

## 过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ 对巨噬细胞脂质蓄积及 CD36 表达的影响

曾颖<sup>1,2</sup>, 孙玉慧<sup>3</sup>, 黄延锦<sup>1</sup>, 易光辉<sup>2</sup>

(南华大学 1. 护理学院, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

3. 广东省江门出入境检验检疫局国际旅行卫生保健中心, 广东省江门市 529000)

[关键词] THP-1 巨噬细胞; CD36; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ ; 氧化型低密度脂蛋白; 脂质蓄积

[摘要] **目的** 观察过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂和拮抗剂对 THP-1 巨噬细胞胆固醇蓄积及 CD36 表达的影响。**方法** 实验分对照组、氧化型低密度脂蛋白组、Ciglitazone 处理组和 GW9662 处理组, 后两组用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白分别与过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂 Ciglitazone (10  $\mu$ mol/L) 及拮抗剂 GW9662 (10  $\mu$ mol/L) 共同孵育 24 h, 高效液相色谱分析法检测细胞总胆固醇蓄积情况, RT-PCR 和 Western blot 分别检测 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与对照组 (76.28  $\pm$  10.36 mg/g) 相比, 氧化型低密度脂蛋白 (121.63  $\pm$  13.32 mg/g) 能使细胞总胆固醇含量显著增加, 而 Ciglitazone 能使氧化型低密度脂蛋白处理的细胞总胆固醇含量进一步增加 (136.23  $\pm$  14.78 mg/g), GW9662 能使氧化型低密度脂蛋白处理的细胞总胆固醇含量减少 (98.52  $\pm$  11.45 mg/g)。过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  拮抗剂 GW9662 使巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达下调及胆固醇蓄积减少, 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂 Ciglitazone 使巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白的表达上调及胆固醇蓄积增多。**结论** 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  拮抗剂使 THP-1 巨噬细胞胆固醇蓄积减少及氧化型低密度脂蛋白诱导的 CD36 表达下调。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ on Cholesterol Accumulation and CD36 Expression in THP-1 Macrophages

ZENG Ying<sup>1,2</sup>, SUN Yu-Hui<sup>3</sup>, Huang Yan-Jin<sup>1</sup>, and Yi Guang-Hui<sup>2</sup>

(1. School of Nursing, 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001; 3. Jiangmen International Travel Health Care Centre, Jiangmen, Guangdong 529000, China)

[KEY WORDS] THP-1 Macrophage; Class B Scavenger Receptor CD36; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ; Oxidize Low-Density Lipoprotein; Cholesterol Accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) on cholesterol accumulation and CD36 expression in THP-1 macrophages. **Methods** Mononuclear cells were induced to differentiate into THP-1 macrophages by phorbol myristate acetate (160 nmol/L) co-incubation for 24 h. THP-1 macrophages were co-incubated with 50 mg/L oxidize low-density lipoprotein (ox-LDL) and PPAR $\gamma$  agonist Ciglitazone (10  $\mu$ mol/L; C) and PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 (10  $\mu$ mol/L; D) for 24 h, and the cells mixed with (B) and without (A) ox-LDL were as the control groups. 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 blot respectively. **Results** High performance liquid chromatography analysis demonstrated the amount of cellular total cholesterol were 76.28  $\pm$  10.36 (A), 121.63  $\pm$  13.32 (B), 136.23  $\pm$  14.78 (C), 98.52  $\pm$  11.45 (D) mg per gram protein. PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 inhibited CD36 mRNA and protein synthesis. Ciglitazone increased CD36 mRNA and protein synthesis. The ratios of CD36/GAPDH were 0.78 (A), 0.94 (B), 1.12 (C), 0.52 (D) respectively. Western blot re-

[收稿日期] 2011-05-11

[基金项目] 湖南省教育厅重点基金项目 (09A078)

[作者简介] 曾颖, 博士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化性心血管疾病发病的分子机制, E-mail 为 zengying2003@126.com。通讯作者易光辉, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 ghyi6108@163.com。

sults conform to RT-PCR outcomes. **Conclusion** Antagonist of PPAR $\gamma$  may decrease cholesterol accumulation and downregulate ox-LDL-induced CD36 expression in THP-1 macrophages.

清道夫受体介导的氧化型低密度脂蛋白(oxidize low-density lipoprotein, ox-LDL)的蓄积是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展中泡沫细胞形成的关键<sup>[1-3]</sup>。CD36 丰富表达于单核巨噬细胞膜表面<sup>[4]</sup>,是一种主要的氧化型低密度脂蛋白受体<sup>[5]</sup>。过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )是一种核转录因子,具有多种上游调控作用,既可控制炎症反应,亦可诱导 CD36 基因的表达<sup>[6,7]</sup>。研究显示,PPAR $\gamma$ -CD36 信号通路在单核巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取、泡沫细胞形成过程中起重要作用。目前关于 PPAR $\gamma$  激动剂与拮抗剂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。本研究旨在探讨 PPAR $\gamma$  激动剂与拮抗剂对 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 药品与试剂

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、PPAR $\gamma$  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、Western blot 荧光检测试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司;佛波酯、丽春红染色试剂购自 Sigma 公司;PPAR $\gamma$  激动剂 Ciglitazone 和 PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW9662 购自 Cayman 公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 细胞株培养与实验分组

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、 $1 \times 10^8$  U/L 青霉素 RPMI-1640 完全培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 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加处理因素:①对照组,RPMI-1640 培养基 + 5  $\mu\text{L}$  DMSO 孵育 24 h;②ox-LDL 组,用 50 mg/L ox-LDL + 5  $\mu\text{L}$  DMSO 孵育 24 h;③Ciglitazone 处理组,用 50 mg/L ox-LDL + 10  $\mu\text{mol/L}$  Ciglitazone 孵育 24 h;④GW9662 处理组,用 50 mg/L ox-LDL + 10  $\mu\text{mol/L}$  GW9662 孵育 24 h。

### 1.3 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  $\mu\text{mol/L}$  CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 溶液(pH7.2)中,37 $^{\circ}\text{C}$  温育 24 h。氧化后的 LDL 置于含 200  $\mu\text{mol}$  EDTA 的 PBS 中透析 24 h,PBS 再透析 24 h,过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$  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。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应检测 CD36 mRNA 的表达

收集各组细胞,Trizol 试剂提取细胞总 RNA,溶于无 Rnase 水中,紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值在 1.8 ~ 2.0 之间。CD36(GenBank 序列号为 NM005506)扩增片段长度为 246 bp,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 10 min。内参照 GAPDH 扩增片段长度为 697 bp,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 10 min。反应结束后,取 RT-PCR 产物在 1.2% 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测定和分析。

### 1.5 Western blot 法检测 CD36 蛋白的表达

收集细胞,经 PBS 洗涤 3 次,加入悬浮裂解液中裂解细胞后,于 4 $^{\circ}\text{C}$  10000  $\times$  g 离心 10 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白点样量为 50  $\mu\text{g}$ ,取 50  $\mu\text{g}$  蛋白/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 2 h 将蛋白转移至 PDVF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$  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 blot 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。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。

### 1.6 高效液相色谱法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  $\mu\text{L}$ ,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  $\mu\text{L}$  上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200

μL, 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 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100 μL 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℃, 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。

1.7 统计学方法

实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS13.0 统计软件完成, *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 THP-1 巨噬细胞内总胆固醇水平

与对照组 (76.28 ± 10.36 mg/g) 相比, ox-LDL 能使细胞胆固醇酯蓄积增多 (121.63 ± 13.32 mg/g), 而 Ciglitazone 能使 ox-LDL 处理的细胞胆固醇酯蓄积进一步增多 (136.23 ± 14.78 mg/g), GW9662 能使 ox-LDL 处理的细胞胆固醇酯蓄积减少 (98.52 ± 11.45 mg/g), 差异有统计学意义 (*P* < 0.05; 图 1)。

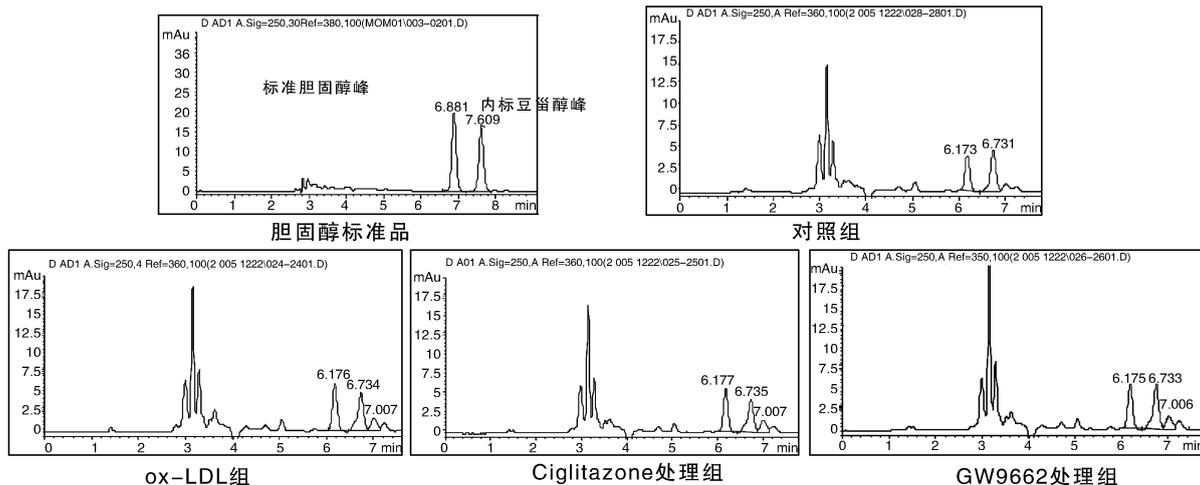


图 1. THP-1 巨噬细胞荷脂过程中细胞内总胆固醇含量的 HPLC 检测图

Figure 1. HPLC graph of cellular total cholesterol in THP-1 macrophages

2.2 PPARγ 激动剂和拮抗剂对 THP-1 巨噬细胞 CD36 mRNA 表达的影响

与对照组相比, ox-LDL 组 CD36 mRNA 的表达增强 (*P* < 0.05); 与 ox-LDL 组相比, PPARγ 激动剂 Ciglitazone 处理组 CD36 mRNA 的表达增强, 而 PPARγ 拮抗剂 GW9662 处理组 CD36 mRNA 的表达明显减弱, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05; 图 2 和表 1)。

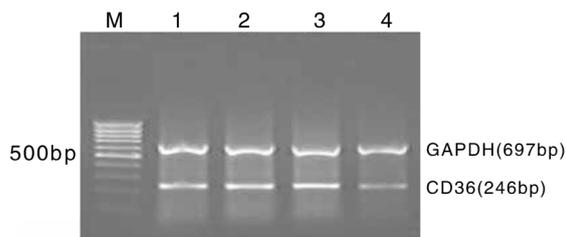


图 2. PPARγ 激动剂与拮抗剂对巨噬细胞荷脂过程中 CD36 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 Ciglitazone 处理组, 4 为 GW9662 处理组。

Figure 2. Effect of Ciglitazone, GW9662 on expression of CD36 mRNA in THP-1 macrophages

2.3 PPARγ 激动剂与拮抗剂对 THP-1 巨噬细胞 CD36 蛋白表达的影响

与对照组相比, ox-LDL 组 CD36 蛋白的表达增强 (*P* < 0.05); 与 ox-LDL 组相比, PPARγ 激动剂 Ciglitazone 处理组 CD36 蛋白的表达增强, 而 PPARγ 拮抗剂 GW9662 处理组 CD36 蛋白的表达明显减弱, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05; 图 3 和表 1)。CD36 蛋白与 mRNA 表达变化趋势一致。

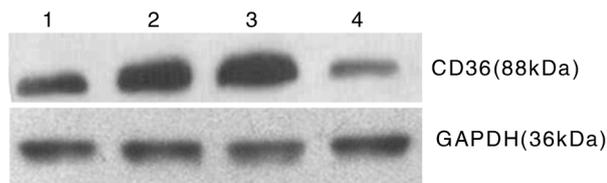


图 3. PPARγ 激动剂与拮抗剂对巨噬细胞荷脂过程中 CD36 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 Ciglitazone 处理组, 4 为 GW9662 处理组。

Figure 3. Effect of Ciglitazone, GW9662 on expression of CD36 protein in THP-1 macrophages

表 1. PPAR $\gamma$  激动剂与拮抗剂对巨噬细胞荷脂过程中 CD36 mRNA 和蛋白表达的影响

Table 1. Effect of Ciglitazone, GW9662 on expression of CD36 mRNA and protein in THP-1 macrophages

分 组	CD36 mRNA	CD36 蛋白
对照组	0.78 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.16
ox-LDL 组	0.94 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.76 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
Ciglitazone 处理组	1.12 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.12 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
GW9662 处理组	0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>

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

### 3 讨 论

As 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 蓄积是 As 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 As 病变脂质蓄积的决定因素。研究显示, 在 ox-LDL 诱导的 As 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。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%<sup>[8]</sup>, 提示 CD36 在 As 脂质蓄积过程中起重要作用。

PPAR $\gamma$  是核受体超家族的一员, 与 RXR 结合形成异二聚体, 它可以调节许多基因编码的蛋白的转录, 包括与脂肪形成和脂质代谢相关的基因等。PPAR $\gamma$  的主要功能是调节糖和脂类物质的代谢, 它也是调节巨噬细胞功能的关键因子, 在 As 发生发展中起着重要的作用。研究显示, ox-LDL 诱导 CD36 表达的作用可能是由于它能激活转录因子 PPAR $\gamma$  而产生的。研究显示, PPAR $\gamma$ -CD36 信号通路在单核细胞对 ox-LDL 的摄取、泡沫细胞形成过程中起重要作用<sup>[9,10]</sup>。在 As 形成过程中, PPAR $\gamma$  对巨噬细胞内胆固醇和脂质平衡的调控是研究的热点。

本课题组研究证实, PPAR $\gamma$  激动剂上调 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达, 增加细胞胆固醇流入; PPAR $\gamma$  拮抗剂下调 THP-1 巨噬细胞 CD36 的表达, 减少细胞胆固醇的流入。目前关于 PPAR $\gamma$  激动剂与拮抗剂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。本研究发现, PPAR $\gamma$  激动剂 Ciglitazone 引起 THP-1 巨噬细胞泡沫化过程中 CD36 上调及胆固醇蓄积增多, 而 PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW9662 引起 CD36、PPAR $\gamma$  表达下调及胆固醇蓄积减少。提示 PPAR $\gamma$  不同配体激活对巨噬细胞胆固醇蓄积的影响不同, PPAR $\gamma$ -CD36 通路对 THP-1 巨噬细胞胆固醇蓄积起正向调节作用。本研究进一步支持 PPAR $\gamma$ -CD36 通路在泡沫细胞形成过程中具有重要作用。

### [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] 靳文英, 陈红. CD36 与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 582-585.
- [3] 孙琳, 冯惊涛, 易光辉. B 类 I 型清道夫受体与胆固醇的双向转运[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(1): 67-70.
- [4] Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis[J]. Cardio Vasc Res, 2007, 75(3): 468-477.
- [5] Nicholson AC, Febbraio M, Han J, et al. CD36 in atherosclerosis: the role of a class B macrophage scavenger receptor[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 902: 128-131.
- [6] Majdalawieh A, Ro HS. PPAR gamma1 and LXR alpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1 [J]. Nucl Recept Signal, 2010, 8: e004.
- [7] 易光辉, 唐朝克, 莫中成. PPAR 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用[J]. 生命的化学, 2004, 24(3): 240-242.
- [8] Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi Y, et al. Identification of the molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency[J]. Blood, 1994, 83(12): 3545-552.
- [9] Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, et al. Expression of macrophage (M $\phi$ ) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , which regulates gain of M $\phi$ -like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20: 1027-032.
- [10] Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPAR gamma signaling[J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14(1): 8-12.

(此文编辑 许雪梅)