

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0037-06

• 实验研究 •

过氧化体增殖物激活型受体 δ 激动剂抑制 RAW 264.7 细胞炎症因子的表达

杨大春, 杨永健, 张鑫, 李德, 唐兵, 陈劲松, 朱峻, 速晓华, 李刚

(解放军成都军区总医院心内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 过氧化体增殖物激活型受体 δ 炎症介质

[摘要] 目的 探讨过氧化体增殖物激活型受体 δ 激动剂 GW 0742 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW 264.7 细胞单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1、基质金属蛋白酶 9 基因和蛋白表达的影响。方法 构建小鼠过氧化体增殖物激活型受体 δ 基因干扰慢病毒载体及空病毒载体, 将培养的 RAW 264.7 细胞分为对照组、GW 0742 组、GW 0742+ 过氧化体增殖物激活型受体 δ 干扰组以及假干扰组, 各组均给予氧化型低密度脂蛋白 (50 mg/L) 孵育 24 h, 分别采用逆转录聚合酶链反应和蛋白免疫印迹法检测细胞中单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 的 mRNA 及蛋白表达。采用单核细胞趋化实验观察人外周血单核细胞在不同条件培养基中的趋化活性。结果 GW 0742 组细胞中单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 的 mRNA 及蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而过氧化体增殖物激活型受体 δ 干扰显著削弱 GW 0742 对单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 的抑制作用 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。GW 0742 组单核细胞迁移距离小于对照组 ($P < 0.05$), 而过氧化体增殖物激活型受体 δ 干扰能阻断 GW 0742 对单核细胞趋化的抑制作用。结论 过氧化体增殖物激活型受体 δ 激动剂 GW 0742 能显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW 264.7 细胞单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 表达, 激活过氧化体增殖物激活型受体 δ 可能有助于防治动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Inhibiting Effects of Peroxisome Proliferator Activated Receptor- δ Activation on Inflammatory Factors in RAW 264.7 Cell

YANG Da-Chun, YANG Yong-Jian, ZHANG Xin, LI De, TANG Bing, CHEN Jin-Song, ZHU Jun, SU Xiaohua and LI Gang

(Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Army District PLA, Chengdu 610083 China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Macrophage; Peroxisome Proliferator Activated Receptor- δ ; Inflammatory Mediators

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of peroxisome proliferator activated receptor- δ (PPAR- δ) activation by GW 0742 on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in RAW 264.7 cells

Methods Cultured RAW 264.7 cells were divided into 4 groups: vehicle-treated group, GW 0742-treated group, PPAR- δ silencing+ GW 0742-treated group and empty vector-transformed group. After stimulated with ox-LDL (50 mg/L) for 24 hours, the mRNA and protein levels of MCP-1, VCAM-1 and MMP-9 were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunoblotting respectively. The monocyte migration activity was tested by micropore filter method using a modified Boyden chamber.

Results Both the mRNA and protein levels of MCP-1, VCAM-1 and MMP-9 were significantly decreased in GW 0742-treated cells compared with vehicle-treated group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). However, PPAR- δ gene silencing by RNA interference markedly attenuated these beneficial effects of GW 0742 ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Similarly, the monocyte chemotactic activity was noticeably inhibited in GW 0742-treated cells ($P < 0.05$), while this inhibitory effect of GW 0742 was completely blocked by PPAR- δ gene silencing.

Conclusions The present study shows that PPAR- δ activation by GW 0742 successfully inhibits the oxidized LDL-induced upregulation of MCP-1, VCAM-1 and MMP-9 in RAW 264.7 cells and monocyte migration. The results indicate that activating PPAR- δ might become an effective strategy for the prevention of atherosclerosis.

[收稿日期] 2009-08-11 [修回日期] 2009-11-24

[作者简介] 杨大春, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病、高血压基础与临床研究, 电话为 028-86570341, Email 为 yangdc71@126.com。杨永健, 博士, 主任医师, 主要从事动脉粥样硬化、心力衰竭心肌重构机制与防治研究, 电话为 028-86570329, Email 为 yangyongjian38@yahoo.com。张鑫, 主任医师, 主要从事冠心病的临床研究, 电话为 028-86570417, Email 为 zhangx_ok@126.com。

巨噬细胞通过细胞表面的清道夫受体摄取过量的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 导致细胞内胆固醇酯的积聚, 最后转变为泡沫细胞, 分泌多种细胞因子, 促使单核细胞、淋巴细胞、中性粒细胞黏附于血管内皮, 促进血液中单核细胞向内皮下趋化, 并进一步分化为巨噬细胞和泡沫细胞, 促进动脉粥样硬化的发生和形成^[1,2]。过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPAR) 是配体激活的核转录因子, 通过与特异的 DNA 反应元件作用后调控基因的表达, 在能量代谢、细胞分化、增殖和凋亡及炎症反应、内源性活性物质合成和分泌中发挥重要作用^[3]。目前尚无激活 PPAR δ 基因对泡沫细胞生物学功能影响的报道, 本研究通过细胞培养, 探讨应用 PPAR δ 高选择性激动剂 GW 0742 激活 PPAR δ 后对泡沫细胞炎症介质单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 及基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 分泌的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

Lipofectamine TM 2000 购于美国 Invitrogen 公司。G418 (Sigma 公司, 美国)。RAW 264 7 细胞购自中国科学院上海细胞库。GW 0742 (PPAR δ 激动剂, Sigma 公司)。兔抗 PPAR δ 抗体、MCP-1、VCAM-1、MMP-9 及 β -actin 抗体均购自 Santa 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。低密度脂蛋白 (Calbiochem 公司), Trizol (Invitrogen 公司)。逆转录试剂盒 (Promega 公司), PCR 反应试剂盒 (上海生工公司)。DNA Marker DL2000 (北京天根生化科技有限公司)。核酸蛋白定量仪及凝胶扫描成像仪 (Bio-Rad 公司), 低温离心机 (Beckman 公司), 垂直电泳槽和转移槽 (Bio-Rad 公司)。

1.2 慢病毒重组体过氧化体增殖物激活型受体 δ -Neo-RNA i 的构建

参照文献 [4] 报道的方法, 应用 Ambion 公司的在线小干扰 RNA (siRNA) 目标分析软件 (<http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/>), 筛选出 PPAR δ mRNA 序列的潜在 RNA i 靶点, 并用 BLAST 分析排除与其他编码序列具有 20~21 个连续相同碱基对的序列。根据靶序列即 (1) GTT CGA GTT

TGC TGT CAA GTT; (2) GAT CCA GAA GAA GAA CCG CAA, 设计出 2 条编码 shRNA 的 DNA 寡核苷酸序列, 合成的 sh-cDNA 含有两段反向互补的干扰片段, 在合成过程中加上中间的 Loop 序列 (TTCAA-GAGA)、末端的 U6 启动子终止序列 (TTTTTT) 和一端的 XhoI 酶切位点。另设计 1 条不靶向小鼠基因库中任何编码序列的 DNA 寡核苷酸链, 用作 RNA i 的阴性对照 (假干扰)。应用 Omega Bio-Tek Gel Extraction Kit 进行 PLL3 7 表达质粒的酶切与线性载体的回收, 按照说明书进行。合成的 sh-cDNA 退火形成双链, sh-cDNA 片段与线性载体的连接体系如下: 10 \times buffer 1.5 μ L, PLL3 7 线性载体 5 μ L, 退火干扰片段 6 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, H₂O 1.5 μ L; 15 $^{\circ}$ C 连接 16 h。连接产物转化已准备好的感受态大肠杆菌 DH5 α 。重组质粒 PCR 鉴定后, 质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提, 转染 293FT 细胞, 转染 12 h 后更换为完全培养基, 培养 48~72 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液, 然后在 293FT 细胞中测定病毒滴度为 5×10^8 TU/L。

1.3 细胞培养

RAW 264 7 细胞予以 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO₂ 孵箱中培养待用。将 RAW 264 7 细胞悬液均匀接种到六孔板中, 继续培养 2~3 天至细胞生长完全。在感染前将培养液吸出, 无血清 RPMI 1640 清洗 1 遍, 按实验分组分别用含慢病毒重组体 PPAR δ -Neo-RNA i 或空病毒载体 (Neo-RNA i empty) (假干扰组, vector) 的 RPMI 1640 培养基感染 RAW 264 7 细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养箱静止 24 h 后, 更换含 800 mg/L G418 的新鲜培养基。每隔 2 天更换 1 次培养基, 直至抗生素抵抗的细胞克隆生长出来, 约需 10~12 天。挑取至少 5 个抗生素抵抗克隆, 扩增后进行 PPAR δ 蛋白检测。干扰组 RAW 264 7 细胞 PPAR δ 干扰效率达 80% 以上者及假干扰组细胞留存于液氮中备用。前期预实验表明构建的两种慢病毒重组体其干扰效果均大于 80%。本实验应用目标靶序列 (1) 构建的慢病毒重组体。

1.4 低密度脂蛋白的氧化

采用铜离子氧化法^[5]。将低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 置于 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h, 然后在含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 中室温氧化 20~24 h, 再于含 1 mmol/L EDTA 的 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 4 h 终止反应, 即得氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)。氧化程度由硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 法估算。

1.5 细胞分组及干预

将 RAW 264 7 细胞分为以下 4 组: 对照组; ④假干扰组; ④GW 0742+ PPAR δ 干扰组 (PPAR δ 干扰组); GW 0742 组。所有细胞接种于 6 孔板中, 每隔 2 天更换 1 次培养基, PPAR δ 干扰组及假干扰组培养基中含 800 mg/L G418。待细胞生长融合约 80% 左右, 换用无血清 RPMI 1640 培养 12 h, 加入浓度为 50 mg/L ox-LDL, 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养 24 h。每组 6 瓶细胞。分别收集各组细胞培养基及细胞备用。每组 3 瓶细胞提取细胞蛋白检测 MCP-1、VCAM-1、MMP-9 蛋白的表达, 剩余 3 瓶细胞提取 mRNA, 检测 MCP-1、VCAM-1、MMP-9 mRNA 的表达。

1.6 活化血清的制备

参照文献 [6] 报道的方法。取 3 只正常成年家兔, 经颈总动脉取血, 4℃ 静置。待析出血清后, 2 500~3 000 r/min 离心 5 min。吸取清亮血清并将之混合, 然后加入 2 g 酵母提取物, 37℃ 水浴 30 min, 3 000 r/min 离心 5 min。吸取上清, 56℃ 水浴 30 min, 即为活化血清, 含 C5a 对单核细胞有很强的趋化活性。过滤除菌, -20℃ 保存备用, 临用前用 RPMI 1640 稀释成 5% (V/V) 的浓度。

1.7 单核细胞趋化实验

将收集的各组细胞培养液 (条件培养基) 于 4℃ PBS 透析 24 h 备用。应用改良的 Boyden 小室微孔滤膜法进行趋化实验。新鲜人外周血单核细胞分离按文献报道的方法进行^[7], 制成细胞悬液, 调细胞密度为 1×10^8 个/L~ 1×10^9 个/L, 上室 (0.8 mL) 加入非条件培养基的单核细胞悬液, 上下室之间隔以硝酸纤维素微孔滤膜 (孔径 8 μ m, 直径 13 μ m, Schleicher-Schuell 公司)。实验分 6 组: 随机移动组, 即阴性对照组, 下室加入与上室相同的培养基; 阳性对照组, 下室加入活化血清; 对照组, 下室加入对照组培养基; 假干扰组, 下室加入假干扰组培养基; 干扰组, 下室加入 GW 0742+ PPAR δ 干扰组培养基; 趋化运动组, 下室加入 GW 0742 组培养基。加好各组实验液后, 将小室置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中温育 90 min。取出滤膜, 置于纯正丙醇中固定, Harris 苏木素染色, 逐级正丙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。趋化距离的观察由实验室专业技术人员实施。在高倍显微镜下 ($\times 400$), 用微调手轮调焦距对准滤膜表面 (可见膜结构和大量单核细胞) 作为起点, 向下转动手轮, 可见细胞数逐渐减少, 至仅见 1~3 个单核细胞时, 即为移动终点。从微调手轮的刻度上直接读出起点至终点的距离, 即单核细胞移

动距离。每膜随机取 5 个视野, 每组各 2 张膜, 共 10 个视野, 实验重复 3 次, 每组总共 30 个数据。

1.8 RT-PCR 检测单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 的表达

收集 ox-LDL 干预各组细胞, 每组 3 瓶, Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 核酸蛋白定量仪测定 RNA 含量, 逆转录合成 cDNA 第 1 链。采用 Primer 5.0 软件设计引物, MCP-1 (169 bp) 上游引物 5'-AAG TTG ACC CGT AAA TCT GA-3', 下游引物 5'-TGA AAG GGA ATA CCA TAA CA-3'; VCAM-1 (372 bp) 上游引物 5'-TAG ACA GCC CAC TAA ACG C-3', 下游引物 5'-CAA TGA CGG GAG TAA AGG T-3'; MMP-9 (178 bp) 上游引物 5'-GGG ACC ATC ATA ACA TCA CAT AC-3', 下游引物 5'-TGC TCC GCG ACA CCA AAC T-3'; GAPDH (720 bp) 上游引物 5'-ATT CAA CGG CAC AGT CAA-3', 下游引物 5'-AAG GTG GAA GAG TGG GAG T-3'; 均由上海博亚生物技术公司合成。MCP-1、VCAM-1 及 GAPDH PCR 反应条件均为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 重复 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。MMP-9 反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 重复 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统对条带扫描, 软件分析, 分别计算 MCP-1、VCAM-1、MMP-9 与 GAPDH 吸光度的比值, 并以对照组为 1 进行校对后表示。

1.9 蛋白免疫印迹法检测单核细胞趋化蛋白 1、血管细胞黏附分子 1 及基质金属蛋白酶 9 蛋白的表达

提取细胞总蛋白, 定量, 灌制聚丙烯凝胶, 蛋白电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封固非特异性蛋白, 37℃ 摇床中振动约 4 h, 分别加 PPAR δ 、MCP-1、VCAM-1、MMP-9 和内参照 β -actin 抗体, 37℃ 摇床中振动 2~3 h, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次; 加 IgG 二抗, 37℃ 的空气摇床中摇动 1~2 h, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 显影, 凝胶成像系统扫描分析条带吸光度 (A)。计算每个蛋白条带吸光度 (A) 与内参照 β -actin 吸光度 (A) 的比值, 并以对照组为 1 进行校对后表示。

1.10 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间多重比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过氧化体增殖物激活型受体 δ 基因干扰结果

PPAR δ 在 RAW 264 7 细胞中有表达, PPAR δ 基

因干扰后, PPAR δ 蛋白表达 (0.12 ± 0.04)明显低于对照组 (1.00 ± 0.00)和假干扰组 (0.98 ± 0.09 , $P < 0.01$), 假干扰组与对照组差异无显著性 ($P > 0.05$; 图 1)。

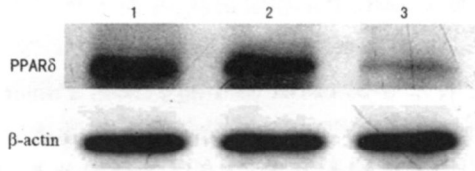


图 1 PPAR δ 基因干扰结果 1为对照组, 2为假干扰组, 3为 PPAR δ siRNA 组。

2.2 激活过氧化物增殖物激活型受体 δ 对单核细胞趋化蛋白 1mRNA 和蛋白表达的影响

GW 0742组 RAW 264.7细胞经 ox-LDL 诱导后, 其 MCP-1 mRNA 和蛋白表达明显低于对照组、GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组和假干扰组 ($P < 0.01$); 对照组与假干扰组及 GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1和图 2)。

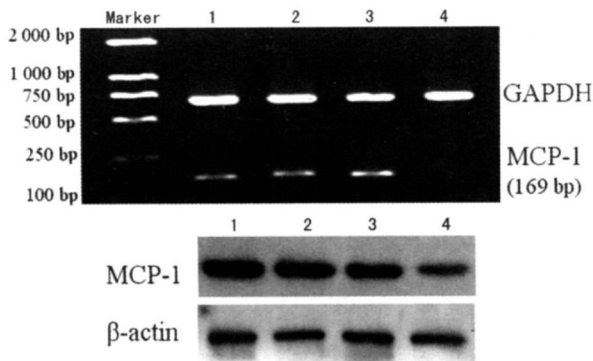


图 2 激活 PPAR δ 对 MCP-1mRNA (上图)和蛋白 (下图)表达的影响 1为对照组, 2为假干扰组, 3为 GW 0742+ PPAR δ 干扰组, 4为 GW 0742组。

表 1 激活 PPAR δ 对 MCP-1/VCAM 和 MMP-9表达的影响

分 组	MCP-1		VCAM-1		MMP-9	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
假干扰组	1.01 ± 0.11	0.99 ± 0.09	0.97 ± 0.07	1.01 ± 0.09	0.99 ± 0.08	0.98 ± 0.12
PPAR δ 干扰组	1.03 ± 0.07	1.01 ± 0.10	0.98 ± 0.10	0.96 ± 0.09	1.02 ± 0.05	0.97 ± 0.11
GW 0742组	0.24 ± 0.05^b	0.33 ± 0.07^b	0.35 ± 0.09^b	0.43 ± 0.07^a	0.30 ± 0.07^b	0.24 ± 0.08^b

a为 $P < 0.05$ b为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.5 单核细胞趋化实验

趋化实验表明, 趋化运动组 (GW 0742 组)

2.3 激活过氧化物增殖物激活型受体 δ 对血管细胞黏附分子 1mRNA 和蛋白表达的影响

GW 0742组 RAW 264.7细胞经 ox-LDL 诱导后, 其 VCAM-1 mRNA 和蛋白表达明显低于对照组、GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组和假干扰组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 对照组与假干扰组及 GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1和图 3)。

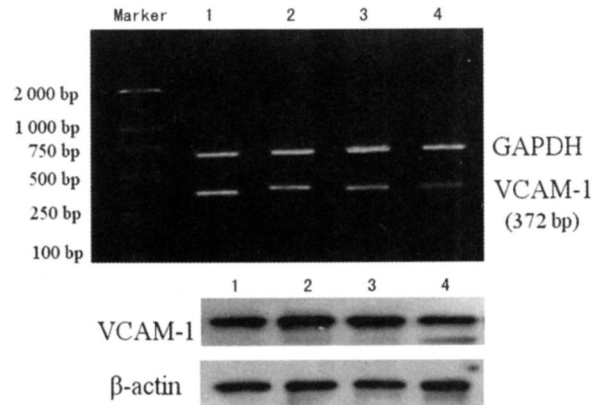


图 3 激活 PPAR δ 对 VCAM-1 mRNA (上图)和蛋白 (下图)表达的影响 1为对照组, 2为假干扰组, 3为 GW 0742+ PPAR δ 干扰组, 4为 GW 0742组。

2.4 激活过氧化物增殖物激活型受体 δ 对基质金属蛋白酶 9表达的影响

GW 0742组 RAW 264.7细胞经 ox-LDL 诱导后, 其 MMP-9 mRNA 和蛋白表达明显低于对照组、GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组和假干扰组 ($P < 0.01$); 对照组与假干扰组及 GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1和图 4)。

RAW 264.7细胞经 ox-LDL 刺激后的条件培养基引起单核细胞迁移距离明显小于对照组、GW 0742+

PPAR δ 基因干扰组及假干扰组 ($P < 0.05$)。对照组、假干扰组及 GW 0742+ PPAR δ 基因干扰组间差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

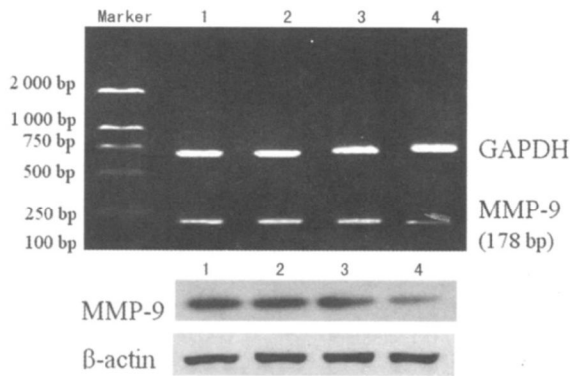


图 4 激活 PPAR δ 对 MMP-9 mRNA(上图)和蛋白(下图)表达的影响 1 为对照组, 2 为假干扰组, 3 为 GW 0742+ PPAR δ 干扰组, 4 为 GW 0742组。

表 2 激活 PPAR δ 对单核细胞迁移的影响 ($n = 30$)

组别	移动距离 (μm)
随机移动组	61.7 \pm 1.3
阳性对照组	91.1 \pm 2.1 ^{bd}
对照组	83.2 \pm 3.4 ^{bc}
假干扰组	82.5 \pm 2.9 ^{bc}
干扰组	82.7 \pm 3.1 ^{bc}
趋化运动组	71.8 \pm 2.3 ^a

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与随机移动组比较; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$, 与趋化运动组比较。

3 讨论

单核巨噬细胞分泌产生炎症因子是动脉粥样硬化发生和形成的重要因素之一。既往的研究发现, ox-LDL能诱导单核细胞形成泡沫细胞, 分泌多种促炎症因子, 促进动脉粥样硬化斑块的形成和发展^[1, 2]。ox-LDL也能调节动脉粥样硬化斑块内多种细胞如血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞合成和分泌多种炎症介质。在本研究中, 我们发现, ox-LDL可诱导鼠源性单核细胞 RAW 264.7 合成 MCP-1、VCAM-1及 MMP-9等炎症因子, 其培养基诱导单核细胞迁移距离明显增加, 与既往的报道一致。

过氧化体增殖物激活型受体是一类由配体激活的核转录因子, 属 C/EBP型核受体超家族成员之一。机体内存在 3 种 PPAR 亚型, 即 PPAR γ 、PPAR α 和 PPAR δ (也称为 PPAR β), 组成了核受体亚家族。PPAR 与视黄酸 X 受体 (RXR) 结合形成异二聚体,

与 PPAR 反应元件 (peroxisome proliferator responsive element, PPRE) 结合后调节基因转录, 从而发挥一系列生物学效应^[3]。既往研究发现, PPAR 3 种受体亚型都具有抗血管壁炎症反应的作用, 然而也有研究认为仅 PPAR α 和 PPAR γ 在体内具有抑制巨噬泡沫细胞形成和动脉粥样硬化发展的作用^[8]。在与动脉粥样硬化相关的脂质代谢研究中, 有研究发现 PPAR δ 的激动剂 GW 501516 在人巨噬细胞系 (THP21)、皮肤成纤维细胞 (IBR3N)、肠细胞 (FHS74) 中能促进胆固醇转运; 在鼠与非人灵长类能够提高胆固醇逆向转运子三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1), 促进胆固醇逆向转运, 升高循环中的高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平^[9], 减少具有致动脉粥样硬化的小而密的 LDL 的作用^[10]。也有报道却认为 PPAR δ 可促进 THP21 和原代培养的人巨噬细胞的脂质聚积^[11]。因此, PPAR δ 在脂质代谢和炎症及动脉粥样硬化中究竟发挥何种作用, 目前还不十分明确。

动脉粥样硬化的形成涉及许多病理过程, 单核细胞黏附血管内皮细胞、迁移至内皮下摄取脂质并转化为泡沫细胞是动脉粥样硬化的早期事件。MCP-1 及 VCAM-1 在动脉粥样硬化病变部位呈高表达, 是促进免疫细胞持续侵入斑块局部的主要趋化因子, 而且主要由病变局部的单核巨噬细胞分泌。MMP-9 参与动脉粥样硬化斑块的形成、稳定及血栓性疾病的进展过程, 抑制其表达是稳定斑块的一个重要措施^[12]。Graham 等^[13] 给予 LDLR^{-/-} 小鼠高脂饮食, 同时分别给予 PPAR δ 特异的激动剂 GW 610742 或药物载体, GW 610742 处理组动脉粥样斑块损伤面积减少达 50%, 表明激活 PPAR δ 可能具有抗动脉粥样硬化作用。近来有研究报道 PPAR δ 激动剂 GW 610742 和 GW 501516 均能显著抑制肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 诱导内皮细胞产生的黏附分子 VCAM-1、E-选择素的表达, 并抑制白细胞与内皮细胞的黏附^[14], 可能是激活了 PPAR δ 的抗动脉硬化机制。在本研究中发现应用 GW 0742 激活 PPAR δ 后, 可降低单核巨噬细胞源性泡沫细胞 MCP-1、VCAM-1 及 MMP-9 等炎症介质的合成和分泌, 降低单核细胞的迁移距离; 而 PPAR δ 干扰能显著削弱 GW 0742 对 MCP-1、VCAM-1 及 MMP-9 的抑制作用。提示激活 PPAR δ 后, 可通过减少单核巨噬细胞炎症介质的合成和释放, 减少单核细胞的黏附、迁移, 降低粥样硬化斑块内 MMP-9 表达, 稳定斑块, 这可能是激活 PPAR δ 发挥抗动脉粥样硬化作用的

另一机制。表明激活 PPAR δ 在抑制动脉粥样硬化的发生、发展中具有重要作用。

最近有研究报道, 激活 PPAR δ 基因可通过 TGF- β /Smad3信号通路调节细胞外基质及血管平滑肌细胞的凋亡^[15]。但其通过何种机制抑制炎症介质 MCP-1、VCAM-1及 MMP-9的表达, 目前尚不十分清楚。由于种属不同, 激活 PPAR δ 在人群中是否具有抗动脉粥样硬化的作用, 有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Tulenko TN, Sumner AE. The physiology of lipoproteins [J]. *J Nucl Cardiol* 2002 **9** (6): 638-649
- [2] Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines [J]. *Atherosclerosis* 1999 **145** (1): 33-43
- [3] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation [J]. *Inflamm Res* 2000 **49** (10): 497-505
- [4] Yan ZC, Liu DY, Zhang LL, et al. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-delta [J]. *Biochim Biophys Res Commun* 2007 **354** (2): 427-433
- [5] Zawadzki Z, Mihne RW, MarcelYL. Cu2(+) mediated oxidation of dialyzed plasma: effects on low and high density lipoproteins and cholesteryl ester transfer protein [J]. *J Lipid Res* 1991 **32** (2): 243-250
- [6] 赵霞, 祝学卫, 杨丽敏, 等. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞产生单核细胞趋化因子 RANTES [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001 **9** (4): 281-284
- [7] Freundlich B, Avdalovic N. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes [J]. *J Immunol Methods* 1983 **62** (1): 31-37
- [8] Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma [J]. *J Clin Invest* 2004 **114** (11): 1564-576
- [9] Hathi AK, Michalk L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives [J]. *Cell Mol Life Sci* 2002 **59** (5): 790-798
- [10] Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Endocrinology* 2003 **144** (6): 2201-207
- [11] Dressel U, Allen TL, Pippal JB, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist GW 501516 regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells [J]. *Mol Endocrinol* 2003 **17** (12): 2477-493
- [12] 章义利, 戴凌燕, 周秀云. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (1): 92-95
- [13] Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, et al. The PPARdelta agonist GW 0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice [J]. *Atherosclerosis* 2005 **181** (1): 29-37
- [14] Fan Y, Wang Y, Tang Z. Suppression of proinflammatory adhesion molecules by PPAR- δ in human vascular endothelial cells [J]. *Arterio Thromb Vas Biol* 2008 **28** (2): 315-321
- [15] Kim HJ, Kim MY, Jin H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (delta) regulates extracellular matrix and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the activation of transforming growth factor- β 1/Smad3 [J]. *Circ Res* 2009 **105** (1): 16-24

(此文编辑 曾学清)