

肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用*

唐朝克 贺修胜 易光辉 王 佐 袁中华 刘录山 危当恒 王 燕 杨永宗**

(南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001)

摘要 以 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞为研究对象, 观察肝 X 受体 α (LXR α) 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用。结果发现, 22 (R)-羟基胆固醇剂量依赖性增加 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出, 而 DIDS 剂量依赖性减少 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出。逆转录聚合酶链反应显示, 22 (R)-羟基胆固醇可增加 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXR α mRNA 的表达, DIDS 可抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXR α mRNA 的表达。结果提示, LXR α 在巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的调控作用, 这为开发和寻找抗动脉粥样硬化药物提供了新的思路。

关键词 肝 X 受体, 胆固醇流出, 低密度脂蛋白

学科分类号 R363

肝 X 受体 (liver X receptor, LXR α) 是一种氧化固醇激活的核受体, LXR 属孤儿核受体家族, 需与视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 结合形成杂合二聚体后, 方具有转录因子活性。在肠道^[1], LXR/RXR 通过激活三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 表达, 促进肠内皮细胞排出胆固醇至肠腔而减少胆固醇的吸收; 在肝脏^[2], 可诱导胆固醇 7-羟化酶基因的表达而增加胆汁酸的合成从而促进胆固醇排出体外。表明 LXR/RXR 通过对胆固醇和胆汁酸代谢相关基因表达的控制, 其激活时的总效应主要是促进胆固醇从外周返回肝脏再排出体外。氧化脂质在巨噬细胞积累对动脉粥样硬化发生发展起着重要的作用。氧化型低密度脂蛋白作用于巨噬细胞和其他血管细胞, 可影响动脉粥样硬化发生发展相关基因表达的变化。越来越多的证据显示, 核受体信号途径介导氧化脂质对细胞基因表达可能有影响^[3]。本实验以 THP-1 细胞为研究对象, 观察 LXR α 兴奋剂和抑制剂对其 mRNA 表达及细胞内胆固醇流出的影响, 以探讨 LXR α 在胆固醇流出中的作用。

1 材料与方方法

1.1 材料与试剂

THP-1 细胞由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供, 200 型高压液相色谱仪 (PE 公司), UVP 型凝胶图像分析系统, CP100MX 超速离心机 (Tokyo Japan), FJ-2107P 液体闪烁计数器 (国营二六二厂), 逆转录-多聚酶链反应试剂

盒为美国 Promega 公司产品; 牛血清白蛋白 (BSA)、载脂蛋白 A-I (apoA-I)、佛波酯 (PMA)、22 (R)-羟基胆固醇 (22 (R)-Hch) 和 4, 4-二异硫氰酸二丙乙烯 2, 2-二磺酸 (DIDS) 为 Sigma 公司产品, 总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol) 为上海生物工程公司产品, LXR α 和 GAPDH (作为内参) 引物均由上海生物工程公司合成, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市血站。按我们以前的方法^[4]制备低密度脂蛋白 (LDL), 将 210 ml 血浆置超速离心机作序列超速离心。提纯的 LDL 在含 200 μ mol/L EDTA 的 BPS 液中透析 48 h, 过滤除菌, BCA 法定量蛋白, 用 PBS 液调节蛋白质浓度至 1 g/L, 并进行修饰及鉴定, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 5% CO₂ 培养箱中静置培养 (37 $^{\circ}$ C)。培养液中加入 10 mmol/L HEPES 和青霉素、链霉素各 1.0 $\times 10^5$ U/L, 在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。

1.4 胆固醇流出实验

胆固醇流出分析按文献 [5] 的方法进行, THP-1 细胞用 0.74 $\times 10^7$ Bq/L [³H] 胆固醇,

* 湖南省科技厅重点资助项目 (01SSY1003)。

** 通讯联系人。

Tel: 073-48281288, E-mail: yzyang@mail.hy.hn.cn

收稿日期: 2003-05-14, 接受日期: 2003-06-28

50 mg/L 乙酰化低密度脂蛋白 (ac-LDL) 及含有 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液共同孵育 48 h 后, 用 PBS 液洗涤细胞, 再用含 2 g/L 牛血清白蛋白 RPMI 1640 培养液培养细胞 24 h. 再用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清含 10 mg/L apoA-I 新培养液中培养细胞 12 h, 用闪烁计数法检测培养液和细胞的 [^3H] 胆固醇. 胆固醇流出率 = 培养液 cpm 值 / (培养液 cpm 值 + 细胞裂解物 cpm 值) $\times 100\%$.

1.5 逆转录聚合酶链反应

THP-1 细胞 (1×10^7 个/瓶) 在含有 50 mg/L ac-LDL 的培养液中培养 48 h, 然后用无血清培养液培养细胞 24 h, PBS 液洗涤细胞, 用 10 mg/L apoA-I 继续培养细胞 12 h, 收集细胞. 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA. 取细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1 μl 进行 PCR 循环. 94 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 34 个循环, 末次循环 72 $^{\circ}\text{C}$, 延伸 10 min. LXR α 的引物序列为上游 5' GGGGCCAGCCCCCAAATGCTG 3', 下游 5' GCA-TCCGTGGAACATCAGT CG 3', PCR 扩增产物长度为 965 bp. GAPDH 的引物序列为上游 5' TCA-CCATCTTCCAGGAGCGAG 3', 下游 5' TGTCTGCTG-TTG AAGTCAGAG 3', PCR 扩增产物长度为 697 bp. 反应结束后, 取反应产物 10 μl 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 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 LXR α 的表达.

1.6 油红 O 染色

将细胞培养于放有消毒盖玻片的 6 孔培养板内, 细胞被处理后, 用 PBS 洗 3 次, 50% 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色液染色 8 min, 苏木素染色 6 min, 1% HCl 分化及返蓝后, 水性封片剂封片. 显微镜下观察, 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色, 图像分析系统收集图像并显微镜下摄像.

1.7 高效液相色谱方法

按文献 [6] 的方法进行. 将收获好的细胞用 1 ml 0.9% NaCl 溶液稀释细胞, 冰浴中超声破碎细胞, 工作条件为 100 W, 工作时间为 4 min, 脉冲时间为 10 s. 用 BCA 法测定蛋白质含量. 在细胞溶解产物中加入等体积新鲜配制的 15% 醇溶性 KOH, 涡旋至细胞溶解物清亮, 加入 6% 的三氯乙酸去蛋白质, 再加入等体积的正己烷: 异丙醇 (4:1) 溶液, 将混合物涡旋 5 min, 然后在 1 500 r/min、15 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 min, 收集上层有机相, 在真空干燥机

中 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 在室温中冷却后, 加入 50 μl 异丙醇: 正庚烷: 乙腈 (35:13:52), 将样品溶解, 取 10 μl 进行高效液相色谱 (HPLC) 分析. 采用 C18 柱, 以异丙醇: 正庚烷: 乙腈为流动相进行非梯度洗脱, 流速 1 ml/min, 柱温保持 4 $^{\circ}\text{C}$, 在波长 216 nm 处检测 10 min. 以峰面积定量胆固醇, 单位为 mg/g (胆固醇量/细胞蛋白质量). 胆固醇酯经胆固醇酯酶水解, 测总胆固醇量, 总胆固醇量减去游离胆固醇量为胆固醇酯的量.

1.8 统计学处理

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结 果

2.1 THP-1 巨噬细胞脂质的聚积

用 50 mg/L 乙酰化低密度脂蛋白 (ac-LDL) 与 THP-1 巨噬细胞共同孵育 48 h 后, 经油红 O 染色, 显微镜下观察, 细胞浆内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特点^[7] (图 1). 细胞内总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 与胆固醇酯 (CE)

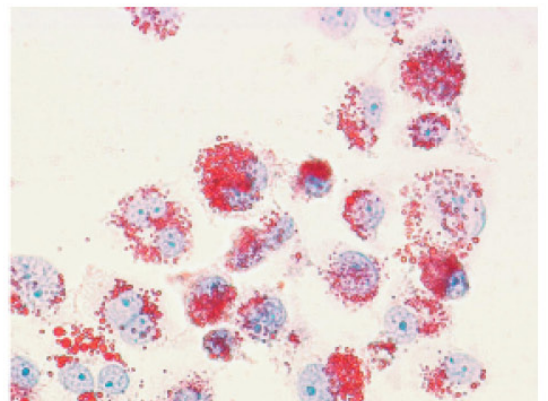


Fig. 1 THP-1 macrophage-derived foam cells were stained with oil red-O

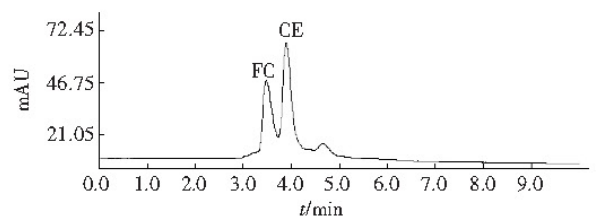


Fig. 2 The chromatography picture of cholesterol and cholesterol ester in THP-1 macrophage-derived foam cell identified by high performance liquid chromatography

FC: free cholesterol peak; CE: cholesterol ester peak.

均明显增加, 其中细胞内胆固醇酯从 56 mg/g 剧增到 412 mg/g, CE/TC 比值达到 60% 以上, 说明已为泡沫化细胞 (图 2).

2.2 22 (R) -羟基胆固醇增加泡沫细胞胆固醇流出

22 (R) -羟基胆固醇是 LXR α 激动剂. 用 50 mg/L ac-LDL 孵育 THP-1 巨噬细胞 48 h 使其泡沫化, 再用 22 (R) -羟基胆固醇孵育泡沫细胞 24 h, 测量胆固醇流出. 结果显示不同浓度 0 μ mol/L、1.25 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L 的 22 (R) -羟基胆固醇导致 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出呈剂量依赖性增加, 它们依次为 6.7%、7.9%、11.3%、12.5%、13.7%、14.2% (图 3).

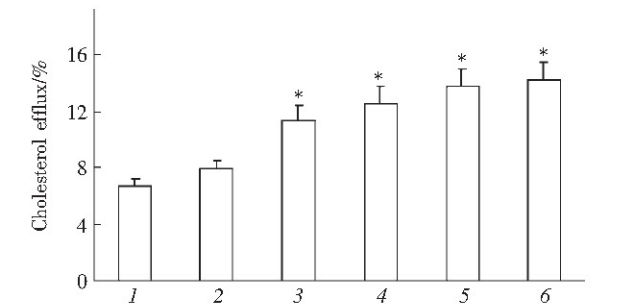


Fig.3 The effect of 22 (R) -hydroxycholesterol on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells
1: 0 μ mol/L; 2: 1.25 μ mol/L; 3: 2.5 μ mol/L; 4: 5 μ mol/L; 5: 10 μ mol/L; 6: 20 μ mol/L. *: $P < 0.05$, compared with 0 μ mol/L group. $n = 3$.

2.3 DIDS 减少泡沫细胞胆固醇流出

DIDS 是 LXR α 抑制剂. 用 ac-LDL 孵育 THP-1 巨噬细胞 48 h, DIDS 孵育细胞 24 h 后, 测量 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出. 实验结果显示, 不同浓度 0 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L DIDS 剂量依赖性减少 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出, 依次为 9.3%、8.5%、7.2%、5.8%、4.4%、4.2% (图 4).

2.4 22 (R) -Hch 增加 LXR α RNA 的表达

逆转录聚合酶链反应显示, THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞可表达 LXR α mRNA. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞暴露于不同浓度 0 μ mol/L、1.25 μ mol/L、2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L 22 (R) -羟基胆固醇 24 h 后, LXR α mRNA 的表达水平与 GAPDH 的相对面积灰度值比

较, 结果依次增强, 分别为 0.71、0.79、0.98、1.18、1.37、1.38 (图 5).

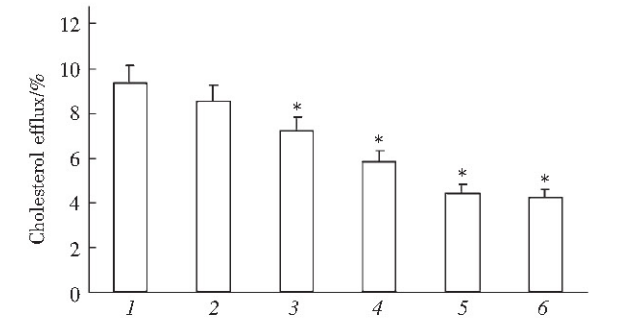


Fig.4 The effect of DIDS on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells
1: 0 μ mol/L; 2: 25 μ mol/L; 3: 50 μ mol/L; 4: 100 μ mol/L; 5: 200 μ mol/L; 6: 400 μ mol/L. *: $P < 0.05$, compared with 0 μ mol/L group. $n = 3$.

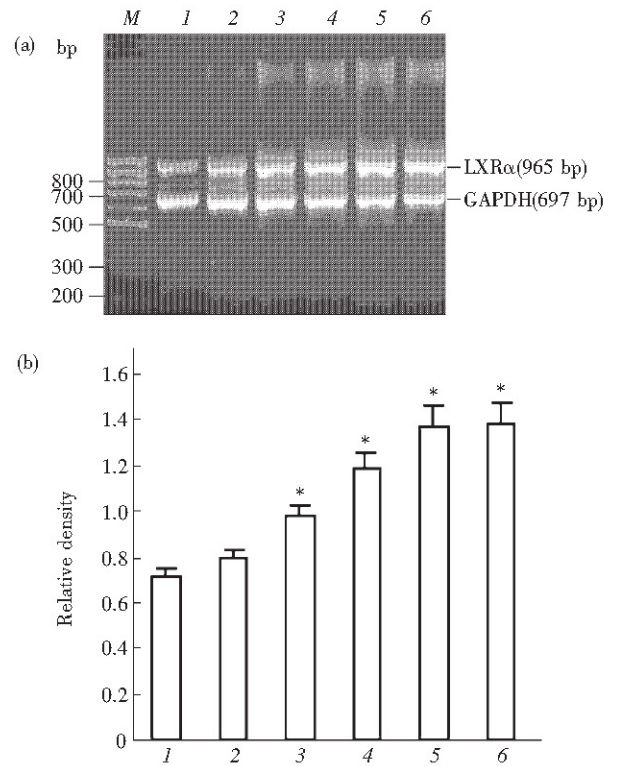


Fig.5 LXR α mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cell increased by 22 (R) -hydroxycholesterol
M: DNA marker; 1: control; 2: 1.25 μ mol/L; 3: 2.5 μ mol/L; 4: 5 μ mol/L; 5: 10 μ mol/L; 6: 20 μ mol/L. *: $P < 0.05$, compared with control group. $n = 3$.

2.5 DIDS 抑制泡沫细胞 LXR α mRNA 的表达

逆转录聚合酶链反应显示, THP-1 巨噬细胞源

性泡沫细胞暴露于不同浓度 0 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ DIDS 24 h 后, LXR α mRNA 的表达水平与 GAPDH 的相对面积灰度值比较, 结果依次递减, 分别为 0.85、0.81、0.63、0.38、0.19、0.18 (图 6)。

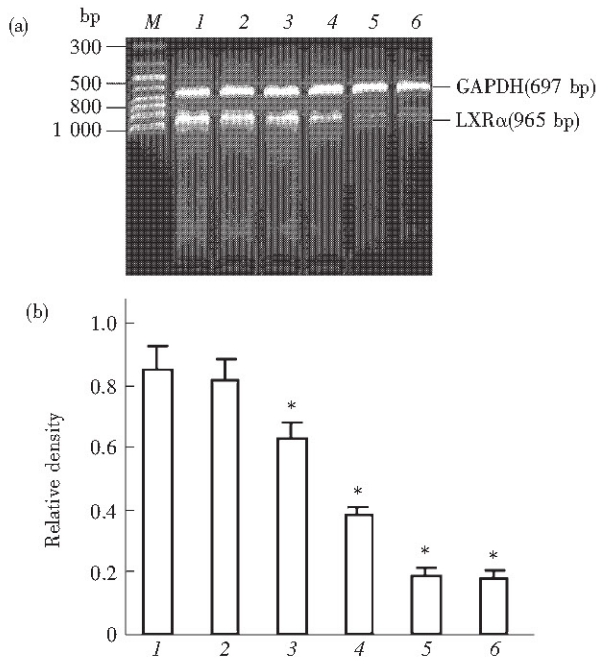


Fig. 6 LXR α mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cell inhibited by DIDS

M: DNA marker; 1: control; 2: 0.025 mmol/L; 3: 0.05 mmol/L; 4: 0.1 mmol/L; 5: 0.2 mmol/L; 6: 0.4 mmol/L. *: $P < 0.05$, compared with control group. $n = 3$.

3 讨 论

核受体在调控脂肪酸和胆固醇代谢方面起着非常重要的作用。这些受体如 LXR α 、过氧化体增殖物激活型受体 (PPARs) 和法呢醇 X 受体 (FXR) 需要 RXR 作为共同伙伴来识别并结合它们的激素反应元件, LXR α 和 FXR 分别是氧化固醇和胆汁酸的感受器^[8], 而 PPARs 可能是脂肪酸, 前列腺素和 ox-LDL 的感受器。因此, PPARs:RXR, LXR α :RXR 和 FXR:RXR 似乎形成一个调控网络基础, 这个网络控制细胞内脂质平衡, 并介导自分泌和旁分泌信号分子。许多实验室最近的工作已开始研究负荷脂质巨噬细胞的胆固醇流出途径, 结果表明, 转运体 ABC 家族的两个成员即 ABCA1 和 ABCG1 在负荷脂质巨噬细胞可以被诱导高表达。最近研究^[9, 10]显示 LXR 和 PPAR 信号途径在胆固

醇流出方面具有趋同性, LXR α 基因是 PPAR α 的一个直接靶基因, 巨噬细胞对 ox-LDL 的反应是通过增加 PPAR γ 和 LXR α 表达来应答, 这两个核受体之间的联系显示出转录级联过程, 在对 PPAR 和 LXR 配体反应时激活这一级联过程, 以共同调节巨噬细胞对负荷脂质的反应。

Li 等^[11]最近发现 LXR 配体可直接引起 LXR α 基因自动诱导表达, 他们用一种最新合成的 LXR 配体即 TO901317 处理已分化 THP-1 细胞, 发现呈剂量时间依赖性方式上调 LXR α 基因表达, 这种自动调节也发生在其他细胞如人类皮肤成纤维细胞。因此, 他们提出一种模型即 LXR 配体激起一个自动调节环, 导致选择性诱导 LXR α 基因表达, 增加 hLXR α 水平和它的下游靶基因 ABCA1 的转录, 这为细胞对 LXR 配体和负荷胆固醇反应提供一个简单而灵敏的机制。

本实验结果显示, 乙酰化低密度脂蛋白可使 THP-1 巨噬细胞胆固醇大量堆积, LXR α 激动剂可使 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXR α mRNA 表达上调, 并使泡沫细胞胆固醇流出增加, 而 LXR α 抑制剂可使 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXR α mRNA 表达下调, 并使泡沫细胞胆固醇流出减少。这些结果表明, LXR α 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的调控作用, 这为开发和寻找抗动脉粥样硬化药物提供了新的思路。

参 考 文 献

- 1 Repa J J, Turley S D, Lobaccaro J A, *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, 2000, **289** (5484): 1524 ~ 1529
- 2 Lu T T, Makishima M, Repa J J, *et al.* Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*, 2000, **6** (3): 507 ~ 515
- 3 唐朝克, 杨永宗. ABCA1 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用. *生命的化学*, 2003, **23** (2): 138 ~ 140
Tang C K, Yang Y Z. *Chemistry of Life*, 2003, **23** (2): 138 ~ 140
- 4 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 304 ~ 308
Tang C K, Yi G H, Tang G H, *et al.* *Chin J Arteriosclerosis*, 2003, **11** (4): 304 ~ 308
- 5 Guorong Lin, Bornfeldt K E. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, **290**: 663 ~ 669
- 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. *中国动脉硬化杂志*. 1998, **6** (4): 317 ~ 320
Wang Z, Li Q Z, Yang X D, *et al.* *Chin J Arteriosclerosis*, 1998, **6** (4): 317 ~ 320
- 7 唐朝克, 杨永宗, 易光辉, 等. 三磷酸腺苷结合盒转运体 1 在

- THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用. 中国病理生理杂志, 2003, **19** (8): 1084 ~ 1088
- Tang C K, Yang Y Z, Yi G H, *et al.* Chin J Pathophysiology. 2003, **19** (8): 1084 ~ 1088
- 8 Wan Y J, An D, Cai Y, *et al.* Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor α as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. Mol Cell Biol, 2000, **20** (12): 4436 ~ 4444
- 9 Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, *et al.* PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. Nat Med, 2001, **7** (1): 53 ~ 58
- 10 Chawla A, Boisvert W A, Lee C H, *et al.* A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. Mol Cell, 2001, **7**: 161 ~ 171
- 11 Li Y, Bolten C, Bhat B G, *et al.* Induction of human liver X receptor α gene expression via an autoregulatory loop mechanism. Mol Endocrinol, 2002, **16** (3): 506 ~ 514

The Action of Liver X Receptor α on Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophage-Derived Foam Cells*

TANG Chao-Ke, HE Xiu-Sheng, YI Guang-Hui, WANG Zuo,

YUAN Zhong-Hua, LIU LU-Shan, WEI Dang-Heng, WANG Yan, YANG Yong-Zong**

(Institute of Cardiovascular Disease of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract The liver X receptors (LXR) nuclear receptors are intracellular sensors of cholesterol excess and are activated by various oxysterols. LXRs have been shown to regulate multiple genes of lipid metabolism. After exposure of the cultured THP-1 macrophage-derived foam cells to 22 (R)-hydroxycholesterol and 4, 4'-diisothiocyano stilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) respectively at different concentrations for 24 h, cholesterol efflux and liver X receptor α mRNA level were determined by FJ-2107P type liquid scintillator and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. 22 (R)-hydroxycholesterol increases cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells with dose dependance and DIDS inhibits cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells with dose dependence too; RT-PCR showed that exposure of the cultured THP-1 macrophage-derived foam cells to 22 (R)-hydroxycholesterol and DIDS at different concentrations for 24 h respectively, resulted in increase and decrease respectively in the expression of liver X receptor α mRNA in THP-1 macrophage-derived foam cells with dose dependence. It can be concluded that liver X receptor α plays an important role in cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells.

Key words liver X receptor (LXR), cholesterol efflux, low density lipoprotein

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Department of Science and Technology of Hunan Province (01SSY1003)

** Corresponding author. Tel: 86-73-48281288, E-mail: yzyang@mail.hy.hn.cn

Received: May 14, 2003 Accepted: June 28, 2003