

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0935-04

• 实验研究 •

血管紧张素 Ang^{II} 通过下调巨噬细胞 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白的表达而减少细胞胆固醇流出

李慧¹, 杨志明¹, 肖传实¹, 康玉明²

(1 山西医科大学第二医院心血管内科, 山西省太原市 030001;

2 西安交通大学医学院生理学教研室, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 血管紧张素 Ang^{II} ; C 型 1 类尼曼-匹克蛋白; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 以 THP-1 源性巨噬细胞为研究对象, 探讨血管紧张素 Ang^{II} 对 THP-1 源性巨噬细胞 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白表达及胆固醇流出的影响。方法 体外培养的人 THP-1 单核细胞经佛波酯诱导 48 h 使之分化为巨噬细胞, 采用不同浓度的 Ang^{II} 进行处理, 逆转录聚合酶链反应和 Western Blotting 蛋白印记技术分别检测血管紧张素 Ang^{II} 对 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白 mRNA 与蛋白表达的影响, 应用液体闪烁计数仪检测胆固醇流出的变化。结果 与对照组相比, 血管紧张素 Ang^{II} 能下调 THP-1 源性巨噬细胞 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白 mRNA 与蛋白质的表达, 减少巨噬细胞内胆固醇流出 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。结论 血管紧张素 Ang^{II} 可能通过抑制 THP-1 巨噬细胞 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白的表达, 减少巨噬细胞内胆固醇流出, 进而促进动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Angiotensin Ang^{II} Inhibit the Expression of Niemann-Pick Protein C1 in THP-1 Macrophages and Decrease the Effluent Rate of Cholesterol

LI Hu¹, YANG Zhiming¹, XIAO Chuan-Shi¹, and KANG Yuming²

(1 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2 Department of Physiology, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University Xi'an, Shan'xi 710061, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Ang^{II} ; Niemann-Pick Protein C1; THP-1 Macrophages; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin Ang^{II} on the expression of niemann-pick protein C1 (NPC1) in THP-1 macrophages and also explore the effect on the rate of cholesterol effluent. **Methods** Macrophages were converted from THP-1 monocytes induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48 h and then they were treated by Ang^{II} at different concentrations. The expression of NPC1 mRNA and protein was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blotting respectively. Cholesterol effluent was measured by liquid scintillator. **Results** Compared with the control group, the expression of NPC1 mRNA and protein were significantly downregulated when incubated with Ang^{II} dose-dependently. Meanwhile, the effluent rate of cholesterol was also decreased. **Conclusion** Angiotensin Ang^{II} may inhibit the expression of NPC1 in THP-1 macrophages and decrease the effluent rate of cholesterol, contributing to the development of atherosclerosis.

C 型 1 类尼曼-匹克蛋白 (niemann-pick protein C1, NPC1) 是细胞晚期体内 (late endosome, LE) 中含有一个固醇感受域的跨膜糖蛋白^[1]。NPC1 几乎在每一种组织中都表达^[2], 除小肠上皮细胞是促进胆固醇吸收外, 它主要识别蛋白质环境中的游离固醇, 参与转运细胞内的胆固醇到细胞膜, 进而导致胆固醇流出, 促进细胞胆固醇逆向转运, 防止动脉粥样硬化 (As) 的形成^[3,4]。血管紧张素 Ang^{II} (angiotensin Ang^{II})

Ang^{II} 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统中主要的活性肽产物, 是一种加速动脉粥样硬化的重要危险因素, 通过升高血压、内皮损害、炎症状态和促进平滑肌细胞增殖等作用促进动脉粥样硬化的发生发展^[5]。最近研究发现 Ang^{II} 的一种新的致动脉粥样硬化机制^[6,7], 即通过抑制巨噬细胞胆固醇的外流, 减少胆固醇逆向转运, 从而加速动脉粥样硬化。本研究旨在研究 Ang^{II} 对参与胆固醇逆向转运的关键因子 NPC1 的表达及胆固醇流出的影响。

[收稿日期] 2010-09-27 [修回日期] 2010-11-18

[基金项目] 山西省科技攻关项目 (20100311098-4)

[作者简介] 李慧, 硕士研究生, E-mail 为 lhu4821@sina.com。通讯作者杨志明, 主任医师, 主要从事冠心病的基础与临床方面的研究, E-mail 为 zhimingyang800@sina.com。肖传实, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人 THP-1 单核细胞购自中国科学院上海细胞

库; Ang^①、佛波酯 (PMA)、载脂蛋白 A iv (ApoA iv) 购自美国 Sigma 公司; [³H] 标胆固醇购自 Perkin-Elmer 公司; RPM I1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 GIBCO/BRL 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (Transzol) 购自美国 Promega 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Fementas PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成; 兔抗人 NPC1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; β -actin 多克隆抗体购自北京康为世纪科技有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司。

1.2 细胞培养及分组

THP-1 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPM I-1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。视细胞生长情况适当进行传代、换液。在每次实验前用 100 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 48 h 使其诱导分化成巨噬细胞。用 PBS 液充分洗涤 2 次, 去除不贴壁细胞及死亡细胞, 置于无血清的 RPM I-1640 培养基中, 开始药物干预实验。实验按 Ang^① 作用浓度分为 0 (对照组)、10、100、1000 和 10000 nmol/L Ang^① 组, 各组作用 24 h 后收集细胞, 用于 NPC1 表达的检测。

1.3 RT-PCR 法检测 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白的 mRNA 表达

Transzol 法提取总 RNA, 取各组细胞总 RNA 2 μ L 按 Fementas 试剂盒说明逆转录合成 cDNA, 再取 1 μ L 逆转录产物进行 PCR 循环。人 THP-1 巨噬细胞 NPC1 引物序列为上游 5' -ggtcgcctgtgtactttgt-3', 下游 5' -tgtccactgcagcaagac-3', 扩增片长 225 bp 人 GAPDH 引物序列为上游 5' - tgaacgggaagctcactgg-3', 下游 5' - tccaccacctgtgtctgga-3', 扩增片长 307 bp PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 30 min, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 终止 5 min, 共 32 个循环。反应结束后, 取 8 μ L PCR 扩增产物加 2 μ L 5 \times 上样缓冲液, 于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳 (60V, 1 h), 溴乙锭染色, UVP 凝胶图像分析系统扫描图分析, 以同管 GAPDH 为内参照, 测定各样本 NPC1 mRNA 的相对表达量。

1.4 Western Blotting 法检测 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白的表达

收集不同条件处理的细胞, MBST 裂解液裂解细胞, 于 4℃ 离心收集, 弃除沉淀。配取 5% 浓缩胶与 10% 分离胶, 上样量 60 μ g 用 SDS-PAGE 垂直凝胶电泳分离不同分子量的蛋白质, 浓缩胶 70 V 30 min, 分离胶 110 V 120 min, 当溴酚蓝条带至凝胶底部时, 停止电泳。电转移于 NC 膜上, 丽春红染色观

察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。封闭液封闭过夜, 按 1: 1000 加入兔抗人 NPC1 一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 按 1: 10000 的稀释倍数加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 室温孵育 3 h, TBST 洗 3 次, 用 ECL 显色并曝光于 X 胶片。结果用 Gelwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 以同管 β -actin 为内参, 测定各样本 NPC1 的相对表达量。

1.5 细胞胆固醇流出测定

胆固醇流出检测按文献 [7] 描述的方法操作, THP-1 巨噬细胞用 0.37×10^9 Bq/L [³H] 胆固醇及含 10% 小牛血清的 RPM I-1640 培养基共同孵育 48 h 之后, 用无菌 PBS 液洗涤细胞, 将细胞计数并随机分为 5 组, 分别加入无菌 PBS (对照)、10 nmol/L Ang^①、100 nmol/L Ang^①、1000 nmol/L Ang^①、10000 nmol/L Ang^① 在含有 0.3% BSA 的 RPM I-1640 培养基中静置培养 48 h 再用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清的含 10 mg/L ApoA iv 的培养液中继续培养 12 h 用闪烁计数法检测培养液和细胞的 [³H] 胆固醇。胆固醇流出率 = 培养液 cpm 值 / (培养液 cpm 值 + 细胞 cpm 值) \times 100% (cpm 为每分钟计数)。

1.6 统计学处理

以上实验均重复 5 次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 THP-1 细胞佛波酯诱导前后形态学变化

光学显微镜下观察, THP-1 细胞诱导分化前, 呈圆形, 悬浮生长。经 100 nmol/L PMA 孵育 48 h 后, 细胞由悬浮生长转化为贴壁生长, 呈梭形或不规则形, 并伸出伪足, 为巨噬细胞外形 (图 1)。

2.2 不同浓度血管紧张素^①处理 THP-1 巨噬细胞后 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白 mRNA 的表达

随着 Ang^① 浓度升高, NPC1 mRNA 表达的电泳条带亮度逐渐减弱 (图 2); 当 Ang^① 浓度为 10000 nmol/L 时, NPC1 mRNA 表达最弱。由表 1 可见, THP-1 巨噬细胞与不同浓度 Ang^① 孵育 24 h 后, Ang^① 使 THP-1 巨噬细胞 NPC1 mRNA 的表达下调, 且呈剂量依赖关系。

2.3 不同浓度血管紧张素^①处理 THP-1 巨噬细胞后 C 型 1 类尼曼-匹克蛋白的表达

与对照组相比, Ang^① 使 THP-1 巨噬细胞 NPC1

蛋白的表达下调,且呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。1000 nmol/L和 10000 nmol/L组与 10 nmol/L组相比, NPC1蛋白表达亦明显下调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3和表 1)。

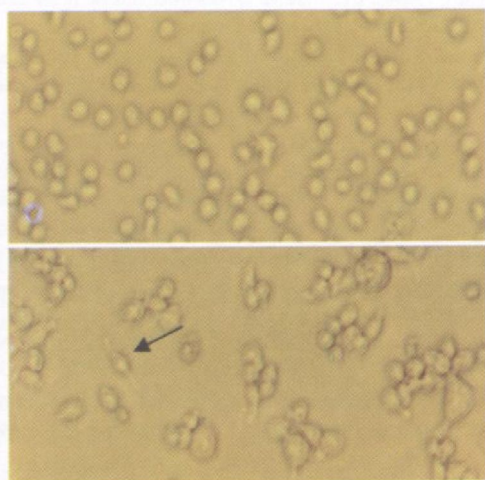


图 1. THP-1 单核细胞诱导前(上)、后(下)形态学观察($\times 100$)

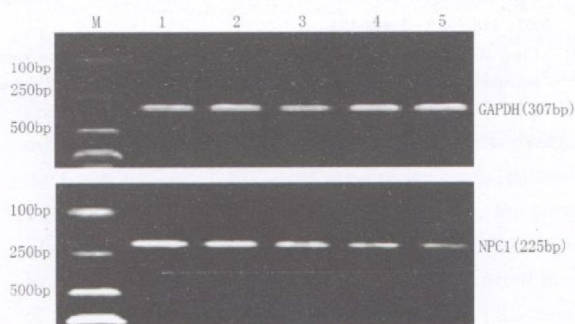


图 2. RT-PCR 检测 THP-1 源性巨噬细胞 C 型 I 类尼曼-匹克蛋白 mRNA 的表达 M 为 Marker, 1 为 0 nmol/L Ang II 组, 2 为 10 nmol/L Ang II 组, 3 为 100 nmol/L Ang II 组, 4 为 1000 nmol/L Ang II 组, 5 为 10000 nmol/L Ang II 组。

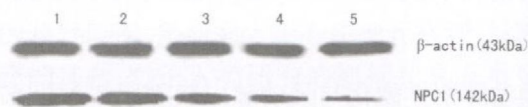


图 3. Western Blotting 检测 THP-1 源性巨噬细胞 C 型 I 类尼曼-匹克蛋白的表达 1 为 0 nmol/L Ang II 组, 2 为 10 nmol/L Ang II 组, 3 为 100 nmol/L Ang II 组, 4 为 1000 nmol/L Ang II 组, 5 为 10000 nmol/L Ang II 组。

2.4 不同浓度血管紧张素 II 对 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出的影响

不同浓度 Ang II 作用组巨噬细胞胆固醇流出率与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性 (表 2); 相关分析表明, 巨噬细胞胆固醇流出

随 Ang II 浓度增加而逐渐减少 ($r = 0.939, P < 0.01$)。

表 1. 不同浓度 Ang II 作用 24 h 后 THP-1 源性巨噬细胞 NPC1 的 mRNA 及蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Ang II 浓度 (nmol/L)	n	NPC1 mRNA	NPC1 蛋白
0(对照组)	5	1.146 \pm 0.062	1.280 \pm 0.045
10	5	1.056 \pm 0.079 ^a	1.164 \pm 0.111 ^a
100	5	1.050 \pm 0.064 ^a	1.134 \pm 0.127 ^a
1000	5	0.648 \pm 0.046 ^{ab}	0.734 \pm 0.043 ^{ab}
10000	5	0.402 \pm 0.026 ^{ab}	0.438 \pm 0.047 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 10 nmol/L Ang II 组比较。

表 2. 血管紧张素 II 对 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇流出的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Ang II 浓度 (nmol/L)	n	胆固醇流出率
0(对照组)	5	14.06% \pm 0.56%
10	5	12.82% \pm 0.36% ^a
100	5	10.09% \pm 0.85% ^a
1000	5	7.69% \pm 0.48% ^{ab}
10000	5	7.19% \pm 0.58% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 10 nmol/L Ang II 组比较。

3 讨论

巨噬细胞胆固醇积聚形成泡沫细胞是动脉粥样硬化的基础,因此,促进巨噬细胞的胆固醇流出到细胞膜及细胞外受体是细胞调节胆固醇水平的一个重要机制,这是胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport RCT) 的第一步。这对预防和逆转粥样硬化斑块具有重要意义,也是近年来药物治疗和干预的重点目标。

NPC1 是细胞内胆固醇的搬运工, NPC1 能将细胞晚期内体/溶酶体 (late endosomes/lysosomes, LE/LY) 中的胆固醇转运到细胞膜。Choi 等^[8] 研究发现, NPC1 突变可导致人成纤维细胞磷脂和胆固醇流出减少, 血浆高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平下降。最近, Welch 等^[9] 人使用 NPC1 和 ApoE 双基因敲除小鼠来研究 NPC1 在动脉粥样硬化斑块形成中的作用, 发现该小鼠的动脉粥样硬化病变面积比同窝出生的 ApoE 基因敲除小鼠更大。可见敲除 NPC1 基因可增加动脉粥样硬化斑块形成, NPC1 表达上调对防止动脉粥样硬化形成有利。Zhang 等^[4]

研究发现, NPC1表达缺失时,通过减少细胞胆固醇流出和增加细胞氧化应激而加速动脉粥样硬化。

本研究采用 Western Blotting法和半定量 RT-PCR法从蛋白和 mRNA水平,观察了 AngⅡ对 THP-1巨噬细胞 NPC1表达的影响,用液体闪烁计数法检测 AngⅡ对 THP-1巨噬细胞胆固醇流出率的影响。研究结果表明, AngⅡ能显著抑制巨噬细胞 NPC1 mRNA和蛋白的表达,减少细胞胆固醇外流,并呈剂量依赖性。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1)是细胞膜上的胆固醇转运体, Chen等^[10]认为 LE/LY中的胆固醇是优先作为 ABCA1介导的胆固醇流出的胆固醇来源。因此, NPC1可能通过把 LE/LY中的胆固醇转运给细胞膜上的 ABCA1而导致胆固醇流出,防止巨噬细胞内胆固醇聚积和泡沫细胞形成。NPC1表达上调后把组织细胞内过多的胆固醇传递给细胞膜上的 ABCA1, ABCA1再将所接受的胆固醇转运给血浆中的 ApoAⅡ接受体,从而增加血浆 HDLC的水平。

因此 AngⅡ促进动脉粥样硬化的一个重要机制就是通过抑制 NPC1的表达,减少细胞内胆固醇流出,增加胆固醇的聚积,从而加速动脉粥样硬化的发生发展。这为我们研究 AngⅡ致动脉粥样硬化作用的胆固醇机制提供了新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Millard EE, Gale SE, Dudley N, et al. The sterolsensing domain of the Niemann-Pick C1 (NPC1) protein regulates trafficking of low density lipoprotein cholesterol [J]. *J Biol Chem*, 2005 **280** (31): 28 581-590
- [2] John MD, Stephen DT. Control of cholesterol turnover in the mouse [J]. *Biol Chem*, 2002 **277** (6): 3 801-804
- [3] Rigamonti E, Helin L, Lestavel S, et al. Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages [J]. *Circ Res* 2005 **97** (7): 682-689
- [4] Zhang JR, Coleman T, Langmade SJ, et al. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking [J]. *J Clin Invest* 2008 **118** (6): 2 281-290
- [5] Gorte K, Drexler H, Schieffer B. Renin-angiotensin system and atherosclerosis [J]. *Neurobiol Dis* 2004 **19** (4): 770-773
- [6] Yasunori Takata, Van Chu, Collins Alan R, et al. Transcriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1 gene in macrophages: a novel atherosclerotic effect of angiotensin II [J]. *Circ Res* 2005 **97**: e88-e96
- [7] 陈志坚, 王彦富, 廖玉华, 等. 血管紧张素Ⅱ对 THP-1源性泡沫细胞 ATP结合盒转运子 A1的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, **23** (2): 316-320
- [8] Choi HY, Karten B, Chan T, et al. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease [J]. *J Biol Chem*, 2003 **278** (35): 32 569-577
- [9] Welch C L, Sun Y, Arey BJ, et al. Spontaneous atherothrombosis and medial degradation in ApoE^{-/-}, NPC1^{-/-} mice [J]. *Circulation*, 2007 **116** (21): 2 444-452
- [10] Chen W, Sun Y, Carrie W, et al. Preferential ATP-binding cassette transporter A1 mediated cholesterol efflux from late Endosomes/Lysosomes [J]. *J Biol Chem*, 2001 **276** (47): 43 564-569

(此文编辑 许雪梅)

• 作者 • 读者 • 编者 •

更正启事

发表在 2010年第 18卷第 9期,张勤奕等发表的论文《颈动脉粥样硬化与颈动脉内膜剥脱术》中,675页标题 4冠状动脉粥样硬化应改为颈动脉支架植入,由于编校错误给作者带来不便,表示歉意,特此更正。