

尼古丁对人巨噬细胞胆固醇外流的影响

陈默野¹, 钱宗杰²

(1. 武汉市武昌医院 内三科, 湖北 武汉 430063; 2. 山西医科大学 第二医院 心内科, 山西 太原 030001)

中图分类号: R 977; R 589. 2; R 329. 2 文献标志码: A

一般认为动脉壁中巨噬细胞转变为泡沫细胞, 从而启动了动脉粥样硬化病变的发生^[1]。在巨噬细胞内部, 肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 及 LXR 诱导的信号是介导其脂代谢的重要分子基础, 也是巨噬细胞致动脉粥样硬化的重要环节^[2]。

尼古丁被认为是烟草致动脉粥样硬化作用的主要因素, 但其致动脉粥样硬化作用机制不甚明了, 最近有研究发现尼古丁致动脉粥样硬化作用与其炎症效应相关^[3]。本实验旨在探讨尼古丁对 LXR 信号途径是否影响巨噬细胞致动脉粥样硬化作用。

1 实验

1.1 材料与试剂: 21 名健康成人外周血液, 提取外周血的单核细胞作为本研究的实验材料。Ficoll 淋巴细胞分层液、2% 台盼蓝染液、小牛血清、二甲基亚砷 (DMSO)、0.02% EDTA (武汉亚法生物公司), 完全 RPMI-1640 培养液 (Gibco 公司), [³H] 胆固醇、apoA-I、TO-901317 (Sigma 公司), 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) (Alexis Biochemicals 公司), Trizol 试剂 (Promega 公司), 用于 RT-PCR 的试剂和 DNA 标记 DL-2000 (TaKaRa Biotrchnology 公司), 尼古丁 (中山生物公司)。

1.2 外周血单核细胞分离及巨噬细胞的转化: 采用 Percoll (比重 1.077) 密度梯度离心法分离收集外周血单个核细胞, 将收集的单核细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 转入 6 孔培养板, 在含有 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/L 的 RPMI1640 培养液, 加 $3.2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 的 PMA, 5% CO_2 , 37 °C 的培养箱中孵育 24 h。

1.3 巨噬细胞的处理及胆固醇外流的测定: 将巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在含有 10% 小牛血清, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/L 的 RPMI1640 培养液中加 7.4 MBq/mL [³H] 胆固醇共培养 48 h, 用 PBS 液洗涤细胞。获得的巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在上述培养液中, 实验组加终浓度 0 和

100 $\mu\text{g/L}$ 的尼古丁和同时加或不加 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 TO-901317, 培养 24 h。再用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清含 10 $\mu\text{g/L}$ apoA-I 新培养液中培育细胞 12 h, 用闪烁计数法检测培养液和细胞的 [³H] 胆固醇。胆固醇流出用培养液中分钟计数除以总分钟计数, 再乘以 100% 来表示。

1.4 反转录聚合酶链反应: 收集上述各组细胞。按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 2 μg 反转录合成 cDNA, 再取反转录产物 10 μL 进行 PCR 循环。94 °C 预变性 5 min, PCR 扩增 34 个循环 (94 °C 变性 1 min, 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min) 后, 72 °C 再延伸 10 min, 然后 4 °C 5 min。PCR 引物由武汉伯杰生物公司合成, LXR α : (上游) 5'-CTCTGGAGACATCTCGGAGGT-3', (下游) 5'-CTGATAGCAATG GCAAGGCAA-3'; ABCA1: (上游) 5'-ATAAGCCCTCTATAC TAAATGCC-3', (下游) 5'-ACAGCGTAAAGTGCTTGAATG-3'; SREBP2: (上游) 5'-ATAGGTGGCAGGGCAGAAAC-3', (下游) 5'-AATCAAGACGCTACAGCAACTCA-3'; CETP: (上游) 5'-AAGATGCCCAAGATCTCCTG-3', (下游) 5'-AAGCTCTGGAG AAATCCAC-3'; PLTP: (上游) 5'-CTGCCGAGAGGTGATTAG AAGA-3', (下游) 5'-CAGGCTATGAATGTGGGAAAAG-3'; apoE: (上游) 5'-GCCGATGGAGGAGATGGG-3', (下游) 5'-AGGCAGGAGGCACGGGGT-3'; MMP-9: (上游) 5'-CTTCCAG ACCGAGAGAAAGCC-3', (下游) 5'-CAAAGGTGAGAGAGG GCC-3'; MIP-1 α : (上游) 5'-CGCCTGCTGCTTCAGCTACAC-3', (下游) 5'-TGTGGAGGTCACAGCATGTT-3'; GAPDH: (上游) 5'-CCCATGTTCTCATGGGTGT-3', (下游) 5'-TGTCATGA TCCTTCCACGATA-3'。反应结束后, 取反应产物 10 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表各基因的表达量。

1.5 统计学分析: 在 SAS 统计分析软件上分析各组数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据数据特征作方差分析、 χ^2 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 尼古丁对巨噬细胞胆固醇外流的影响:由 apoA- I 介导的人外周血来源的巨噬细胞胆固醇外流被100 μg/L的尼古丁抑制。巨噬细胞在有 TO-901317 活化 LXR 时,促进了胆固醇的外流,在有尼古丁的作用下,抑制了 LXR 的部分作用(图 1)。

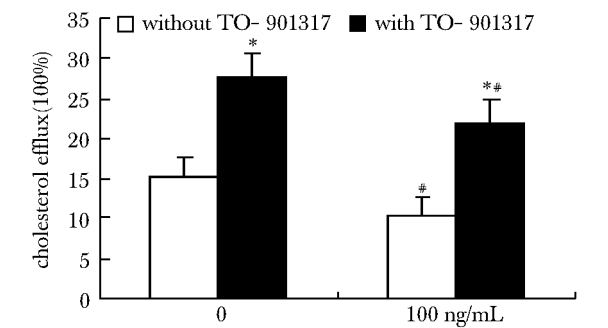


图 1 尼古丁对 apoA- I 介导的巨噬细胞的胆固醇外流的影响

Fig 1 Effect of nicotine on apoA-I mediated cholesterol efflux in macrophage ($\bar{x} \pm s, n = 21$)

* $P < 0.01$ compared with groups without TO-901317;
$P < 0.05$ compared with groups without nicotine

2.2 尼古丁对人外周血来源的巨噬细胞 LXR α 及下游基因 mRNA 表达的影响:在尼古丁的作用下,人外周单核细胞来源的巨噬细胞涉及胆固醇外流的基因 LXR α 、ATP 结合盒转移子家族 A1(ATP binding cassette A1, ABCA1)、固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding protein, SREBP2)、磷脂转运蛋白(phospholipid transfer protein, PLTP)、胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)的 mRNA 的表达均下调,而涉及炎症反应的基因 MMP-9 和 MIP-1 α 的 mRNA 的表达水平则增高。并且在加 TO-901317 活化 LXR 时,尼古丁能部分抵抗 LXR 的效应(表 1,图 2)。

3 讨论

在巨噬细胞内,通过协同调节介导胆固醇摄入、储积、细胞内合成和外流,来维持胆固醇平衡,当调节这些功能的信号出现故障,可能导致泡沫细胞的形成^[1,3]。另一方面,当巨噬细胞内的炎症因子活化,则是泡沫细胞形成和动脉粥样病变进展的直接原因。

吸烟是动脉粥样硬化的危险因素,这是广被人们所认识的,尼古丁是其中的主要的有害成分。尼古丁通过与尼古丁乙酰胆碱(nicotinic acetylcholine, nACh)受体结合,介导其生理作用。尼古丁具有致动脉粥样硬化作用,依赖于其促进巨

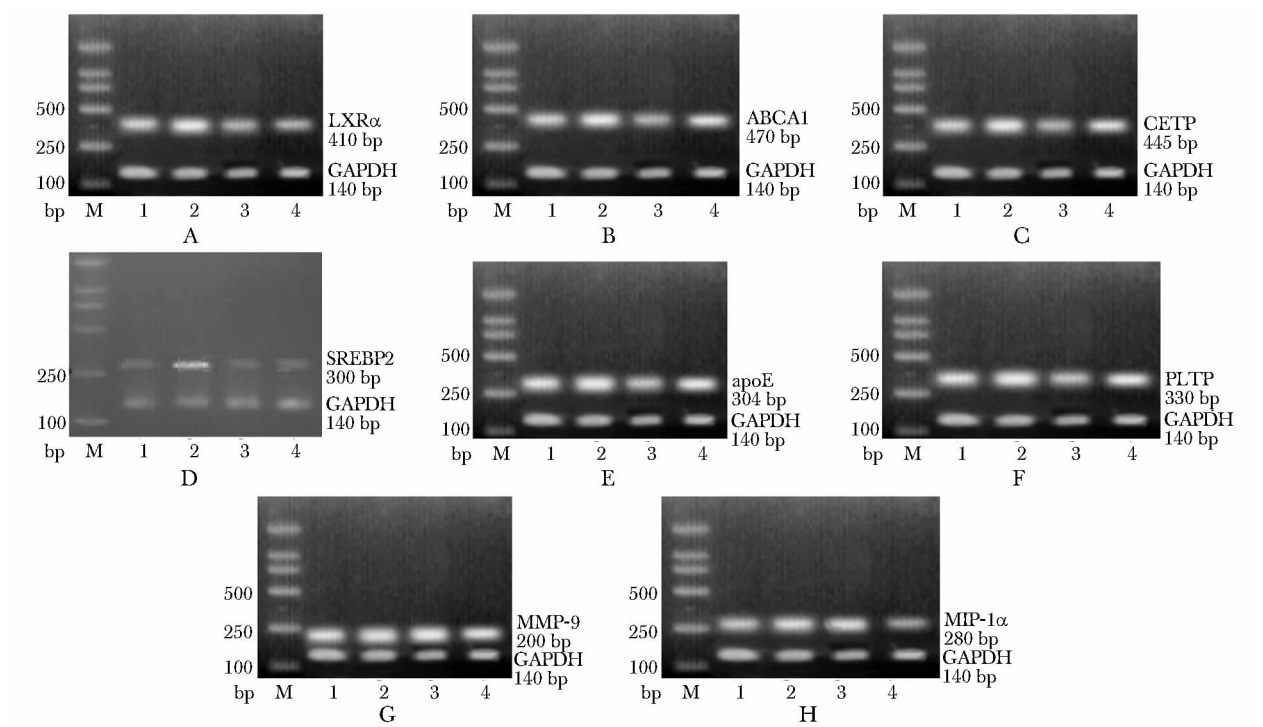


图 2 巨噬细胞 LXR α 及其目的基因的 RT-PCR 产物的电泳图

Fig 2 Gel electrophoresis map for RT-PCR of LXR α and it's target gene in macrophage

A. LXR α ; B. ABCA1; C. SREBP2; D. apoE; E. CETP; F. PLTP; G. MMP-9; H. MIP-1 α

M. DNA molecular weight marker; 1. without TO-901317 and nicotine; 2. with TO-901317 and without nicotine; 3. with 100 μg/L and without TO-901317; 4. with 100 μg/L and with TO-901317

表 1 尼古丁对巨噬细胞 LXRα 及其目的基因的表达
Table 1 LXRα and it's target gene expression on macrophage ($\bar{x} \pm s, \%, \mu\text{g/L}$)

saturation	0		100	
	without TO-901317	with TO-901317	without TO-901317	with TO-901317
LXRα	29.33 ± 2.18	41.27 ± 2.58 *	18.12 ± 3.29 [△]	20.36 ± 2.74 *
ABCA1	32.78 ± 2.43	48.69 ± 3.34 *	17.48 ± 2.52 [△]	29.37 ± 1.78 **
SREBP2	18.63 ± 2.31	34.12 ± 2.75 *	10.73 ± 2.45 [▲]	23.26 ± 1.94 **
CETP	28.09 ± 1.57	43.57 ± 2.73 *	13.75 ± 1.32 [△]	25.48 ± 2.37 **
PLTP	36.85 ± 2.54	51.23 ± 2.71 *	21.93 ± 2.47 [△]	32.04 ± 2.84 **
apoE	34.49 ± 2.59	52.78 ± 3.81 *	16.47 ± 2.35 [△]	28.14 ± 2.73 **
MMP-9	29.31 ± 2.54	20.19 ± 2.19 *	41.38 ± 2.14 [▲]	30.63 ± 2.23 **
MIP-1α	21.18 ± 1.78	34.07 ± 2.75 *	40.92 ± 2.79 [△]	19.14 ± 2.04 **

* $P < 0.01$ compared with group without TO-901317 between similar saturation of nicotine; [△] $P < 0.01$, [▲] $P < 0.05$ compared with group 0 ng/mL nicotine without TO-901317; ** $P < 0.01$ compared with group 0 ng/mL nicotine without TO-901317

噬细胞的炎症因子的分泌^[3]。可能机制是,尼古丁通过尼古丁乙酰胆碱受体直接诱导单核细胞和巨噬细胞的 iNOS 和 TNF-α 的表达,反过来,侵入病变局部的活化巨噬细胞,在其分泌的炎症因子和氧化负荷等机制的作用下,活化巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞中的 NF-κB 转录因子^[3]。尼古

丁被认为是一个可以致动脉粥样硬化的因素,但是它的具体机制并不很清楚,目前在炎症和免疫机制方面,有一定的作用。本研究中,发现尼古丁可以抑制 LXR 信号途径,影响巨噬细胞的胆固醇外流,并可通过 LXR 途径来促进炎症的发生,这可能是吸烟能致动脉粥样硬化的一个方面。

参考文献:

[1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000,407(6801): 233 – 241.

[2] Ricote M, Villedor AF, Glass CK. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004,24: 230 – 239.

[3] Lau PP, Li L, Merched AJ, *et al.* Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006,26:143 – 149.