

[文章编号] 1007-3949(2006)14-08-0685-04

•临床研究•

罗格列酮对冠心病患者外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达的影响

李华波^{1,2}, 全智华¹, 杨 薪¹, 李颖庆¹

(1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖北民族学院附属医院心内科, 湖北省恩施市 445000)

[关键词] 内科学; 罗格列酮增强单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 的表达; 逆转录聚合酶链反应; 单核细胞; 罗格列酮; 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 以冠心病患者外周血单核细胞为研究对象, 观察不同浓度的罗格列酮对体外培养的单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达的影响, 以探讨罗格列酮对动脉粥样硬化发生发展的影响。方法 密度梯度离心法分离冠心病患者外周血单核细胞, 再分别与 0、0.1、1.0 及 10.0 μmol/L 罗格列酮作用 24 h, 提取各组细胞总 RNA, 逆转录聚合酶链反应分别检测三磷酸腺苷结合盒转运子 A1、过氧化体增殖物激活型受体 γ 及肝 X 受体 α mRNA 的表达, Western blot 检测三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白的表达。结果 罗格列酮引起冠心病患者外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 与蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$), 过氧化体增殖物激活型受体 γ 和肝 X 受体 α mRNA 表达亦上调 ($P < 0.05$)。结论 罗格列酮可能通过过氧化体增殖物激活型受体 γ-肝 X 受体 α-三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 途径影响外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 的表达, 从而在动脉粥样硬化的防治过程中发挥重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Rosiglitazone on the Expression of ATP-Binding Cassette Transporter A1 in Monocytes of Coronary Heart Disease

LI Huar Bo, QUAN Zhi-Hua, YANG Xin, and LI Ying-Qing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Monocytes; Rosiglitazone; ATP-Binding Cassette Transporter A1; Atherosclerosis; Peroxisome Proliferators Activated Receptor γ; Liver X Receptor α

[ABSTRACT] **Aim** To study the rosiglitazone on the expression of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA and protein in monocytes of coronary heart disease. **Methods** Monocytes were isolated by density gradient method from blood of coronary heart disease, and then incubated with 0, 0.1, 1.0 and 10.0 μmol/L rosiglitazone for 24 h, total RNA of monocytes were abstracted, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to inspect the expression of ABCA1, peroxisome proliferators activated receptor γ (PPARγ) and liver X receptor α (LXRα) mRNA, Western blot were performed to inspect the expression of ABCA1 protein level. **Results** Rosiglitazone could increase the expression of ABCA1 mRNA and protein in monocytes ($P < 0.05$). Rosiglitazone increased the expression of PPARγ and LXRα mRNA in monocytes too ($P < 0.05$). **Conclusions** Rosiglitazone could likely via PPARγ-LXRα-ABCA1 pathway increase the expression of ABCA1 mRNA and protein in monocytes. It implied that rosiglitazone might play an important role in the prevention of atherosclerosis by increasing the gene expression of ABCA1.

细胞内胆固醇代谢障碍是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要发病机制。胆固醇从周围组织中的清除是预防 As 的关键步骤。三磷酸腺苷结合盒转运子 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)是 ATP 结合盒转运子(ATP-binding cassette transporter, ABC)超家族的成员之一。ABCA1 能促进

细胞内胆固醇流出而参与胆固醇的逆向转运过程, 从而清除外周组织中过量的胆固醇^[1]。因此 ABCA1 表达水平的高低对于 As 的发生发展及治疗可能起重要作用。过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)属于核内受体超家族成员, 具有多种生物学效应, 与糖、脂质代谢及心血管疾病的发生发展密切相关, 有 α、β/δ、γ 三种亚型。国外研究发现, PPAR 激动剂对 ABCA1 的表达有重要的调节作用^[2-4]。噻唑烷酮类化合物(thiazolidinedione, TDZ)罗格列酮是 PPARγ 激动剂, 作为胰岛素受体增敏剂, 广泛应用于糖尿病、代谢综合症

[收稿日期] 2006-01-10 [修回日期] 2006-07-19

[作者简介] 李华波, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的防治, E-mail 为 Lihb1108@163.com。通讯作者全智华, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的防治。杨薪, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病的防治。

等相关疾病的治疗中。为了探讨 TDZ 类药物对于冠心病患者组织细胞 ABCA1 的表达是否有影响, 我们提取经冠状动脉造影确诊为冠心病患者的外周血单核细胞, 进行体外培养, 然后检测与罗格列酮作用前后单核细胞 ABCA1 表达的情况, 从而为 TDZ 类药物用于 As 的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

淋巴细胞分离液(上海试剂二厂); Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen 公司); 逆转录聚合酶链反应, 试剂盒(Promega 公司); 高保真聚合酶链反应扩增试剂盒(上海生物工程公司); 羊抗人 ABCA1 一抗(Santa Cruz 公司), 辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗(武汉博士德公司); 罗格列酮原药粉(Cayman 公司)。其他试剂与材料均为进口或国产分析纯。ABCA1、LXR α 、PPAR γ 、GAPDH 引物均由上海博亚生物有限公司合成。

1.2 病例选择与单核细胞的分离及培养

选择经冠状动脉造影确诊为冠心病的病例 6 例, 并行血糖、血脂、心电图等相关检查, 排除 Tangier 病及家族性高密度脂蛋白缺乏症患者。无菌采集冠心病患者血液标本, 生理盐水 1:1 稀释。用尖头吸管轻轻铺于比重 1.077 淋巴细胞分离液表面, 稀释血与淋巴细胞分离液体积比为 2:1, 形成清晰界面。台式离心机 1 800 r/min 离心 20 min, 离心后单个核细胞悬于分层液面, 呈白膜状。用吸管轻轻将单个核细胞吸入另一管内, PBS 清洗 2 次(1 500 r/min, 5 min)。将清洗后的细胞重悬于 RPMI 1640 培养基(含 25 mmol/L Hepes Buffer, 1% 谷氨酰胺, 100 ku/L 青霉素和链霉素, 10% 胎牛血清)。台盼蓝拒染试验显示活细胞 > 95%。将细胞接种于培养皿中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 2 h 后, 换液, 用 37℃ 预热的培养基清洗 2 次, 将未贴壁细胞洗脱, 瑞氏染色鉴定贴壁细胞为单核细胞, 85% 以上。将贴壁细胞用细胞刮片轻轻刮下, 重悬于 RPMI 1640 培养基中, 调整细胞浓度为 1×10^6 /L, 然后将上述细胞悬液接种于 12 孔培养板中, 分别加入 0、0.1、1.0 及 10.0 μ mol/L 浓度的罗格列酮, 于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养 24 h。

1.3 逆转录聚合酶链反应

收集各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μ g 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再各取 2 μ L 逆转录产物分别进行 PCR 循环。AB-

CA1 引物序列上游 5'-GTA TTT TTG CAA GGC TAC CAG TTA CAT TTG ACA A-3', 下游 5'-GAT TGG CIT CAG GAT GTC CAT GTT GGA A-3', 扩增片段长度为 177 bp; PPAR γ 引物序列上游 5'-TGT GAA GCC CAT TGA AGA CA-3', 下游 5'-GAG CGG GTG AAG ACT CAT GT-3', 扩增片段长度为 199 bp; LXR α 引物序列上游 5'-GCG AGG GCT GCA AGG GAT TCT-3', 下游 5'-ATG GGC CAA GGC GTG ACT CG-3', 扩增片段长度为 376 bp; GAPDH 引物序列上游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 下游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 扩增片段长度为 697 bp。扩增条件为 94℃ 温育 5 min 后, 94℃ 变性 40 s \rightarrow 复性 30 s (LXR α 为 60℃, PPAR γ 为 53℃) \rightarrow 72℃ 延伸 30 s, 共 32 个循环, 末次循环 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, 取反应产物 6 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Alphasizer 3400 Imaging 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目的基因的表达水平^[5]。

1.4 Western blot 检测三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白表达

在收集的细胞中加入三去污细胞裂解液进行细胞裂解, 0℃ 放置 30 min, 4℃、12 000 g 离心 2 min, 弃沉淀, BCA 法蛋白定量, 取 50 μ g 蛋白加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中, 在 100℃ 水浴 10 min, 立刻置于冰上备用。用 6% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分离, 转 PDVF 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白分子量标准位置。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h。按 1:200 加入羊抗人 ABCA1 一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 1:2 000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 用 Western blot 检测试剂盒显示于 X 线片。结果用 Alphasizer 3400 Imaging 图像分析系统对胶片扫描, 以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 罗格列酮对单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 表达的影响

单核细胞 ABCA1 mRNA 的表达随罗格列酮浓度增加而增高($P < 0.05$), 见表 1 和图 1。

表 1. 不同浓度罗格列酮对单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

罗格列酮 ($\mu\text{mol/L}$)	mRNA 表达
0	0.101 \pm 0.030
0.1	0.313 \pm 0.035 ^a
1.0	0.607 \pm 0.036 ^{ab}
10.0	0.715 \pm 0.032 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较。

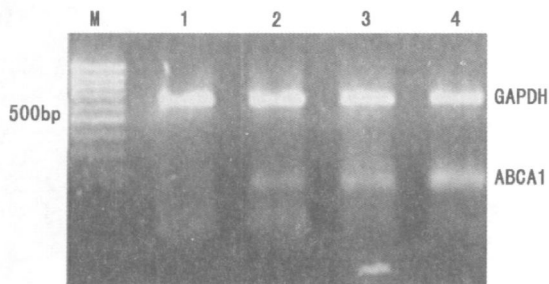


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 的表达 M 为 100 bp Marker, 1 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 2 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 3 为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 4 为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组。

2.2 罗格列酮对单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 和肝 X 受体 α mRNA 表达的影响

罗格列酮与单核细胞孵育后, PPAR γ 及 LXR α mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.05$), 见表 2 和图 2。

表 2. 罗格列酮对单核细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 和肝 X 受体 α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

罗格列酮 ($\mu\text{mol/L}$)	PPAR γ	LXR α
0	0.202 \pm 0.024	0.297 \pm 0.047
0.1	0.448 \pm 0.029 ^a	0.608 \pm 0.059 ^a
1.0	0.587 \pm 0.035 ^{ab}	0.919 \pm 0.067 ^{ab}
10.0	0.726 \pm 0.033 ^{ab}	0.954 \pm 0.072 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较。

2.3 罗格列酮对单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白表达的影响

单核细胞 ABCA1 蛋白的表达随罗格列酮浓度增加而增高 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 3。

3 讨论

随着对 Tangier 病、家族性高密度脂蛋白缺乏症发病机制的阐明, 现已确定 ABCA1 的主要功能是参

表 3. 罗格列酮对单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

罗格列酮 ($\mu\text{mol/L}$)	蛋白表达
0	100% \pm 18%
0.1	228% \pm 22% ^a
1.0	587% \pm 27% ^{ab}
10.0	756% \pm 26% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组比较。

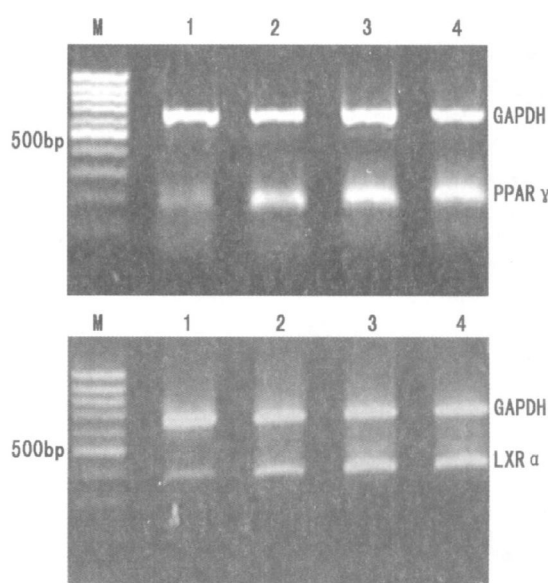


图 2. 逆转录聚合酶链反应检测过氧化体增殖物激活型受体 γ 和肝 X 受体 α mRNA 的表达 M 为 100 bp Marker, 1 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 2 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 3 为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 4 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组。

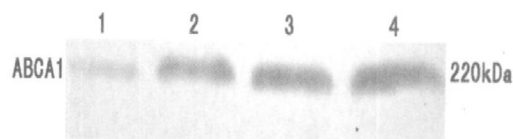


图 3. Western blot 检测三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白的表达 1 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 2 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 3 为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组, 4 为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮组。

与胆固醇逆转运^[6]。ABCA1 介导细胞内胆固醇和磷脂外流, 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 介导胆固醇逆转运的第一步, 具有抗动脉粥样硬化的作用^[7]。正常外周细胞膜上的 ABCA1 首先介导细胞内的磷脂流出, 并与细胞外的载脂蛋白 A iv 结合形成盘状的磷脂-载脂蛋白 A iv 复合物; 然后细胞内的胆固醇通过扩散跨膜流出, 被盘状的磷脂-载脂蛋白 A iv 复合物捕获, 形成前 β -HDL; 在卵磷脂胆固醇脂酰转移酶的作用下, 转变成富含胆固

醇酯的球状的成熟 HDL^[8]。由此启动胆固醇逆转运过程。ABCA1 基因表达异常能导致细胞内胆固醇沉积,影响 HDL 的合成与分解, HDL 颗粒变小,浓度降低,水平严重缺陷,冠心病的危险性增加。

过氧化体增殖物激活型受体(PPAR)作为核受体超家族成员,在机体糖、脂质代谢的过程中起着重要的调节作用。有研究发现,PPAR α 及 PPAR γ 对 ABCA1 基因表达有重要的调节作用。TZD 类药物作为 PPAR γ 激动剂,目前在临床上广泛应用于 2 型糖尿病及代谢综合症等疾病的治疗,然而这类药物除了具有调节糖代谢及改善胰岛素抵抗的作用外,还具有调节脂质代谢以及抗炎等作用,表现为重要的抗 As 作用。研究表明 TZD 类药物可加速富含甘油三酯的脂蛋白代谢,影响循环中脂肪酸、胆固醇和甘油三酯水平,提高血浆 HDLC 水平^[9]。近期有研究发现,PPAR γ 的天然配体与人工合成配体均能增加巨噬细胞清道夫受体 CD36 和 ABCA1 的表达^[10]。而对于 PPAR γ 基因缺陷的小鼠, TZD 类药物则不能增加巨噬细胞 ABCA1 的表达^[11],这些实验说明 PPAR γ 可通过调控介导胆固醇流出及血浆转运相关基因的表达而在胆固醇代谢中发挥重要作用。

本研究发现,PPAR γ 激动剂罗格列酮能够上调体外培养的冠心病患者外周血单核细胞 ABCA1 的基因及蛋白水平的表达。尽管目前尚未在 ABCA1 启动子区发现 PPAR 反应元件(peroxisome proliferator activated receptor reaction element, PPRE),但有实验证实,PPAR 激动剂首先与 LXR 基因启动子区的 PPRE 结合,激活的 LXR 与 ABCA1 基因启动子区的 LXR 反应元件结合,进而上调 ABCA1 的表达^[12,13]。本研究也发现罗格列酮能增加人单核细胞 PPAR γ 及 LXR α 的基因表达,与国外的研究结果一致,说明罗格列酮上调冠心病患者单核细胞 ABCA1 表达机制亦可能是通过 PPAR γ -LXR-ABCA1 途径实现的。本研究从体外证明罗格列酮可能通过上调单核细胞 ABCA1 的表达,进而通过 ABCA1 途径增加外周细胞内

胆固醇的流出,提高外周血 HDL 水平,产生抗 As 效应,从而在冠心病的预防和治疗中发挥作用。

[参考文献]

- [1] Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1 partners in the removal of excess cellular cholesterol[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 720-727
- [2] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway[J]. *Nat Med*, 2001, **7** (1): 53-58
- [3] Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) reduces cholesterol esterification in macrophages[J]. *Circulation Research*, 2003, **92** (2): 212-217
- [4] Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (3): 457-482
- [5] 唐朝克, 甘露, 燕春艳, 刘俊文, 王双, 杨峻浩, 等. 氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 497-501
- [6] Brooks Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency[J]. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 336-345
- [7] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease[J]. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 347-351
- [8] Smith JD, Le Goff WL, Settle M, Brubaker G, Waelde C, Horwitz A, et al. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-II[J]. *J Lipid Res*, 2004, **45** (4): 635-644
- [9] Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. *Diabetes*, 1999, **48** (2): 254-260
- [10] Hodgkinson CP, Ye S. Microarray analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induced changes in gene expression in macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308** (3): 505-510
- [11] Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsue K, Pimprale S, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (8): 2607-619
- [12] Ruan XZ, Moorhead JF, Fernando R, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z. PPAR agonists protect mesangial cells from interleukin 1-induced intracellular lipid accumulation by activating the ABCA1 cholesterol efflux pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14** (3): 593-600
- [13] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis[J]. *Mol Cell*, 2001, **7** (1): 161-171

(此文编辑 文玉珊)