

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0052-05

同型半胱氨酸通过下调胰岛素诱导因子 1mRNA 表达增加巨噬细胞胆固醇合成

韦丽华, 邸云峰, 焦玉蓉, 王树人

(四川大学华西基础与法医学院病理生理教研室, 四川省成都市 610041)

[关键词] 同型半胱氨酸; 巨噬细胞; 胰岛素诱导因子 1; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 胆固醇

[摘要] 目的 探讨同型半胱氨酸对 THP-1 巨噬细胞胆固醇合成的直接影响及其可能的作用靶位。方法 佛波酯诱导体外培养的 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞, 逆转录聚合酶链反应检测 5 mmol/L 同型半胱氨酸作用于巨噬细胞 0、4、8、18 h 及 24 h 后胰岛素诱导因子 1mRNA 和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 mRNA 的表达。酶比色法检测细胞内总胆固醇水平。结果 细胞内总胆固醇水平随同型半胱氨酸作用时间的延长而增加, 18 h 和 24 h 组细胞内总胆固醇水平与 0 h 组比较明显增加 ($P < 0.01$)。同型半胱氨酸呈时间依赖性降低胰岛素诱导因子 1mRNA 的表达, 8、18、24 h 组与 0 h 组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 mRNA 表达水平随同型半胱氨酸作用时间的延长而增加, 18 h 和 24 h 组 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 mRNA 表达水平与 0 h 组比较, 明显增加 ($P < 0.01$)。结论 同型半胱氨酸诱导巨噬细胞内脂质堆积、进而形成泡沫细胞的一个可能机制是下调胰岛素诱导因子 1 表达、进而上调 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶表达导致巨噬细胞内胆固醇合成异常增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Homocysteine Increases the Cholesterol Synthesis in Macrophages Through Down-Regulating the Expression of Insulin-Induced Gene 1

WEI Lihua, DI Yun-Feng, JIAO Yu-Rong, and WANG Shu-Ren

(Department of Pathophysiology, College of Preclinical Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Macrophage; Insulin-Induced Gene 1; 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase; Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of homocysteine (Hcy) on cholesterol synthesis in THP-1 macrophages and its potential target loci. **Methods** The macrophages were induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) from THP-1 mononuclear cells and treated by 5 mmol/L Hcy for 0 h, 4 h, 8 h, 18 h and 24 h respectively. The mRNA expression of insulin-induced gene 1 (Insig1) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Intracellular total cholesterol levels were examined by enzymatic colorimetric assay. **Results** Intracellular total cholesterol level increased significantly compared with the 0 h group at 18 h and 24 h ($P < 0.01$) after Hcy-treatment. The expression of Insig1 mRNA demonstrated a time-dependent down-regulation after Hcy-treatment. 8 h, 18 h and 24 h groups had significant lower Insig1 mRNA level vs 0 h group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The HMGCR mRNA expression showed obvious upregulation at 18 h and 24 h compared with the 0 h group ($P < 0.01$). **Conclusion** A potential mechanism for Hcy-induced lipid accumulation in macrophage and foam cell formation may go through the following way: Hcy down-regulates the expression of Insig1 and sequentially up-regulates the HMGCR expression, which eventually increases the cholesterol synthesis in THP-1 macrophages.

高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 一个重

要的独立危险因素^[1,2], 而巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是 As 最早的形态学证据和最重要的发病机制之一。同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 促进泡沫细胞形成的机制被认为与其诱导的氧化应激有关^[3], Hcy 氧化修饰进入内皮下的低密度脂蛋白 (LDL) 生成氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL), ox-LDL 不能被 LDL 受体识别, 而被巨噬细胞的清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 识别、吞噬。由于 LDL 受体具反馈调节机制, 可避免细胞内胆固醇浓度过高、形

[收稿日期] 2009-11-12 [修回日期] 2010-01-10

[作者简介] 韦丽华, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 lily206_studen@sina.com。邸云峰, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 diyunfeng82180@sina.com。焦玉蓉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 jiaoyurong84@163.com。通讯作者王树人, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email 为 wang-shuren1945@yahoo.com.cn。

成脂质堆积;而清道夫受体不具反馈调节机制,最终引起巨噬细胞过度吞噬 ox-LDL,形成泡沫细胞。

但 Hcy 是否可直接干扰巨噬细胞的脂质代谢进而促进泡沫细胞形成,尚未见相关报导。目前已有的研究显示, Hcy 可诱导肝细胞的脂质代谢异常、促进肝细胞脂肪变性导致肝损伤^[4-5],对血管内皮细胞和平滑肌细胞,亦有少量报导显示 Hcy 可诱导其脂质代谢失调。据此思路, Hcy 也极有可能直接干扰巨噬细胞的脂质代谢,促进巨噬细胞脂质堆积形成泡沫细胞。由于巨噬细胞是 As 发生、发展中最重要细胞成份之一,因此,本研究探讨 Hcy 对巨噬细胞胆固醇代谢的直接影响及其关键环节,以期对 As 发生发展的机制提供新认识和可能的新的药物作用靶位。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

CO₂ 孵箱 (Heraeus Germany); 倒置相差显微镜 (Nikon Japan); pH 测定仪 (433Q JENWAY Ltd U.K.); 低温冷冻高速离心机 (BECKMAN COULTER Avanti J-301, Germany); 电泳仪 (BIO-RAD, America); 紫外分光光度计, PCR 仪 (Bimeta Germany); 凝胶成像系统 (DBT-08 EEC 公司); 半自动生化仪 (BT-224 Italy); 可见分光光度计 (VIS-720Q Techcomp 公司)。RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司); 小牛血清 (上海复蒙基因生物科技有限公司); 佛波酯 (PMA), 同型半胱氨酸 (DL-Homocysteine, Sigma 公司); RT-PCR 试剂盒 (成都博瑞克生物技术有限公司); 总胆固醇试剂盒 (北京中生北控生物科技股份有限公司); 考马斯亮兰蛋白测试盒 (南京建成生物工程研究所) 等。

1.2 THP-1 单核细胞培养、诱导分化及处理

THP-1 单核细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。待细胞扩增至一定数量时常规传代培养, 每三天传代一次。每次实验前诱导分化细胞用 10⁸ 个/L 细胞接种于 25 cm² 培养瓶, 加终浓度为 160 nmol/L 的 PMA 孵育 72 h, 使单核细胞分化为巨噬细胞。弃去旧培养基并用灭菌 PBS 液冲洗 2 遍, 更换为含 5 mmol/L Hcy 的无血清 RPMI-1640 培养基继续培养 0、4、8、18 h 及 24 h 以不加 Hcy 处理组为对照。

1.3 胰岛素诱导因子 1 水平和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 mRNA 水平

收集各时间点细胞, 用 TRNzol 总 RNA 抽提试

剂提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 的完整性, 紫外分光光度计测其纯度和浓度。取各时间点细胞总 RNA 各 1 μg, 按 RT-PCR 试剂盒说明书用 ReverTra Ace 逆转录酶进行逆转录。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 循环。PCR 扩增条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 退火温度见表 1, 时间均为 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 循环 30 次后 72℃ 延伸 5 min。β-actin 为内参, 根据 Genbank 资料使用引物设计软件 Primer 5.0 设计 PCR 引物, 各基因的 PCR 引物序列、反应条件和 PCR 产物大小见表 1。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离后凝胶成像系统摄影, GelPro 成像分析系统进行灰度扫描, 计算出目的基因和内参 β-actin 灰度比值作为目的基因 mRNA 的相对表达强度。

表 1 扩增引物序列、大小和退火温度

基 因	引物序列 (5' → 3')	大小 (bp)	退火温度 (℃)
Insig1	上游: GGCATCATCGCTGTT	264	58.1
	下游: TGCAGCGCATGACACT		
HMGCR	上游: GGACCAACCTACTACCTC	295	52.7
	下游: AGTCCTTTAGAACCCAAT		
β-actin	上游: ATCCCTGTACGCCTCTGG	528	59.2
	下游: TCCTTCTGCATCCTGTCC		

1.4 细胞内总胆固醇水平检测

待细胞处理结束后, 弃去培养液, 用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 充分消化细胞, 加入完全培养液终止消化, 吹打细胞, 收集细胞悬液 800 r/min 离心 3 min, 弃去培养液, PBS 液洗涤 2 次, 150 μL PBS 液重悬收集细胞。反复冻融 3 次裂解细胞, 50 μL 用以蛋白定量, 100 μL 用以总胆固醇检测。按照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书进行蛋白定量。按照总胆固醇试剂盒说明书酶比色法测定细胞内总胆固醇水平。取一定量试剂 R2 (主含磷酸缓冲液 (pH = 7.7)、4-氯酚、4-氨基安替吡啉) 复溶试剂 R1 (主含胆固醇酯酶、胆固醇氧化酶、过氧化物酶), 溶解后为工作液。空白管, 校准管, 待测样品管都加入工作液 910 μL, 再分别加入蒸馏水, 校准液, 样品各 100 μL, 分别混匀, 在 37℃ 保温 6 min, 在半自动生化仪上以空白管校零, 分别读出校准管和样品管的吸光度。细胞内总胆固醇浓度用校准浓度计算, 用蛋白含量来标化各细胞样本的总胆固醇值, 以 mmol/g 细胞蛋白为单位。

1.5 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 15.0 软件采用单因素方差分析方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 佛波酯诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞

THP-1 单核细胞诱导分化前悬浮生长, 圆形或类圆形, 呈葡萄串样聚集成团; 佛波酯诱导分化后细胞呈贴壁状态, 形状不规则并有伪足伸出, 表明

THP-1 单核细胞已分化为巨噬细胞 (图 1)。

2.2 胰岛素诱导因子 1mRNA 和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 mRNA 相对表达水平的变化

结果显示, Hcy 呈时间依赖关系降低 Insig1mRNA 的表达, 其中 8、18、24 h 组与 0 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 h 组、8 h 组 HMGCR mRNA 的表达量与 0 h 组比较, 差异无统计学意义, 但 18 h 组、24 h 组 HMGCR mRNA 表达水平与 0 h 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2 和表 2)。

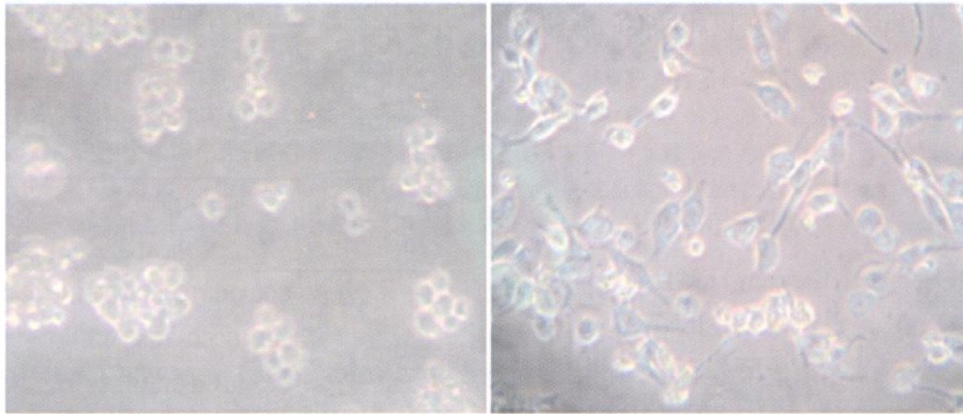


图 1 佛波酯诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞前后细胞形态学变化 ($\times 200$) 左图为佛波酯诱导分化前; 右图为佛波酯诱导分化后

表 2 Hcy 作用于 THP-1 巨噬细胞不同时间后 Insig1mRNA 和 HMGCR mRNA 表达水平的变化 (灰度比值, $n = 3$)

基 因	0 h	4 h	8 h	18 h	24 h
Insig1	0.597 ± 0.023	0.587 ± 0.025	0.523 ± 0.056^a	0.432 ± 0.026^b	0.386 ± 0.032^b
HMGCR	0.801 ± 0.035	0.784 ± 0.032	0.750 ± 0.043	1.031 ± 0.063^b	1.129 ± 0.108^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

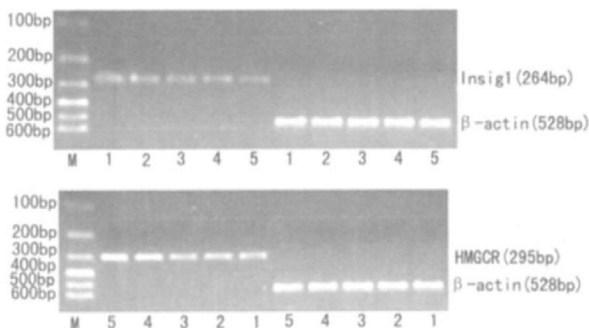


图 2 Hcy 作用于 THP-1 巨噬细胞不同时间后 Insig1mRNA 和 HMGCR mRNA 表达水平的变化 1~5 分别为 0 h, 4 h, 8 h, 18 h 和 24 h 组。

2.3 细胞内总胆固醇水平的变化

随 Hcy 作用时间延长, 细胞内总胆固醇水平增高, 18 h 组、24 h 组细胞内总胆固醇水平明显增加, 与 0 h 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 3)。

表 3 Hcy 作用于 THP-1 巨噬细胞不同时间后细胞内总胆固醇水平的变化 ($n = 3$)

分 组	总胆固醇 (mmol/g)
0 h 组	0.110 ± 0.014
4 h 组	0.100 ± 0.017
8 h 组	0.091 ± 0.026
18 h 组	0.236 ± 0.024^a
24 h 组	0.560 ± 0.027^a

a 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

3 讨论

本研究探讨了 Hcy 对巨噬细胞胆固醇合成代谢中两个关键调节因素的影响, 一为胆固醇合成代谢负反馈调节的关键因素——胰岛素诱导因子 1 (insulin-induced gene 1, *Insig1*)^[6], 二为胆固醇合成途径的限速酶——3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)。 *Insig1* 水平的降低可使细胞越过胆固醇介导的负反馈调节机制致胆固醇合成异常增加; 而 HMGCR 是胆固醇合成限速酶, 是目前临床上最主要的降胆固醇药物——他汀类药物的作用靶位^[7]。巨噬细胞源性泡沫细胞是 As 斑块中的主要细胞之一。吞噬大量脂质的泡沫细胞内胆固醇过载, 可导致泡沫细胞的凋亡与破裂, 从而加剧了血管壁的脂质沉积和炎症反应, 促进 As 的发生、发展^[8]。长期以来, Hcy 促进泡沫细胞的形成一直归咎于 Hcy 的氧化应激机制。Hcy 在过渡金属元素的存在下易发生自身氧化, 生成超氧化物、过氧化氢和羟自由基等活性氧化物, 引起脂质过氧化、蛋白质损伤; 或降低细胞外超氧化物歧化酶表达, 抑制清除活性氧化物的酶活性, 抑制一氧化氮合酶等等, 促使 LDL 转化为 ox-LDL, ox-LDL 经巨噬细胞清道夫受体识别、吞噬, 从而促进巨噬细胞源性泡沫细胞的形成^[9-11]。

但在肝脏, 文献报导同型半胱氨酸可致肝细胞内胆固醇合成不受负反馈调制地异常增加, 高蛋氨酸饮食诱导的小鼠血浆 Hcy 浓度升高可显著增加小鼠肝细胞内胆固醇和甘油三酯含量^[12]; Hcy 亦可导致体外培养的人肝癌细胞、脐静脉内皮细胞、主动脉平滑肌细胞内胆固醇合成增加^[13]。Hcy 对巨噬细胞内胆固醇合成的影响尚未见报导, 是否正对这些细胞的效应, Hcy 可促进巨噬细胞内胆固醇合成不受反馈调制地异常升高? 本文探讨了胆固醇合成反馈调节的两个关键环节。结果显示, Hcy 作用于巨噬细胞可使其细胞内总胆固醇水平明显增加, 并使胆固醇合成代谢负反馈调节的关键因素——*Insig1* mRNA 的表达降低, 和胆固醇合成限速酶——HMGCR mRNA 的表达增高, 且 *Insig1* mRNA 表达的降低早于 HMGCR mRNA 表达的增高和细胞内总胆固醇水平的增加 (*Insig1* mRNA 表达降低的显著性差异出现于 Hcy 作用于巨噬细胞 8 h 而其它两项升高的显著性差异出现于 Hcy 作用于巨噬细胞 18 h), 提示后两者的改变可能源于 *Insig1* 的降低。

Insig1 介导着胆固醇负反馈调节的关键环

节——固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding protein, SREBP) 的活化。SREBP 是一类重要的调节脂代谢的转录因子, 胆固醇生物合成途径中的所有基因^[14, 15], 包括胆固醇合成过程中的限速酶——HMGCR 都由 SREBP 调控。他汀类药物作为目前临床上最重要的降胆固醇药物, 其作用环节在 SREBP 调控的靶酶 HMGCR, 是 HMGCR 抑制剂。

而在内质网上合成的 SREBP 是蛋白前体形式, 并无转录活性, 只有当 SREBP 被运输到高尔基体进行加工后才有最终的转录活性, 并激活下游基因的表达, 启动胆固醇的合成。其负反馈调节的大致过程如下: SREBP 前体蛋白从内质网运输到高尔基体进行活化需要被膜蛋白复合体 (coat protein complex, COP) 作为中介, COP 是由多种蛋白质构成的囊泡, 可将 SREBP 前体蛋白装入囊泡运输, 但该过程需要 SREBP 裂解激活蛋白 (SREBP-cleavage activating protein, SCAP) 协助, COP 识别 SCAP-SREBP 复合体并将其包装入囊泡, 启动 SREBP 从内质网到高尔基体的运输、活化。而 SCAP 分子包含一个固醇感受结构域 (sterol sensing domain, SSD), SSD 可感知胆固醇高低并启动 *Insig* 与 SCAP 结合, 该结合阻断 SREBP 的运输, 成为胆固醇合成负反馈调节的关键步骤。当细胞内胆固醇浓度升高时, *Insig* 与 SCAP 结合, 阻碍 SCAP-SREBP 从内质网到高尔基体的运输和随后的活化, 胆固醇合成的相关酶类生成减少从而降低胆固醇合成。当细胞内胆固醇浓度降低时, *Insig* 与 SCAP 解离, SREBP 的活化增强, 胆固醇合成的相关基因表达加强, 胆固醇合成增加, 从而解除胆固醇合成的负反馈。此外, *Insig1* 还介导固醇触发的 HMGCR 降解 (sterol-triggered degradation of HMG CoA reductase), 成为胆固醇合成负反馈调节的另一重要机制。当细胞内胆固醇浓度升高时, HMGCR 的半衰期通常低于 1 h 但当细胞内胆固醇耗竭时, HMGCR 的半衰期可超过 12 h。胆固醇本身对 HMGCR 降解的诱导作用很弱, 但胆固醇堆积可介导 HMGCR 与 *Insig* 结合, *Insig* 结合 HMGCR 后经由泛素途径大大加速其降解^[15]。

大量实验显示, *Insig1* 基因的过度表达能够使脂质合成受阻; 而当 *Insig1* 在仓鼠细胞中突变失活或通过 RNA i 干扰其表达时, 即使再用固醇处理, SREBP 同样可被激活, 并促进胆固醇合成^[16]。这说明 *Insig1* 在胆固醇合成负反馈调节中的确发挥着非常关键的作用, 其表达异常可导致脂质代谢紊乱。因此本研究结果发现的 *Insig1* 表达降低可能是致使

HMGCR mRNA 表达增加和细胞内总胆固醇水平升高的关键环节。Insig1 可能成为临床上降低胆固醇的新的作用靶位。

HCy 通常与血浆脂质水平异常无关, 流行病学调查并无显示血浆总同型半胱氨酸水平的提升与胆固醇和/或甘油三酯水平增加呈相关性^[13]。因此, 本研究结果提示, HCy 诱导巨噬细胞内胆固醇堆积、泡沫细胞形成, 除了已知的氧化应激、ox-LDL 生成途径外, HCy 诱导的 Insig-1 水平下降 $\rightarrow$ HMGCR 水平升高 $\rightarrow$ 细胞内胆固醇合成增加, 可能是巨噬细胞源性泡沫细胞形成、As 发生发展的另一重要途径, 并可能成为干预胆固醇代谢、治疗 As 的新靶点。

[参考文献]

- [1] Duell PB, Malinow MR. Homocyst(e)ine an important risk factor for atherosclerotic vascular disease [J]. *Curr Opin Lipidol* 1997; **8** (1): 28-34
- [2] Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine role and implications in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2006; **8** (2): 100-106
- [3] Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of folate supplementation [J]. *Nutr J* 2004; **3** (1): 4-31
- [4] Woo CW, Siow YL, Pierce GN, et al. Hyperhomocysteinemia induces hepatic cholesterol biosynthesis and lipid accumulation via activation of transcription factors [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288** (5): 1 002-010
- [5] Ji C, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia endoplasmic reticulum stress and alcoholic liver injury [J]. *World J Gastroenterol* 2004; **10** (12): 1 699-708
- [6] Lee JN, Ye J. Proteolytic activation of sterol regulatory element binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1 [J]. *J Biol Chem* 2004; **279** (43): 45 257-265
- [7] 陈保生, 李德岭, 任渝堂. 越低越好, 越快越好? ——他汀类药物强化降脂利弊谈 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (9): 737-740
- [8] 张艳, 林玉壁, 孙雷. 巨噬细胞凋亡与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (5): 406-408
- [9] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia [J]. *J Clin Invest* 1996; **98** (1): 5-7
- [10] Jiang Y, Jiang J, Xiong J, et al. Homocysteine-induced extracellular superoxide dismutase and its epigenetic mechanisms in monocytes [J]. *J Exp Biol* 2008; **211** (6): 911-920
- [11] Chow K, Cheung F, Lao TT, et al. Effect of homocysteine on the production of nitric oxide in endothelial cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; **26** (10): 817-818
- [12] 黄丹文, 晏春根, 朱东方, 等. SREBP1C、GRP-94 在小鼠肝细胞脂质代谢中的作用 [J]. *基础医学与临床*, 2007; **27** (5): 509-513
- [13] Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways [J]. *J Clin Invest* 2001; **107** (10): 1 263-273
- [14] Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor [J]. *Cell* 1997; **89** (3): 331-340
- [15] Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein Sensors for Membrane Sterols [J]. *Cell* 2006; **124** (1): 35-46
- [16] 王伟, 王继文. Insig-SCAP-SREBP 转运体系的研究进展 [J]. *中国国家禽*, 2005; **9** (1): 192-195
(此文编辑 李小玲)