

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-02-0085-04

· 实验研究 ·

硫化氢对 THP-1 源性巨噬细胞脂质摄取的影响

赵战芝^{1,2}, 姜志胜¹, 易光辉^{1,2}, 谭建苗^{1,2}, 邓华菲³, 索 荣¹

(1. 南华大学心血管病研究所暨湖南省动脉硬化化学重点实验室; 2. 南华大学机能学实验中心,

湖南省衡阳市 421001; 3. 湘南学院病理生理教研室, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] 硫化氢; THP-1 源性巨噬细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 脂质摄取

[摘要] 目的 探索硫化氢对 THP-1 源性巨噬细胞脂质摄取的影响及可能机制。方法 采用荧光显微镜测 DiI 标记的氧化型低密度脂蛋白 (DiI-ox-LDL) 摄取、RT-PCR 和免疫印迹法测定 CD36 mRNA 和蛋白表达。结果 巨噬细胞与 DiI-ox-LDL 孵育后大量摄取氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL), 外源性硫化氢供体硫氢化钠显著抑制巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白, 而炔丙基甘氨酸 (一个硫化氢产生酶胱硫醚- γ -裂解酶抑制剂) 加剧巨噬细胞摄取氧化型低密度脂蛋白。进而, 硫氢化钠呈浓度依赖性抑制巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达, 而炔丙基甘氨酸促进巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达。结论 硫化氢抑制巨噬细胞摄取脂质及清道夫受体 CD36 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hydrogen Sulfide Inhibits ox-LDL Uptake in THP-1-Derived Macrophages

ZHAO Zhan-Zhi^{1,2}, JIANG Zhi-Shen¹, YI Guang-Hui^{1,2}, TAN Jian-Miao^{1,2}, DENG Hua-Fei³, and SUO Rong¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease and Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province; 2. Center of Functional Experiment, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China; 3. Department of Pathophysiology, Xiangnan College, Chenzhou Hunan 423000, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; THP-1-Derived Macrophages; Oxidized Low Density Lipoprotein; Lipid Uptake

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of hydrogen sulfide (H₂S) on ox-LDL uptake of THP-1-derived macrophages and its underlying mechanisms. **Methods** Fluorescence microscopy, RT-PCR and western blot were performed. **Results** Incubation of macrophages with DiI-ox-LDL led to ox-LDL uptake of macrophages. Sodium hydro-sulfide (NaHS, an H₂S donor) decreased ox-LDL uptake. While DL-propargylglycine (PPG) exerted opposite effects.

Furthermore, ox-LDL markedly induced CD36 mRNA and protein expression in macrophages, which was abolished by NaHS (50 to 100 μ mol/L), but enhanced by PPG. **Conclusions** H₂S inhibits ox-LDL uptake of THP-1-derived macrophages and down-regulates CD36 mRNA and protein expression.

巨噬细胞源性泡沫细胞在动脉内膜蓄积是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的一个主要病理特征。内膜巨噬细胞通过其膜上清道夫受体摄取氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL), 使细胞内蓄积大量胆固醇, 转变为泡沫细胞。清道夫受体 CD36 的表达水平直接影响巨噬细胞内

胆固醇的积累和 As 的形成。研究发现, 缺乏 CD36 患者的巨噬细胞和 CD36^{-/-}小鼠巨噬细胞与 ox-LDL 孵育后, 摄取 ox-LDL 的量较正常巨噬细胞减少约 50%, 且不转变为泡沫细胞; 动物实验结果显示, CD36^{-/-}小鼠被饲喂致 As 病变的西方饮食后, 其 As 病变面积明显小于野生型小鼠^[1]。目前, CD36

[收稿日期] 2010-12-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30971169), 湖南省自然科学基金项目 (09JJ6044), 湖南省科技计划项目 (2008TP4038-2), 湖南省研究生创新项目 (2008CXJJ04) 及湖南省高校科技创新团队支持计划项目 (2008-244)

[作者简介] 赵战芝, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治, E-mail 为 zhaoz99@126.com。通讯作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管闭塞性疾病的病因发病学与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。易光辉, 教授, 主要从事动脉粥样硬化发病机制研究, E-mail 为 ghyi6108@163.com。

已经成为防治 As 和相关并发症的药理学干预靶标。

内源性硫化氢 (hydrogen sulfide, H_2S) 被认为是继一氧化氮和一氧化碳之后的第三类气体信号分子,是心血管系统的内源性保护分子,具有抗氧化、舒缓血管等功能^[2,3]。 H_2S 在体内主要以 H_2S 和硫化氢钠 (sodium hydrosulfide, NaHS) 两种形式存在。Wang 等^[4]报道,注射 NaHS 可防止 ApoE^{-/-} 小鼠早期动脉粥样硬化病变形成。课题组前期工作发现,在 THP-1 巨噬细胞泡沫化过程中,内源性 H_2S 产率降低,而外源补充 NaHS 可抑制巨噬细胞脂质蓄积^[5,6],但机制尚不清楚。本研究探讨 H_2S 对 THP-1 源性巨噬细胞脂质摄取的影响,并观察其对 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响,以此探讨其潜在机制,为 H_2S 抗 As 形成提供进一步的实验依据及理论机制,并可能为 As 防治提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

THP-1 细胞购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心。总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 (ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit) 和 PCR 试剂盒 (2 × Taq Master Mix) 分别购自 Omega biotek 公司、Fermentas 公司和 Tengen 公司。NaHS、PPG 和佛波酯购自 Sigma 公司。DiI 购自 Invetrogen 公司。抗人 CD36 抗体和 β -actin 抗体分别购自 Santa cruz 公司和博士德公司。

1.2 细胞培养及分组

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,在 37℃, 5% CO_2 培养箱中培养。在每次实

离心法制备 LDL [密度为 $(1.019 \sim 1.063) \times 10^3$ g/L]。参考文献 [7] 的方法制备铜氧化的 ox-LDL。硫代巴比妥法 (TBARS) 鉴定修饰程度。过滤除菌, 4℃ 保存备用。

1.4 DiI-ox-LDL 的制备

根据文献 [8] 用亲脂示踪剂 DiI 标记 ox-LDL。将 1 mL LDL (500 μ g/mL) 与 20 μ L DiI 贮液涡旋混匀 1 min, 在 37℃ 暗室孵育过夜。10 000 g, 离心 10 min, 沉淀未结合的 DiI。过滤上清。避光贮藏。

1.5 DiI-ox-LDL 摄取分析

细胞与 DMSO-ox-LDL 或 DiI-ox-LDL (10 μ g/mL) 及不同浓度 NaHS 孵育后, 弃去培养基, PBS 洗细胞 3 遍, 荧光显微镜分析 DiI-ox-LDL 内吞量。

1.6 RT-PCR 分析

按 Omega 试剂盒说明书提取总 RNA。将 1 μ g 总 RNA 用逆转录试剂盒反转录成 20 μ L cDNA。CD36 的引物序列: 上游 5'-GAGACCTGCTTATC-CAGAAGAC-3', 下游 5'-GACCAACTGTGGTAGTA-ACAGG-3', 扩增片段长度为 510 bp。GAPDH 的引物序列为: 上游 5'-AGAACATCATCCCTGCCTC-TACT-3', 下游 5'-GATGTCATCATATTTGGCAGGTT-3', 扩增片段长度为 164 bp。取 RT-PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析, 以各组目的基因与内参照基因吸光度的比值来比较待测基因的 mRNA 表达差异。

1.7 Western blotting 分析

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入细胞裂解液裂解细胞, 置冰上 10 min 后, 于 4℃, 10 000 g 离心 10 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定

(50 μ g/mL) 共同培养 48 h。

1.3 LDL 的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。用序列超速

沉淀处理, 组间比较采用非参数检验及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 硫化氢对 THP-1 源性巨噬细胞 DiI-ox-LDL 摄取的影响

THP-1 源性巨噬细胞与 DiI-ox-LDL 孵育后,大量摄取 ox-LDL,如图 1B 所示,胞浆内呈现大量红色荧光。而经 NaHS 处理后(图 1,Figure 1),细胞内荧

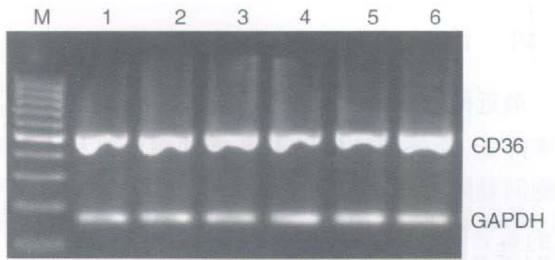


图 1. NaHS 和 PPG 对 THP-1 源性巨噬细胞 DiI-ox-LDL 摄取的影响(荧光显微镜,×200) A 为对照组,B 为 DiI-ox-LDL 组,C 为 DiI-ox-LDL + NaHS 25 μmol/L 组,D 为 DiI-ox-LDL + NaHS 50 μmol/L 组,E 为 DiI-ox-LDL + NaHS 100 μmol/L 组,F 为 DiI-ox-LDL + PPG 3 mmol/L 组。

Figure 1. Effect of NaHS 和 PPG on uptake of DiI-ox-LDL in THP-1 monocyte-derived macrophages (Magnification, ×200)

2.2 硫化氢对 THP-1 源性巨噬细胞 CD36 表达的影响

为了探讨 H₂S 抑制 THP-1 巨噬细胞脂质摄取的机制,采用 RT-PCR 法分析各组细胞 CD36 mRNA 水平和 GAPDH mRNA 表达情况。与 ox-LDL 组比较,NaHS(50 ~ 100 μmol/L)呈剂量依赖性降低 CD36 mRNA 水平,有显著的统计学意义($P < 0.05$)。而 PPG (3 mmol/L) 进一步促进 ox-LDL 上调 CD36 mRNA 水平(图 2 和表 1,Figure 2 and Table 1)。Western blotting 分析结果显示,NaHS(100 μmol/L)明显下调 ox-LDL 诱导的 CD36 蛋白表达,而 PPG(3 mmol/L)明显上调 ox-LDL 诱导的 CD36 蛋白表达(图 3 和表 2, Figure 3 and Table 2)。



CD36 蛋白表达的影响 1 为对照组,2 为 ox-LDL 组,3 为 ox-LDL + NaHS 100 μmol/L 组,4 为 ox-LDL + PPG 3 mmol/L 组。

Figure 3. Effect of NaHS 和 PPG on CD36 protein expression in THP-1 monocyte-derived macrophages

表 1. CD36 与 GAPDH 的吸光度比值($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. Densitometric quantification of CD36 mRNA expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	n	CD36/GAPDH
对照组	3	1.819 ±0.203
ox-LDL 组	3	2.191 ±0.128
ox-LDL + NaHS 25 μmol/L 组	3	2.009 ±0.237
ox-LDL + NaHS 50 μmol/L 组	3	1.698 ±0.087 ^a
ox-LDL + NaHS 100 μmol/L 组	3	1.594 ±0.120 ^a
ox-LDL + PPG 3 mmol/L 组	3	2.548 ±0.108 ^a

a 为 $P < 0.05$,与 ox-LDL 组比较。

表 2. CD36 与 β-actin 的灰度比值($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Densitometric quantification of CD36 protein expression ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	CD36/β-actin
对照组	3	0.836 ±0.035
ox-LDL 组	3	1.110 ±0.060 ^a
ox-LDL + NaHS 100 μmol/L 组	3	0.766 ±0.041 ^b
ox-LDL + PPG 3 mmol/L 组	3	1.313 ±0.030 ^b

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

3 讨 论

最近研究报道 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉内源性 H₂S 产率降低,而外源性供以 H₂S 能抑制血浆和主动脉细胞间黏附分子 1 水平,并抑制 As 早期病变的形成^[4]。单核/巨噬细胞是参与动脉粥样硬化斑块形成的重要炎症细胞,也是泡沫细胞的主要来源细胞^[9]。课题组前期研究发现,外源性硫化氢抑制单核源性巨噬细胞内脂质蓄积^[6],但机制尚未阐明。在本研究中,本实验采用 THP-1 源性巨噬细胞为模型体外观察 H₂S 对巨噬细胞摄取脂质的影响及机制。本实验发现外源性 H₂S(以 NaHS 作为供体)明显抑制 THP-1 源性巨噬细胞摄取 ox-LDL,而 CSE 抑制剂 PPG 加剧巨噬细胞摄取 ox-LDL。进一步实验发现 PPG 抑制巨噬细胞生成 H₂S。这些结果表明, H₂S 抑制 As 病变形成的机制可能与抑制巨噬细胞摄取脂质及泡沫细胞形成有关。

巨噬细胞膜上清道夫受体的表达和功能直接影响巨噬细胞内脂质的积累和 As 的形成。CD36 属于 B 类清道夫受体,能识别并介导巨噬细胞吞噬 ox-LDL。研究显示抵抗素等通过上调巨噬细胞 CD36 表达,增加细胞内脂质蓄积^[10]。Harb 等^[11]报道, CD36 信号还能介导循环中单核吞噬细胞迁移到动脉粥样硬化病变内,促进血管壁炎症和泡沫细胞形成。本研究结果显示 NaHS 明显抑制 THP-1 源性巨噬细胞 CD36 mRNA 转录和蛋白表达。由此我们推测 H₂S 可能通过抑制 CD36 信号抑制血管壁炎症和泡沫细胞形成,从而抑制 As 病变形成。文献指出 H₂S 具有广阔的药理前景^[12]。因此,一定范围内增加血浆或主动脉 H₂S 水平可能成为防治 As 发生发展的有效措施。

总之,现在的结果表明, H₂S 可能通过下调巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达、减少 ox-LDL 摄取,而抑制巨噬细胞内脂质蓄积,供以 H₂S 可能有效地防治 As 的发生发展。

[参考文献]

- [1] Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36 [J]. *Cleve Clin J Med*, 2009, 76 (Suppl 2): S27-30.
- [2] Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) [J]. *Cell Biochem Funct*, 2010, 28 (2): 95-106.
- [3] 赵战芝, 姜志胜. 硫化氢和动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (12): 1 038-040.
- [4] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (2): 173-179.
- [5] 赵战芝, 姜志胜, 刘艳文, 等. 硫化氢对巨噬细胞脂质的影响 [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2008, 60 (Suppl2): 84.
- [6] 赵战芝, 王 佐, 谭建苗, 等. 外源性硫化氢通过抑制 SR-A 表达减少 THP-1 源性巨噬细胞内脂质蓄积 [J]. *南华大学学报(医学版)*, 2010, 38 (1): 6-9.
- [7] Napolitano M, De Pascale C, Wheeler-Jones C. Effects of lycopene on the induction of foam cell formation by modified LDL [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293: E1 820-827.
- [8] Conway JP, Kinter M. Proteomic and transcriptomic analyses of macrophages with an increased resistance to oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced cytotoxicity generated by chronic exposure to ox-LDL [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4 (10): 1 522-540.
- [9] Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis [J]. *Med Res Rev*, 2008, 28 (4): 483-544.
- [10] Lee TS, Lin CY, Tsai JY, et al. Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages [J]. *Life Sci*, 2009, 84 (3-4): 97-104.
- [11] Harb D, Bujold K, Febbraio M, et al. The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83 (1): 42-51.
- [12] Leslie M. Medicine: nothing rotten about hydrogen sulfide's medical promise [J]. *Science*, 2008, 320 (5 880): 1 155-157.

(此文编辑 李小玲)