

阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响

曾颖, 谭玉林, 易光辉, 冯惊涛, 孙琳, 曾德星, 夏军辉, 王静, 尹小波

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 阿托伐他汀; THP-1 巨噬细胞; 脂质蓄积; CD36; 氧化型低密度脂蛋白

[摘要] 目的 观察阿托伐他汀对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响。方法 用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与不同浓度的阿托伐他汀(0、0.312、1.25 和 5 μ mol/L) 共同孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h, 以空白组作对照, 用液体闪烁计数法检测细胞 [3 H] 胆固醇流入情况, 油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况, 高效液相色谱分析法检测细胞内总胆固醇水平, 逆转录聚合酶链反应与免疫印迹分析法分别检测 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达。结果 阿托伐他汀使 THP-1 巨噬细胞胆固醇流入减少, 对照组胆固醇流入为 35.90% \pm 2.36%, 0.312、1.25 和 5 μ mol/L 阿托伐他汀组胆固醇流入分别为 47.10% \pm 3.18%、41.20% \pm 2.88%、35.10% \pm 2.35% 和 28.30% \pm 1.98%; 阿托伐他汀能抑制 THP-1 巨噬细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取, 油红 O 染色可见氧化型低密度脂蛋白+ 阿托伐他汀组细胞内脂滴较氧化型低密度脂蛋白组明显减少, 且脂滴颗粒体积变小; 高效液相色谱分析发现, 对照组细胞总胆固醇含量为 78.24 \pm 11.35 mg/g, 0.312、1.25 和 5 μ mol/L 阿托伐他汀组细胞总胆固醇含量分别为 123.13 \pm 15.92 mg/g、115.36 \pm 13.18 mg/g、107.52 \pm 12.05 mg/g 和 98.03 \pm 10.24 mg/g。阿托伐他汀使氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达下调。结论 阿托伐他汀引起氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36 表达下调, 并使脂质蓄积减少。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on Lipid Accumulation and CD36 Expression in THP-1 Macrophages

ZENG Ying, TAN Yr-Lin, YI Guang-Hui, FENG Jing-Tao, SUN Lin, ZENG De-Xing, XIA Jun-Hui, WANG Jing, and YIN Xiao-Bo

(Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; THP-1 Macrophage; Lipid Accumulation; CD36; Oxidized Low Density Lipoprotein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of atorvastatin on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced lipid accumulation and CD36 expression in THP-1 macrophages. **Methods** THP-1 macrophages were co-incubated with 50 mg/L ox-LDL and different concentrations of atorvastatin (0, 0.312, 1.25 and 5 μ mol/L) for 24 h, and the unincubated THP-1 macrophages culture was used as the control group. [3 H]-labeled Cholesterol influx was determined by FJ-2107P type liquid scintillator. Oil red O staining was used to observe the intracellular lipid droplets. Cellular total cholesterol was determined by high performance liquid chromatography analysis. CD36 mRNA and protein levels were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting respectively. **Results** Atorvastatin decreased CD36 in both protein and mRNA levels.

Atorvastatin decreased cholesterol influx in THP-1 macrophages. The levels of cholesterol influx were 35.90% \pm 2.36% (control), 47.10% \pm 3.18% (0 μ mol/L atorvastatin), 41.20% \pm 2.88% (0.312 μ mol/L atorvastatin), 35.10% \pm 2.35% (1.25 μ mol/L atorvastatin), 28.30% \pm 1.98% (5 μ mol/L atorvastatin) respectively. Oil red O staining showed intracellular lipid droplets were minor with the presence of atorvastatin. High performance liquid chromatography analysis demonstrated the amount of cellular total cholesterol were 78.24 \pm 11.35 mg/g (control), 123.13 \pm 15.92 mg/g (0 μ mol/L atorvastatin), 115.36 \pm 13.18 mg/g (0.312 μ mol/L atorvastatin), 107.52 \pm 12.05 mg/g (1.25 μ mol/L atorvastatin) and 98.03 \pm 10.24 mg/g (5 μ mol/L atorvastatin). **Conclusion** Atorvastatin may downregulate ox-LDL-induced CD36 expression and decrease lipid accumulation in THP-1 macrophages.

清道夫受体介导的氧化型低密度脂蛋白(oxi-

dized low density lipoprotein, ox-LDL) 的蓄积是动脉粥样硬化发生发展中泡沫细胞形成的关键^[1]。CD36 属于 B 类清道夫受体, 丰富表达于单核巨噬细胞膜表面^[2], 它是一种主要的 ox-LDL 受体^[3]。研究表明, 阿托伐他汀除具有显著的降脂作用外, 还具有独特的心血管防治作用, 如改善内皮功能、抗炎、抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL) 的氧化修

[收稿日期] 2007-04-10 [修回日期] 2007-10-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30570958), 湖南省卫生厅课题基金(B2006-098)

[作者简介] 曾颖, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 zengying2003@126.com。谭玉林, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制。通讯作者易光辉, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 ghyi@hotmail.com。

饰、抑制清道夫受体表达等^[4]。他汀类药已成为目前研究的热点与重点。研究证实,他汀类药能抑制冠状动脉粥样硬化的发生发展^[5]。本实验室以前的研究证实,阿托伐他汀可抑制 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达^[6]。然而,目前关于他汀类药对清道夫受体介导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响尚未见报道。本研究探讨了阿托伐他汀对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

Trizol 试剂购自美国 Gibco 公司;AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司;Taq 酶购自北京天为时代;所有引物由上海生工公司合成;羊抗人 CD36 和辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗购自美国 Santa Cruz 公司;BlueRanger 预染蛋白分子量标准、BCA 蛋白含量测定试剂和 Western blotting 荧光检测试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司;佛波酯、油红 O 和丽春红染色试剂购自 Sigma 公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆 LDL (1.019~1.063 kg/L) 采用超速离心法分离,经琼脂糖电泳显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液 (pH7.2) 中,37℃温育 24 h。氧化后的 LDL 置含 200 μ mol EDTA 的 PBS 中透析 24 h, PBS 再透析 24 h,过滤除菌后 4℃保存。LDL 中的脂过氧化物在氧化过程中增加,颜色也由淡黄色变为乳白色。琼脂糖电泳显示 ox-LDL 的电泳迁移速率快于未氧化的 LDL。

1.3 细胞株的培养及实验分组

THP-1 细胞株购于中科院上海细胞生物所细胞中心。细胞生长于含 10% 灭活新生小牛血清、1 \times 10⁸ U/L 青霉素的 RPMI-1640 完全培养基中,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化为巨噬细胞,换无血清培养基培养后分组:对照组为 RPMI-1640 培养基+5 μ L DMSO 孵育 24 h;ox-LDL+不同浓度阿托伐他汀组为 50 mg/L ox-LDL 与 0、0.312、1.25 和 5 μ mol/L 阿托伐他汀共同孵育 24 h。

1.4 胆固醇流入

THP-1 巨噬细胞用 PBS 液洗涤,再用 0.2 mCi/L [³H]胆固醇和处理因素及无血清 RPMI-1640 培养基共同孵育细胞 24 h,用闪烁计数法检测培养基和细胞 [³H]胆固醇,计算胆固醇流入。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 的表达

收集细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,溶于无 Rnase 水中,紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间。CD36 (GenBank 序列号 NM005506) 扩增片段长度为 246 bp,PCR 条件为 94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s→53℃退火 30 s→72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃继续延伸 10 min。内参照 GAPDH 引物扩增片段长度为 697 bp,PCR 条件为 94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s→60℃退火 30 s→72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃继续延伸 10 min。反应结束后,取 RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统测定和分析。

1.6 免疫印迹法检测 CD36 蛋白的表达

收集细胞,经 PBS 洗涤 3 次,加入悬浮裂解液裂解细胞,于 4℃、10000 g 离心 10 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白质点样量为 50 μ g,取 50 μ g 蛋白质/泳道加入等体积 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白变性。60 V 积层胶,120 V 分离胶,电泳分离细胞蛋白质,100 mA/h 将蛋白质转移至 PDVF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4℃孵育 1 h,TBST 洗膜 15 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 15 min。然后用 Western blotting 荧光检测试剂激发荧光,用 X 胶片压片曝光,显影、定影后进行图像分析。以对照组作为内参照,用各处理组的面积灰度值与对照组相比,所得的相对值作统计分析。

1.7 油红 O 染色观察 THP-1 细胞内脂质

将 THP-1 细胞培养于放有盖玻片的 6 孔培养板内,待细胞被诱导分化为巨噬细胞后,换无血清培养基,加入 ox-LDL 及 ox-LDL+阿托伐他汀处理 24 h。细胞贴壁生长于培养板,用 PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min;50% 异丙醇固定 1 min,油红 O 染色液染色 10 min,苏木素染色 5 min,盐酸酒精分色;水性封片剂封片,显微镜观察;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于显微镜下摄像保存。

1.8 高效液相色谱分析细胞内总胆固醇含量

待细胞处理结束后,弃培养基,PBS 洗 3 遍,加入细胞裂解液 200 μ L,反复冻融 3 次裂解细胞,BCA 法定量蛋白后,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,800 \times g 离心 10 min,取上清进行胆固醇检测,以豆甾醇为内标。取 100 μ L 上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μ L,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L 三氧化铬进行氧化衍生并真

空干燥, 100 μ L 乙晴-异丙醇 (80: 20) 溶解样品, 上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱, 柱温 4 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 计算值以细胞蛋白含量校正。

1.9 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 t 检验, 由 SPSS11.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞胆固醇流入的影响

与对照组相比, ox-LDL 组细胞胆固醇流入增加 ($P < 0.05$); 而与 ox-LDL 组相比, 不同浓度阿托伐他汀组细胞胆固醇流入依次减少 ($P < 0.05$), 呈量-效关系 (表 1)。

表 1. 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞胆固醇流入的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	胆固醇流入
对照组	35.90% \pm 2.36%
ox-LDL 组	47.10% \pm 3.18% ^a
阿托伐他汀	
0.312 μ mol/L	41.20% \pm 2.88%
1.25 μ mol/L	35.10% \pm 2.35% ^b
5 μ mol/L	28.30% \pm 1.98% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组相比。

2.2 细胞内脂质改变

与对照组相比, ox-LDL 组细胞内脂滴明显增多, 且脂滴颗粒体积变大; 而 ox-LDL+ 阿托伐他汀组细胞内脂滴较 ox-LDL 组明显减少, 且脂滴颗粒体积变小 (图 1)。

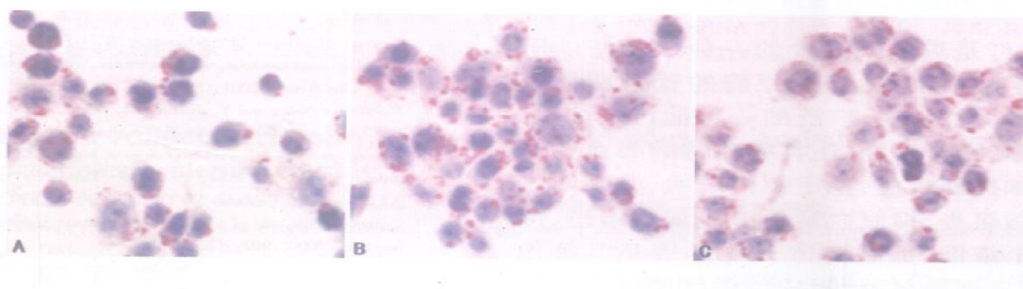


图 1. 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞脂滴数量和大小影响 ($\times 40$, $n = 3$) A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为 50 μ g/L ox-LDL+ 5 μ mol/L 阿托伐他汀组。

2.3 细胞内总胆固醇含量

与对照组相比, ox-LDL 组细胞总胆固醇含量增加 ($P < 0.05$); 而与 ox-LDL 组相比, 不同浓度阿托伐他汀组细胞总胆固醇含量依次降低, 以 5 μ mol/L 组降低最为明显 ($P < 0.05$; 图 2 和表 2)。

表 2. THP-1 巨噬细胞内总胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, mg/g)

分 组	总胆固醇含量
对照组	78.24 \pm 11.35
ox-LDL 组	123.13 \pm 15.92 ^a
阿托伐他汀	
0.312 μ mol/L	115.36 \pm 13.18
1.25 μ mol/L	107.52 \pm 12.05 ^b
5 μ mol/L	98.03 \pm 10.24 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组相比。

2.4 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 的表达

ox-LDL 组 CD36 mRNA 的表达与对照组相比显著上调 (0.52 \pm 0.04 比 0.38 \pm 0.02, $P < 0.05$), 而不同浓度阿托伐他汀组 CD36 mRNA 的表达依次减弱 (分别为 0.44 \pm 0.03、0.35 \pm 0.02 和 0.28 \pm 0.02), 以 5 μ mol/L 组降低最为明显 ($P < 0.05$; 图 2)。

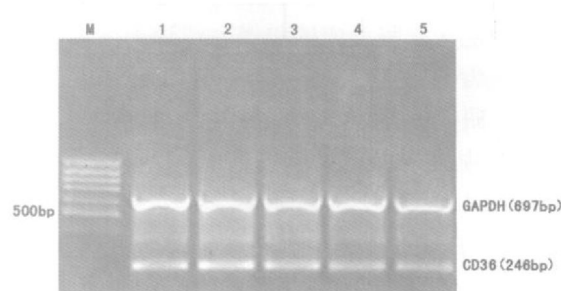


图 2. THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 0.312 μ g/L 阿托伐他汀组, 4 为 1.25 μ g/L 阿托伐他汀组, 5 为 5 μ g/L 阿托伐他汀组。

2.5 THP-1 巨噬细胞 CD36 蛋白的表达

ox-LDL 组 CD36 蛋白的表达与对照组相比显著增强(1.52 ± 0.08 比 1.15 ± 0.05 ; $P < 0.05$), 而不同浓度阿托伐他汀组 CD36 蛋白的表达呈浓度依赖性减少(分别为 1.28 ± 0.06 、 0.92 ± 0.04 和 0.55 ± 0.03), 以 $5 \mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组降低最为明显 ($P < 0.05$; 图 3)。

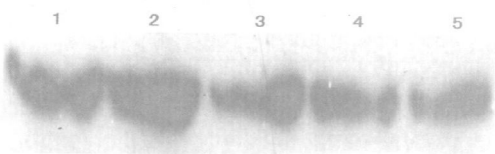


图 3. THP-1 巨噬细胞 CD36 蛋白的表达 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 $0.312 \mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 4 为 $1.25 \mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 5 为 $5 \mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组。

3 讨论

阿托伐他汀是近年来开发的一种 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的竞争性抑制剂, 是最有效的、应用最为广泛的一种他汀类药物^[7], 除具有显著的降脂作用外, 还具有独特的心血管疾病防治作用, 如抑制炎症、稳定粥样斑块、改善内皮功能、抗血小板聚集、抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制 LDL 的氧化修饰、抑制清道夫受体表达^[8]等作用。新近的临床试验显示, 阿托伐他汀能延缓动脉粥样硬化的发生发展及心血管事件的发生^[9, 10]。

动脉粥样硬化是一种以慢性炎症为主要特征的心血管疾病, 与多种基因相关, 而脂质代谢紊乱在动脉粥样硬化形成与发展过程中起着重要的作用。动脉粥样硬化最主要的病理学标志是泡沫细胞的形成, 而 ox-LDL 是泡沫细胞形成的关键。ox-LDL 通过巨噬细胞膜上的清道夫受体介导进入细胞, 造成细胞内脂质大量积聚, 导致泡沫细胞形成。清道夫受体介导的 ox-LDL 胆固醇的蓄积是动脉粥样硬化发生发展中泡沫细胞形成的关键。清道夫受体表达的调节被认为是影响动脉粥样硬化病变脂质蓄积的决定因素。研究发现, 在 ox-LDL 诱导的动脉粥样硬化形成过程中, CD36 起主要调节作用。CD36 结合和摄取的 ox-LDL 约占巨噬细胞结合和摄取修饰脂质的 50%, 且在脂质条纹与粥样损伤的核心区域丰富表达。Febbraio 等^[11]用 CD36 基因敲除小鼠来研究其在动脉粥样硬化形成过程中的作用, 发现敲除 CD36 基因后, 小鼠的腹膜巨噬细胞对 ox-LDL 的结合和摄取能力显著降低。研究发现, CD36 基因的表

达缺陷可以引起单核细胞源性巨噬细胞与 ox-LDL 和胆固醇酯的结合减少 40%^[12], 提示 CD36 在动脉粥样硬化脂质蓄积的过程中起着重要的作用。

近年的资料显示, 他汀类药物有抑制清道夫受体表达的作用。研究发现, 洛伐他汀能抑制 THP-1 巨噬细胞 CD36 及 SR-AI 的表达, 还能抑制 U937 细胞 CD36 的表达。普伐他汀能抑制 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达^[13]。然而, 目前关于阿托伐他汀对 CD36 介导的 THP-1 巨噬细胞的脂质蓄积的影响尚未见报道。本研究将 THP-1 巨噬细胞与 ox-LDL 及阿托伐他汀共同孵育, 发现 ox-LDL 组巨噬细胞 CD36 的表达上调, ox-LDL 与不同浓度阿托伐他汀共同孵育后 CD36 的表达下调, 细胞内胆固醇流入及脂质蓄积也减少, 且这种效应呈剂量依赖性, 提示阿托伐他汀通过抑制 CD36 的表达从而减少 THP-1 巨噬细胞的脂质蓄积。

[参考文献]

- [1] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108** (6): 785-791.
- [2] Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerosis aorta [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 1333-339.
- [3] Nicholson AC, Febbraio M, Han J, Silverstein RL, Hajjar DP. CD36 in atherosclerosis: the role of a class B macrophage scavenger receptor [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **902**: 128-131.
- [4] Raja SG, Dreyfus GD. Statins: much more than just a lipid-lowering therapy [J]. *Indian Heart J*, 2004, **56** (3): 204-209.
- [5] Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen P, Hu T, et al. Statins, High-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis [J]. *Journal of the American Medical Association*, 2007, **297**: 499-508.
- [6] 曾颖, 谭玉林, 冯惊涛, 孙琳, 曾德星, 夏军辉, 等. 阿托伐他汀对 THP-1 巨噬细胞 CD36 表达的影响[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2007, **2**: 132-134.
- [7] McLoughlin C. Statins [J]. *Prof Nurse*, 2004, **19** (11): 51-52.
- [8] Bruni F, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, et al. Different effect of statins on platelet oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects [J]. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2005, **11**: 417-428.
- [9] Shukla A, Sharma MK, Jain A, Goel PK. Prevention of atherosclerosis progression using atorvastatin in normolipidemic coronary artery disease patients—a controlled randomized trial [J]. *Indian Heart J*, 2005, **57** (6): 675-680.
- [10] Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K. Atorvastatin and diabetic vascular complications [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, **12** (12): 1549-554.
- [11] Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Shama K, Cheng W, Pearce SF, et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 19055-062.
- [12] Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi Y. Identification of the molecular defects in a subject with type iv CD36 deficiency [J]. *Blood*, 1994, **83** (12): 3545-552.
- [13] Han J, Zhou X, Yokoyama T, Hajjar DP, Gotto AM Jr, Nicholson AC, et al. Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36 [J]. *Circulation*, 2004, **17**: 790-796.

(此文编辑 文玉珊)