 陈静, 任进*

药物安全评价研究中心, 中国科学院上海药物研究所, 上海

*通讯作者邮箱: jren@cdser.simm.ac.cn

引用格式: 许啸鼎, 陈静, 任进. (2021). 低密度脂蛋白吸收试验. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010831. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010831.

How to cite: Xu, X. D., Chen, J. and Ren, J. (2021). Experiment of Low-density Lipoprotein Absorption. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010831. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010831. (in Chinese)

摘要: Human Dil-Low Density Lipoprotein (Human Dil-LDL) 是标记了荧光探针 Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) 的低密度脂蛋白 (LDL), 可用于观察和检测细胞内或细胞膜上 LDL 的分布和数量。肝细胞系对低密度脂蛋白的吸收实验可以间接表征肝脏清除血液中 LDL-C (低密度脂蛋白-胆固醇) 的能力。本实验在对 HepG2 细胞进行不同处理后, 通过基于图像的高内涵筛选 (high content screening, HCS) 分析细胞内 Human Dil-LDL 的数量, 来评估不同处理对细胞吸收 LDL能力的影响。

关键词: Dil-LDL, LDL, 荧光检测

材料与试剂

1. 96 Well Black Assay Plate, Clear Bottom with Lid, 3603 (Corning Costar, Cambridge, MA, catalog number: 04119005)
2. Human Dil-Low Density Lipoprotein (上海翊盛生物科技有限公司, Yeason, catalog number: 20614ES76)
3. Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, catalog number: 13778075)
4. 4% PFA (国药集团化学试剂有限公司)
5. 20x PBS (上海生工生物工程有限公司, catalog number: B548117)

6. Hoechst 33342 (上海翌圣生物科技有限公司, Yeason, catalog number: 40731ES10)
7. MEM/EBSS 培养基 (Hyclone, Logan, UT, USA, catalog number: AF29549370)
8. Penicillin/Streptomycin (Gibco, Germany, catalog number: 15240-062)
9. Opti-MEM 培养基 (Gibco, Germany, catalog number: 31985-070)
10. HepG2 (ATCC, USA)
11. Dil-LDL 工作液 (见溶液配方)
12. Hoechst (见溶液配方)
13. 1x PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. PerkinElmer Operetta CLS™ (PerkinElmer, USA)
2. 移液器 (Eppendorf)

实验步骤

1. 利用 RNAiMAX 试剂, 反式转染 PCSK9 的 siRNA (30 nM) 以及阴性对照 (NC), 于底部透明的 96 孔黑板中, 按照每个孔 20 μ l Opti-MEM 培养基+ 0.2 μ l RNAiMAX + NC/siRNA (终浓度 30 nM) 的体系进行溶液配制, 之后用每孔 100 μ l MEM/EBSS 培养基以密度为 2×10^4 个/孔 HepG2 细胞进行铺板。

注: 实验中的 Opti-MEM 培养基和 MEM/EBSS 培养基, 使用前需在 37 °C 烘箱预热 15 min 左右。

2. 48 h 后, 更换无血清培养基 (此时细胞汇合度应为 70%-85%), 继续培养 24 h。
3. 将之前培养基吸走, 每个孔中添加 100 μ l Dil-LDL 溶液 (终浓度为 30-40 μ g/ml, 配置在无血清培养基中)。
4. 4 h 后, 用 Hoechst 染色。吸走含有 Dil-LDL 的溶液, 按照 Hoechst:MEM/EBSS 培养基= 1:2000 配制 Hoechst 工作液, 每孔加入 100 μ l Hoechst 工作液。
5. 5-10 min 后, 吸走板中培养基, 利用 1x PBS 清洗两次后, 加入 4% PFA 100 μ l/孔。20 min 后吸走 4% PFA, 加入 1x PBS 100 μ l 维持细胞形态。
6. 利用 PerkinElmer Operetta 拍照。

7. 利用细胞内红色荧光聚集的点的个数除以细胞个数，得到实验结果。

结果与分析

1. 首先利用 Hoechst 的蓝紫光确定细胞核的个数。(Hoechst 激发波长：360 nm；发射波长：460 nm。)
2. 利用红色荧光找到 Dil-LDL 的荧光，并计算聚集点的个数。(Dil-LDL 激发波长：488 nm；发射波长：565 nm。)
3. 红色荧光聚集的点的个数除以细胞个数，得到实验结果。

图 1. Dil-LDL 荧光探针法检测细胞对 LDL 的吸收能力

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 可以在细胞内外通过与低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的相互作用影响 LDLR 的降解，从而减弱细胞对 LDL-C 的吸收 (范磊，2020)。本实验利用 PCSK9 的 siRNA，来验证当细胞内 PCSK9 被敲低后，细胞是否会对 LDL-C 的吸收增强，进而验证利用 Dil-LDL 来指征细胞对 LDL 吸收能力的可行性 (Du *et al.*, 2016)。

最终实验结果也证明了，当细胞内 PCSK9 被敲低后，细胞对于 LDL-C 的吸收能力增强。

注意事项

1. 严格注意 Dil-LDL 的保质期，过期后会导致荧光信号极其不稳定。
2. 固定完细胞的板子不可低温储存。

溶液配方

1. Dil-LDL 工作液：使用前半小时，按照 Dil-LDL 试剂的初始浓度，利用无血清培养基，将其稀释成 30-40 µg/ml。
2. Hoechst：用无菌超纯水配制成 10 mg/ml 的储存液，-20 °C 避光保存。
3. 1x PBS：取 50 ml 20x PBS 加入 ddH₂O 并定容至 1 L，高压蒸汽灭菌，冷却后室温保存待用。
4. MEM/EBSS 完全培养基：MEM/EBSS 培养基 450 ml，FBS 50 ml，Penicillin/Streptomycin 5 ml。

致谢

感谢实验室范磊博士和侯蕾等人对于此方法的摸索。基金项目 (Foundation): 国家科技部"重大新药创制"科技重大专项 (No 2018ZX09101001-003-007)。

参考文献

1. 范磊. (2020). [miR-552-3p改善糖脂代谢失调性疾病作用发现及机制研究](#). 博士学位论文. 中国科学院大学 (中国科学院上海药物研究所).
2. Du, Y., Li, S., Cui, C. J., Zhang, Y., Yang, S. H. and Li, J. J. (2016). [Leptin decreases the expression of low-density lipoprotein receptor via PCSK9 pathway: linking dyslipidemia with obesity](#). *J Transl Med* 14(1): 276.