

烟酸对 3T3-L1 脂肪细胞胆固醇流出的影响

于碧莲, 赵水平, 谢湘竹, 董劭壮

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 烟酸; 脂肪细胞; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; B 族 iv 型清道夫受体; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 胆固醇流出

[摘要] 目的 观察烟酸对分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞胆固醇流出的影响, 并探讨其机制。方法 3T3-L1 细胞促分化成熟后, 给与不同浓度的烟酸(0~1.0 mmol/L) 干预 24 h 后, 收集细胞, 逆转录聚合酶链反应测定脂肪细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1、B 族 iv 型清道夫受体和过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达, 采用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。结果 烟酸呈剂量依赖性增加脂肪细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 mRNA 的表达, 并促进载脂蛋白 A iv 介导的胆固醇流出, 但对 B 族 iv 型清道夫受体表达无影响。过氧化体增殖物激活型受体 γ 在分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞有较高水平的表达, 与空白组(0.38 ± 0.29) 比较, 在 1.0 mmol/L 浓度的烟酸干预时过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达明显升高(3.15 ± 0.96), 为空白组的 8.3 倍。结论 烟酸可通过上调过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达, 促进脂肪细胞载脂蛋白 A iv—三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 通路, 加速细胞内胆固醇流出。这可能为解释烟酸升高高密度脂蛋白胆固醇的机制提供有用的线索。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Niacin on Cholesterol Efflux in 3T3-L1 Cells

YU Bi-Lian, ZHAO Shui-Ping, XIE Xiang-Zhu, and DONG Shao-Zhuang

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Niacin; Adipocyte; Adenosine Triphosphate Binding Cassette Transporter A1; Scavenger Receptor Class B Type iv; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma; Cholesterol Efflux

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of niacin on cholesterol efflux in fully differentiated 3T3-L1 cells and the possible mechanism. **Methods** Fully differentiated 3T3-L1 cells were incubated in the medium containing various concentration of niacin (0~1.0 mmol/L) for 24 h ($n=6$). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to evaluate adipocytes mRNA expression. Cholesterol efflux rate was determined through measuring release of radioactivity from ^3H -cholesterol prelabeled cells into medium containing apolipoprotein A iv. **Results** Niacin could dose-dependently increase adenosine triphosphate binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA expression and apolipoprotein A iv-mediated cholesterol efflux in 3T3-L1 cells, but had no effect on scavenger receptor class B type iv mRNA expression. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) presented high level expression in fully differentiated 3T3-L1 cells. Compared with control (0.38 ± 0.29), niacin significantly enhanced PPAR γ mRNA expression. The maximal induction was obtained with 1.0 mmol/L of niacin.

Conclusion Niacin could enhance the ABCA1 pathway in adipocytes, up-regulate PPAR γ mRNA expression, then increase cholesterol efflux. This new action of niacin might provide rational explanation to the mechanisms of raising high-density lipoprotein cholesterol.

烟酸作为一种降脂药应用于临床已近 50 年, 它可通过抑制外周脂肪组织的脂解而降低血浆低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和甘油三酯(triglyceride, TG)浓度, 并可升高高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)^[1]。至目前为止, 烟酸升高 HDLC 的机制尚不明确。脂肪组织是体内最大的胆固醇储存池, 但脂肪细胞不能分解胆固醇, 胆固醇流出在脂肪细

胞胆固醇平衡中起重要作用。本文旨在通过研究烟酸对 3T3-L1 脂肪细胞参与胆固醇流出的主要受体——三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(adenosine triphosphate binding cassette transporter A1, ABCA1)和 B 族 iv 型清道夫受体(scavenger receptor class B type iv, SR-B iv)以及上游调控基因过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 的影响, 来探讨烟酸升高 HDLC 的机制。

[收稿日期] 2006-12-04

[修回日期] 2007-03-15

[作者简介] 于碧莲, 硕士研究生, 主要从事血脂与动脉粥样硬化的关系研究, E-mail 为 yblzxh@hotmail.com。通讯作者赵水平, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化的关系研究, E-mail 为 zhaosp@medmail.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

3T3-L1 脂肪前体细胞购买自中国科学院细胞

生物化学研究所, 载脂蛋白 A iv (apolipoprotein A iv, ApoA iv)、DMEM 培养基、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素、地塞米松均购自美国 sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 牛血清白蛋白购自 Sino American Biotech, ^3H -胆固醇购自 Amersham Life Science 公司。逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试验中, Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品, 逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司, 引物由北京奥科生物公司设计及合成, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 3T3-L1 脂肪前体细胞培养与诱导分化

小鼠 3T3-L1 脂肪前体细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。待细胞生长至完全汇合后 2 天开始诱导分化, 将培养液换成含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松和 10 mg/L 胰岛素的完全培养液; 48 h 后, 撤去 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤和地塞米松, 使完全培养液中只含有胰岛素 10 mg/L; 48 h 后, 撤去胰岛素, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞, 每 48 小时换液一次, 直到 95% 的细胞都为成熟的脂肪细胞。诱导分化时间一般为 7~8 天。用油红 O 染色对成熟的脂肪细胞进行鉴定^[2]。

1.3 烟酸干预试验

细胞分化成熟后, 用含 1% 胎牛血清的培养液行饥饿疗法 24 h 后, 加入不同浓度的烟酸 (0、0.25、0.5 和 1.0 mmol/L) 干预 24 h。

1.4 胆固醇流出测定

胆固醇流出测定按文献[3]描述的方法进行。种植于 24 孔板的分化成熟的脂肪细胞用 0.5 μCi /孔 ^3H -胆固醇和含 0.2% 牛血清白蛋白的 DMEM 培养液共同孵育 24 h 之后, 用 DMEM 培养液洗涤细胞, 再用含 0.2% 牛血清白蛋白的 DMEM 培养液培养细胞 24 h, 并在培养液中加各种影响因素。之后, 再用培养液洗涤细胞, 在含 10 $\mu\text{g/L}$ 载脂蛋白 A iv 无血清新培养液中培养细胞 4 h, 闪烁计数法分别检测培养液和细胞中的 ^3H -胆固醇, 胆固醇流出率 = 培养液中 CPM/总 CPM $\times 100\%$ 。

1.5 逆转录聚合酶链反应

种植于 6 孔板的分化成熟的脂肪细胞在含或不含烟酸的培养液中培养 24 h 后, 磷酸缓冲液洗涤细胞后收集各组细胞。按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 10 μL 进行 PCR 循环。各引物序列如下: GAPDH 上游 5'-TCACTG CCA CCC AGA AGA ACT-3', 下游 5'-TGA AGT CGC AGG AGA CAA CC-

3'; ABCA1 上游 5'-CAA GGA TGG CCA TAA TGG TCA-3', 下游 5'-GGC CAC ATC CACAAC TGT CTG-3'; SR-B iv 上游 5'-CCA GGC TGT GGG AAC TCT AGC-3', 下游 5'-CCT CCG AAT ACC CTC TGG TGA-3'; PPAR γ 上游 5'-TGG AGC CTA AGT TTG AGT TTG C-3', 下游 5'-TGA CGA TCT GCC TGA GGT CTG-3'。PCR 扩增产物长度分别为 318、401、413、250 bp。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s \rightarrow 57 $^{\circ}\text{C}$ (ABCA1 和 GAPDH)、59.3 $^{\circ}\text{C}$ (SR-B iv)、58 $^{\circ}\text{C}$ (PPAR γ) 退火 60 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应结束后, 取反应产物 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, 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 ABCA1、SR-B iv 和 PPAR γ mRNA 的表达量。

1.6 统计学分析

所有实验数据均输入 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析, 对主要指标进行正态性检验, 采用 one-way ANOVA 分析来进行组间比较。主要实验数据来自三次以上重复实验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 烟酸对三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响

烟酸呈浓度依赖性增加 ABCA1 mRNA 的表达。0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 浓度的烟酸干预后, ABCA1 mRNA 相对表达量分别为 0.59 ± 0.16 、 0.69 ± 0.23 和 1.38 ± 0.16 , 与空白组 (0.29 ± 0.03) 相比较, 分别增加 1、1.4 和 3.8 倍 (图 1)。

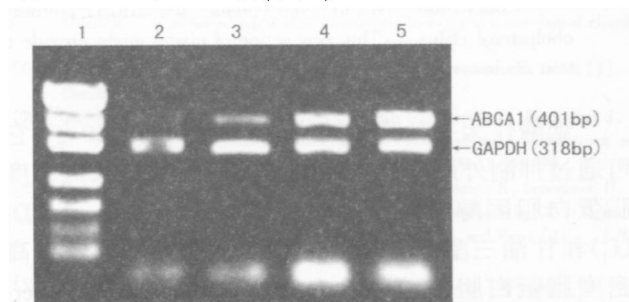


图 1 烟酸对三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响 1 为 pUC19 DNA/Msp iv 分子质量, 2 为空白对照, 3~5 分别为 0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 烟酸。

2.2 烟酸对过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响

过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ) 在分化

成熟的 3T3-L1 脂肪细胞有较高水平的表达,与空白组比较,PPAR γ 表达在 1.0 mmol/L 浓度的烟酸干预时明显升高 (3.15 ± 0.96 比 0.38 ± 0.03 , $P < 0.001$),而 0.25 和 0.5 mmol/L 烟酸干预可使 PPAR γ 表达升高(分别为 0.91 ± 0.26 和 1.05 ± 0.15),但与空白组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。

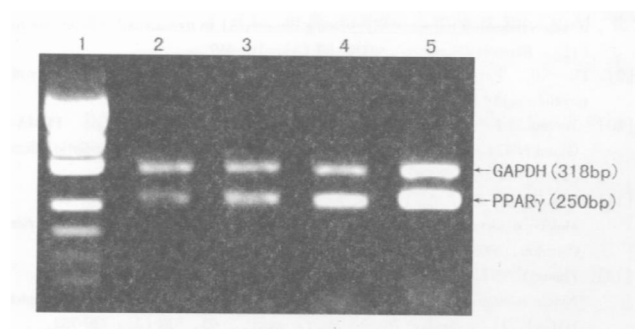


图 2. 烟酸对过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响 1 为 pUC19 DNA/Msp IV 分子质量, 2 为空白对照, 3~5 分别为 0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 烟酸。

2.3 烟酸对 B 族 IV 型清道夫受体 mRNA 表达量的影响

0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 浓度的烟酸干预后, SR-B IV mRNA 相对表达量分别为 0.74 ± 0.18 、 0.93 ± 0.14 和 0.65 ± 0.09 ,与空白组 (0.62 ± 0.04) 比较差异无显著性($P > 0.05$,图 3)。

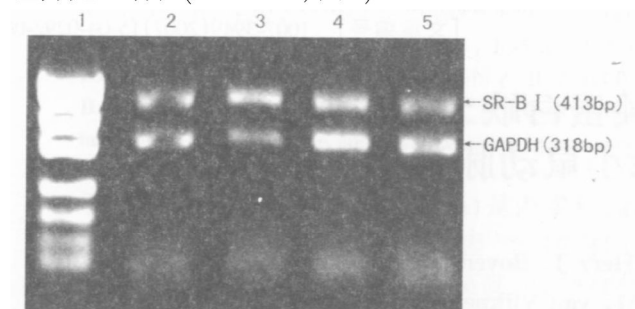


图 3. 烟酸对 B 族 IV 型清道夫受体 mRNA 表达的影响 1 为 pUC19 DNA/Msp IV 分子质量标准, 2 为空白对照, 3~5 分别为 0.25、0.5 和 1.0 mmol/L 烟酸。

2.4 烟酸对载脂蛋白 A IV 介导的脂肪细胞胆固醇流出的影响

烟酸可呈浓度依赖性地增加分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞中载脂蛋白 A IV 介导的胆固醇流出。空白组和 0.25、0.5 及 1.0 mmol/L 浓度的烟酸干预时,胆固醇流出率分别为 $2.86\% \pm 0.20\%$ 、 $5.65\% \pm 0.62\%$ 、 $5.84\% \pm 0.83\%$ 和 $8.80\% \pm 0.53\%$ 。1.0 mmol/L 的烟酸干预时胆固醇流出率最大,为空白组

的 3.1 倍。

3 讨论

胆固醇逆转运清除组织过量的胆固醇,防止动脉粥样硬化的产生,而细胞内胆固醇的流出是胆固醇逆转运的限速步骤,SR-B IV、ABCA1 以及三磷酸腺苷结合盒转运体 G1(ATP binding cassette transporter G1, ABCG1) 在介导细胞内胆固醇流出中发挥重要作用^[4,5]。ABCA1 可利用 ATP 参与胆固醇和磷脂从细胞内转运至贫脂或无脂的载脂蛋白 A IV,促进高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)生成。国外研究发现脂肪细胞亦可表达 ABCA1,并呈分化依赖方式^[3]。我们的研究也证实分化成熟的脂肪细胞可表达 ABCA1,并首次发现烟酸可呈剂量依赖性增加脂肪细胞 ABCA1 的表达,增强载脂蛋白 A IV 介导的细胞胆固醇流出。鉴于脂肪细胞内丰富的胆固醇含量以及烟酸在脂肪组织的高浓度分布,我们可以推测,烟酸促进 ABCA1 表达和胆固醇流出的作用可能部分解释烟酸升高 HDLC 的机制。这需要进一步的在体试验来证实。

B 族 IV 型清道夫受体(SR-B IV)是介导外周组织中胆固醇流出的另一受体蛋白,并且对肝脏及类固醇激素生成组织中胆固醇的选择性摄取起关键作用。SR-B IV 在脂肪组织中有丰富表达^[6],以往研究显示 SR-B IV 在脂肪细胞胆固醇流出中起重要作用^[7]。本研究发现烟酸不影响 SR-B IV 转录,这与国外学者在肝细胞中的观察一致^[8]。细胞内胆固醇含量、固醇调节元件结合蛋白 1 以及激素等均可调节 SR-B IV 转录,烟酸可能不影响上述调节机制,因而不改变 SR-B IV mRNA 表达。

烟酸促进 ABCA1 mRNA 表达的机制目前并不明确。新发现的烟酸受体 GPR109A(小鼠的 PUMA-G,人的 HM74)为研究烟酸的药理学作用机制提供了新的契机^[9-11]。GP 结合后,可通过抑制性 G 蛋白介导的腺苷酸环化抑制脂肪组织中环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)积聚,从而抑制脂解作用,降低体内游离脂肪酸和甘油三酯水平^[12]。而这种高亲和力的烟酸受体是否参与烟酸升高 HDLC 的机制尚无定论。目前已明确 ABCA1 是一种 cAMP 诱导的载脂蛋白受体,cAMP 可诱导 ABCA1 的转录,且这种调节独立于细胞内的胆固醇负荷^[13]。烟酸激活脂肪组织内的烟酸受体后,可降低细胞内 cAMP 水平,由此可见,此通路可能不参与烟酸所致的促进 ABCA1 表达作用,可能存在另外的通路。

PPAR γ 是主要表达于脂肪组织的一种核受体,它可通过诱导肝 X 受体 α 从而促进 ABCA1 的表达^[14]。本研究发现 PPAR γ 在分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞有较高水平的表达,烟酸可明显增加 PPAR γ 表达。最近,国外研究发现,烟酸激活巨噬细胞上的烟酸受体 HM74 和 HM74a 后,可促进前列腺素合成,诱导 PPAR γ 表达^[15],这与我们在脂肪细胞中的观察一致。由此可推测,烟酸可能通过促进前列腺素合成诱导 PPAR γ 表达,从而促进 ABCA1 的转录。

本研究探讨了烟酸对脂肪细胞胆固醇流出的影响及其机制,发现烟酸可促进脂肪细胞的载脂蛋白 A iv-ABCA1 通路。烟酸这种新的作用可能为解释其升高 HDLC 的机制提供有用的线索,但尚需进一步的研究来证实。

[参考文献]

- [1] Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug [J]. *J Intern Med*, 2005, **258** (2): 94-114.
- [2] Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC. Cell culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions [J]. *J Endocrinol*, 2000, **164** (2): 119-28.
- [3] Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells [J]. *J Lipid Res*, 2003, **44** (8): 1 499-507.
- [4] Van Eck M, Pennings M, Hoekstra M, Out R, Van Berkel TJ. Scavenger receptor B iv and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2005, **16** (3): 307-315.
- [5] Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1 761** (7): 655-666.
- [6] Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-B iv, a CD36-related class B scavenger receptor [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269** (33): 21 003-009.
- [7] Zhao SP, Wu ZH, Hong SC, Ye HJ, Wu J. Effect of atorvastatin on SR-B iv expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, **365** (1-2): 119-124.
- [8] Rubic T, Trottmann M, Lorenz RL. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, **67** (3): 411-419.
- [9] Pike NB. Flushing out the role of GPR109A (HM74A) in the clinical efficacy of nicotinic acid [J]. *J Clin Invest*, 2005, **115** (12): 3 400-403.
- [10] Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect [J]. *Nat Med*, 2003, **9** (3): 352-355.
- [11] Soga T, Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto S, Saito T, Ohishi T, et al. Molecular identification of nicotinic acid receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303** (1): 364-369.
- [12] Zhang Y, Schmidt RJ, Foxworthy P, Emkey R, Oler JK, Large TH, et al. Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334** (2): 729-732.
- [13] Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (44): 34 508-511.
- [14] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis [J]. *Mol Cell*, 2001, **7** (1): 161-171.
- [15] Knowles HJ, te Poele RH, Workman P, Harris AL. Niacin induces PPAR γ expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74a-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, **71** (5): 646-656.

(此文编辑 许雪梅)