

# 冠心病患者巨噬细胞胆固醇流出的变化

李全忠, 陈华, 莫新玲, 韩金杰, 王杨阳

(广西桂林医学院心内科, 广西桂林市 541001)

[关键词] 冠心病; 巨噬细胞; 胆固醇流出

[摘要] **目的** 研究冠心病患者血液中单核细胞分化为巨噬细胞并荷脂后胆固醇流出的影响机制。**方法** 分离冠心病患者(试验组)和正常人群(对照组)外周静脉血中单核细胞,并用佛波酯诱导为巨噬细胞,收集分离血清,检测各项血脂指标并备用。细胞用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇处理 24 h 使其荷脂,然后分为四组:对照组+正常血清、对照组+高脂血清、试验组+正常血清及试验组+高脂血清。分别检测 ABCA1、ABCG1 表达及胆固醇流出率。**结果** 与对照组比较,试验组单核/巨噬细胞胆固醇流出能力受损,油红 O 染色显示细胞内脂质蓄积增加,细胞内胆固醇流出减少,但 ABCA1 和 ABCG1 的表达改变不明显。与正常血清比较,试验组及对照组中高脂血清明显影响胆固醇流出能力,细胞内脂质蓄积增加,细胞内胆固醇流出减少,但不影响 ABCA1 和 ABCG1 的表达。**结论** 冠心病患者巨噬细胞胆固醇流出能力受损,可能与动脉粥样硬化性血管疾病的发生相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Changes of Cholesterol Efflux of Macrophages in Patients with Coronary Heart Disease

LI Quan-Zhong, CHEN Hua, MO Xin-Ling, HAN Jin-Jie, and WANG Yang-Yang

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

[KEY WORDS] Coronary Heart Disease; Macrophage; Cholesterol Efflux

[ABSTRACT] **Aim** To study cholesterol efflux of macrophages in patients with coronary heart disease after cholesterol load and its mechanism. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were separated and induced to macrophages with phorbol ester in patients (test group) and normal individuals (control group). Cells incubated with  $[^3\text{H}]$  cholesterol for 24 h to charge cholesterol and then divided into 4 groups: control group + normal serum, control group + high-cholesterol serum, test group + normal serum and experimental group + high-cholesterol serum. ABCA1, ABCG1 expression, cholesterol efflux rates were detected. **Results** Compared with control group, monocyte/macrophage cholesterol efflux in experimental group was impaired. Oil Red O stain showed that the accumulation of intracellular lipid increased. The efflux of intracellular cholesterol decreased. But the expressions of ABCA1 and ABCG1 were not obvious. Compared with normal serum, high-cholesterol serum in the test group and control group significantly affected cholesterol efflux capacity. The accumulation of intracellular lipid increased. The efflux of intracellular cholesterol decreased. But the expressions of ABCA1 and ABCG1 were not obvious. **Conclusion** Macrophage cholesterol efflux in patients with coronary heart disease is impaired, which may be related to atherosclerosis-related vascular diseases.

单核细胞进入动脉壁内膜下转变为巨噬细胞,后者荷脂后在动脉壁转变为泡沫细胞是动脉粥样硬化病变的起始机制和主要病理形态学特点<sup>[1]</sup>。诱导荷脂巨噬细胞中胆固醇流出并通过血液循环转运到肝脏代谢排出是为胆固醇逆转运<sup>[2-5]</sup>。通过胆固醇逆转运消退动脉粥样硬化病变,预防临床上

冠心病发作是动脉粥样硬化性心血管疾病防治的努力方向之一。巨噬细胞中胆固醇流出既与细胞中介导胆固醇代谢的基因有关,又与细胞外胆固醇接收能力有关<sup>[2,6]</sup>。本研究从这两个方面展开了初步研究,以探讨冠心病患者胆固醇逆向转运能力及其影响机制。

[收稿日期] 2011-11-22

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科回 0832023)

[作者简介] 李全忠,博士,副主任医师,研究方向为心血管疾病的基础研究与临床防治。陈华,硕士,副主任医师,研究方向为心血管疾病的防治。莫新玲,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病的防治。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

2008年11月~2009年8月期间,在本院接受选择性冠状动脉造影(至少有一根主要的冠状动脉血管狭窄 $\geq 50\%$ )确诊为冠心病的患者31例,其中男16例,女15例,年龄 $57.1 \pm 7.3$ 岁(最小45岁,最大76岁),排除糖尿病和高血压病史,作为试验组。另外选择15例因疑病而接受选择性冠状动脉造影的正常个体作为正常对照。禁餐过夜后抽取试验对象外周静脉血,提取单核细胞和分离血清(冠心病患者源性作为细胞实验时的高脂血清,正常个体源性作为细胞实验时的正常血清)作为本研究的试验材料。此研究得到桂林医学院附属医院伦理委员会的批准。

### 1.2 仪器与试剂

$[^3\text{H}]$ 胆固醇购自Sigma公司,佛波酯(PMA)购自Alexis Biochemicals公司,Trizol试剂和RT-PCR试剂购自Promega公司。XH-6925液体闪烁计数器为国营二六二厂产品,Tgradient PCR仪系Biometra出产。

### 1.3 外周血单核细胞的分离及诱导分化

抽取患者动脉血10 mL,采用Percoll密度梯度离心法分离收集外周血单个核细胞,以每升 $1 \times 10^8$ 个细胞接种于细胞培养瓶,160 nmol/L PMA 孵育24 h诱导分化为巨噬细胞。

### 1.4 永生化细胞株的建立

采用EBV转化巨噬细胞,同时加入环孢菌素A抑制T淋巴细胞。首先制备EBV悬液,然后在培养的细胞中加入4 mL完全培养液、1 mL EBV液和2 mg/L环孢菌素A(CYA),37°C温箱培养,5天后可在倒置显微镜下观察到胞体长大、透明的转化细胞,10天后肉眼便可看到转化而形成的细胞集落。将细胞集落转入50 mL培养瓶,同时加2 mg/L CYA和1 mL EBV液继续培养。若细胞稳定传代,并维持对数生长状态,则表明细胞转化成功。

### 1.5 巨噬细胞中胆固醇流出的测定

巨噬细胞接种于6孔细胞培养板培养至80%汇合,在含有10%小牛血清RPMI1640培养液中加入 $0.2 \text{ mCi/L } [^3\text{H}]$ 胆固醇培养24 h,用PBS液洗涤细胞。细胞分为四组:试验组+高脂血清(2%)、试验组+正常血清(2%)、对照组+高脂血清(2%)及对照组+正常血清(2%)。培养24 h。PBS液洗涤细胞,闪烁液裂解细胞后,用闪烁计数法检测培养液和细胞中 $[^3\text{H}]$ 胆固醇。胆固醇流出率用培养液中

CPM/总CPM(培养液CPM+细胞CPM) $\times 100\%$ 来表示。

### 1.6 细胞内脂质测定

分别采用油红O染色和高效液相色谱法进行测定。

### 1.7 实时定量PCR检测ABCA1和ABCG1的mRNA表达

用Trizol试剂提取总RNA,逆转录成cDNA。实时定量PCR在应用生物系统7900HT上进行,扩增试剂盒为DyNAmoTMSYBR<sup>®</sup> Green qPCR Kits。溶解曲线分析表明PCR反应产物为单独的双链DNA。以GAPDH表达为内参,用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值法定量ABCA1和ABCG1的表达。ABCA1引物序列:上游5'-GAT TGG CTT CAG GAT GTC CAT GTT GGA A-3',下游5'-GTA TTT TTG CAA GCA GTT ACA TTT GAC AA-3'。ABCG1引物序列:上游5'-CCT ACC ACA ACC CAG CAG ACT-3',下游5'-CCG AGA AGC TAT GGC AAC CT-3'。GAPDH引物序列:上游5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'。

### 1.8 Western blot检测ABCA1和ABCG1的蛋白表达

细胞经PBS洗涤后于悬浮缓冲液中裂解,4°C、10000 g离心10 min,小心吸出上清液,用BCA法进行蛋白定量。10% SDS-PAGE电泳(积层胶80 V,分离胶120 V)后电转移(60 mA,2 h)至PVDF膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5%脱脂牛奶室温封闭4 h,加入一抗4°C孵育过夜,TBST洗涤30 min,每10 min换液1次。加入1:1000辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育2 h,TBST洗涤30 min,每10 min换液1次。用Western blot荧光检测试剂盒显示于X光片。用凝胶图像分析系统对胶片扫描,以对照组的面积灰度值为100%与实验组进行比较和半定量分析。

### 1.9 统计学方法

在SAS统计分析软件上分析各组数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据数据特征作方差分析和 $u$ 检验及 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 不同来源细胞与不同血清对细胞内脂质蓄积的影响

油红O染色显示,无论是正常人群来源细胞还是冠心病来源细胞,高脂血清与正常血清比较细胞

内脂质蓄积更加明显。而无论是高脂血清还是正常血清,正常人群来源细胞内脂质蓄积要少于冠心

病来源细胞(图 1)。高效液相色谱法检测的结果进一步证实了上述结果(表 1)。

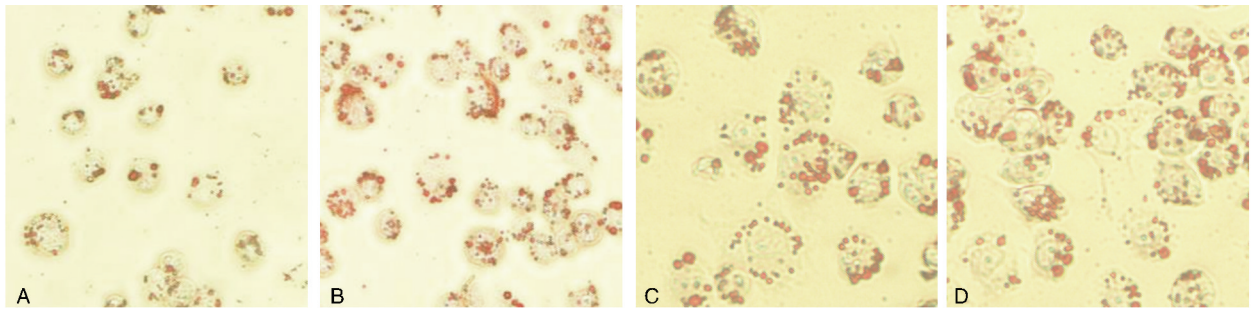


图 1. 油红 O 染色检测细胞内脂质蓄积 红色颗粒表示与油红 O 结合的脂质。A 为对照组 + 正常血清, B 为对照组 + 高脂血清, C 为试验组 + 正常血清, D 为试验组 + 高脂血清。

Figure 1. The accumulation of intracellular lipid was detected with oil red O stain

表 1. 巨噬细胞内胆固醇含量( $\bar{x} \pm s$ , mg/g,  $n=3$ )

Table 1. The content of cholesterol in macrophages

指 标	对照组 + 正常血清	对照组 + 高脂血清	试验组 + 正常血清	试验组 + 高脂血清
TC	290 ± 24	392 ± 37 <sup>a</sup>	408 ± 34 <sup>a</sup>	522 ± 38 <sup>bc</sup>
FC	103 ± 15	121 ± 23 <sup>a</sup>	125 ± 21 <sup>a</sup>	156 ± 33 <sup>bc</sup>
CE	164 ± 12	240 ± 23 <sup>a</sup>	256 ± 17 <sup>a</sup>	341 ± 26 <sup>bc</sup>
CE/TC	56.6%	61.2%	62.7%	65.3%

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组 + 正常血清组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与对照组 + 高脂血清组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与试验组 + 正常血清比较。

## 2.2 不同来源细胞与不同血清对细胞内胆固醇流出的影响

高脂血清培养的细胞与正常血清培养的细胞比较细胞内胆固醇流出能力明显要弱( $P < 0.05$ )。而冠心病患者来源细胞与正常人群来源细胞比较胆固醇流出能力也明显减弱( $P < 0.05$ ; 图 2)。

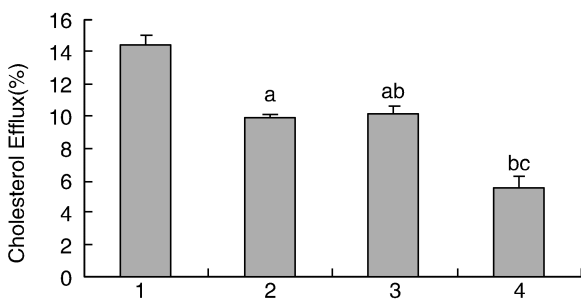


图 2. 不同来源细胞与不同血清对细胞内胆固醇流出的影响 1 为对照组 + 正常血清, 2 为对照组 + 高脂血清, 3 为试验组 + 正常血清, 4 为试验组 + 高脂血清。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组 + 正常血清组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与对照组 + 高脂血清组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与试验组 + 正常血清比较。

Figure 2. The effect of different kinds of cells and sera on the intracellular cholesterol efflux

## 2.3 不同来源细胞与不同血清对 ABCA1 和 ABCG1 表达的影响

参与介导细胞内胆固醇流出的基因 ABCA1 在正常个体巨噬细胞中的表达比冠心病患者中的表达略低, ABCG1 在两者中的表达相当。而不同来源血清对 ABCA1 和 ABCG1 的表达没有明显影响(图 3)。

## 3 讨 论

动脉粥样硬化形成的启动首先是循环中的单核细胞进入血管内皮下间隙并分化为巨噬细胞。当修饰型 LDL(如氧化 LDL 或糖基化 LDL)存在时,巨噬细胞摄取修饰型 LDL 后因缺乏负反馈调节而使脂质在细胞内蓄积,并最终形成泡沫细胞。刺激动脉壁中巨噬细胞胆固醇流出能够抑制泡沫细胞的形成,从而阻止动脉粥样硬化的发生。

本研究以血清作为胆固醇接受体,观察体外培养的冠心病患者单核巨噬细胞胆固醇流出潜能是否受损。我们发现无论是以正常个体来源血清或患者自身高脂血清作为胆固醇的接受体时,冠心病患者巨噬细胞内胆固醇蓄积明显比对照组要多,可能是冠心病患者长期高脂负荷下,巨噬细胞摄取脂质的能量发生了适应性上调。在巨噬细胞胆固醇流出测定中,在以患者自身高脂血清作为胆固醇的接受体时,无论是正常个体还是冠心病患者巨噬细胞胆固醇流出率低于正常血清组。上述结果显示冠心病患者与正常个体比较,巨噬细胞在胆固醇代谢方面发生了一定转变,但在胆固醇流出能力方面并无下降,导致患者巨噬细胞胆固醇流出下降的原因是血清因素,推测主要与冠心病患者 HDL 的功能



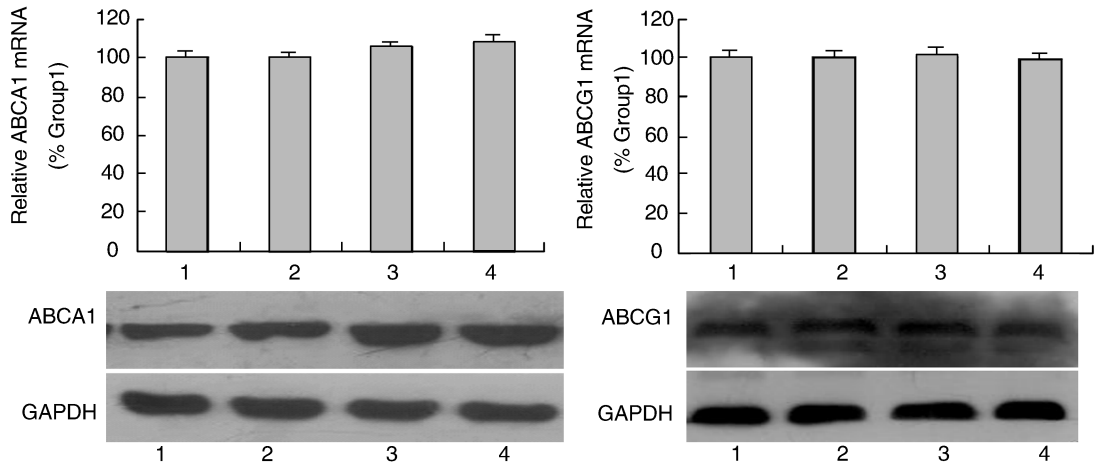


图3. 冠心病患者和正常个体巨噬细胞中 ABCA1 和 ABCG1 的表达 1 为对照组 + 正常血清, 2 为对照组 + 高脂血清, 3 为试验组 + 正常血清, 4 为试验组 + 高脂血清。

Figure 3. The expression of ABCA1 and ABCG1 in macrophages derived from coronary heart disease patients and healthy individuals

改变有关。与我们的研究类似,在一组低高密度脂蛋白血症的日本患者的研究中,巨噬细胞胆固醇流出能力下降与血清有关而与巨噬细胞本身胆固醇流出能力无关<sup>[7]</sup>。

以往曾认为细胞内胆固醇流出是一个被动的液相扩散过程,近年来的研究发现胆固醇流出是一个复杂的受到高度调控的过程。ABCA1 和 ABCG1 受体可能在巨噬细胞胆固醇流出中起重要作用<sup>[8,9]</sup>,而且二者还有协同作用<sup>[10]</sup>。已有研究发现,ABCA1 基因突变可引起 Tangier 病<sup>[11]</sup>,其纯合子患者巨噬细胞胆固醇和磷脂的流出几乎完全丧失<sup>[12]</sup>。另一研究发现,ABCA1 突变的患者颈动脉厚度与细胞胆固醇流出呈负相关<sup>[13]</sup>。但对大部分冠心病患者而言,并不存在细胞 ABCA1 或 ABCG1 功能缺陷。此时,作为胆固醇的接受体,HDL(包括贫脂的载脂蛋白 A1)的数量和功能是决定胆固醇流出的主要因素。然而,考虑到 HDL 在大小、电荷和蛋白组成的差异及其结构和功能的动态变化,测量静态的高密度脂蛋白胆固醇水平不能很好地反映高密度脂蛋白的功能与活性<sup>[14]</sup>。本研究中,巨噬细胞胆固醇转运能力和总血清 HDL 水平无明显相关。冠心病患者胆固醇流出能力受损值得继续深入探讨,可能与脂蛋白亚类分布有关。已有报道发现巨噬细胞胆固醇转运能力与小浓度的小 HDL 和 LDL 微粒呈正相关,与总血清 HDL 和 LDL 胆固醇无关<sup>[15]</sup>。

本研究也有一定的局限性。第一,从体外培养分化的巨噬细胞及泡沫细胞与动脉内膜特定微环境下的那些巨噬细胞有较大差异,其胆固醇转移与

体内巨噬细胞胆固醇流出的能力可能不一致。第二,虽然小规模研究数据显示研究对象巨噬细胞胆固醇流出有差异,但是必须经过大量重复试验证明巨噬细胞流出能力与冠心病发病之间的因果联系。

本研究通过对冠心病患者巨噬细胞胆固醇流出和 LXR $\alpha$  及其下游的一些目的基因表达水平的研究,发现冠心病患者巨噬细胞、其一些影响胆固醇代谢及炎症反应的基因表达受到了影响,胆固醇的流出能力下调,对刺激 LXR 后的反应性也是降低的,这可能是冠心病的结局,也可能是巨噬细胞的这种功能障碍是冠心病发病的原因。

#### [参考文献]

- [1] Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice[J]. *Circ J*, 2010, 74 (2): 213-220.
- [2] Brufau G, Groen AK, Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (8): 1 726-733.
- [3] van der Velde AE. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16 (47): 5 908-915.
- [4] 吴满平. ATP 结合盒转运体 A1 介导细胞胆固醇流出及新生盘状高密度脂蛋白形成机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (3): 244-246.
- [5] Olchawa B, Kingwell B A, Hoang A, et al. Physical fitness and reverse cholesterol transport [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 1 087-091.

(下转第 476 页)