

褪黑素缺乏对去松果体大鼠巨噬细胞胆固醇外流功能的影响

王雨¹, 刘晓燕², 陈连凤¹, 王伟¹, 宋玮¹, 方全¹, 严晓伟¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院心内科, 北京市 100730; 2. 北京中医药大学基础医学院, 北京市 100029)

[关键词] 褪黑素; 脂代谢; 胆固醇逆转运; 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1

[摘要] **目的** 建立去松果体致褪黑素缺乏大鼠模型, 观察大鼠血糖、血脂代谢, 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 (ABCA1) 的表达及其介导的胆固醇外流的变化。**方法** 雄性 Wistar 大鼠行松果体摘除术, 分为去松果体组 ($n=16$) 和假手术组 ($n=14$)。收集术前 0 周和术后 12 周的血清, 测量血脂、血糖相关指标变化。收集腹腔巨噬细胞体外培养, 检测巨噬细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达, 并测定其胆固醇外流率的变化。**结果** 术后 12 周去松果体组大鼠体重、血清甘油三酯、极低密度脂蛋白胆固醇、游离脂肪酸及血糖水平与假手术组相比显著增高, 胰岛素敏感指数显著降低 ($P<0.05$)。12 周去松果体组巨噬细胞 ABCA1 mRNA 表达与假手术组相比显著降低 ($P<0.01$), 其全血清和载脂蛋白 A1 诱导的胆固醇外流率的变化值与假手术组相比显著下降 ($P<0.01$)。**结论** 褪黑素缺乏可致大鼠血糖、血脂代谢异常, 巨噬细胞 ABCA1 介导的胆固醇外流能力显著下降。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Melatonin Deficiency on Macrophage Cholesterol Efflux in Pinealectomized Rats

WANG Yu¹, LIU Xiao-Yan², CHEN Lian-Feng¹, WANG Wei¹, SONG Wei¹, FANG Quan¹, and YAN Xiao-Wei¹

(1. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College & Department of Cardiology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China; 2. College of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Melatonin; Lipid Metabolism; Reverse Cholesterol Transport; ATP-Binding Cassette Transporter A1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of melatonin deficiency on macrophage cholesterol efflux and the risk of atherosclerosis in pinealectomized rats. **Methods** Melatonin deficiency rats ($n=16$) were created by pinealectomy (Px), and compared with sham-operated rats ($n=14$). Blood was drawn at the 0th week and the 12th week after surgery to measure serum lipids, glucose and insulin levels. Macrophages were collected at the 0th and 12th weeks to measure cholesterol efflux rate and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression. **Results** At the 12th week after surgery, the body weight, serum triglyceride (TG), very low density lipoprotein cholesterol (VLDLC), free fatty acids (FFA) and glucose levels were prominently changed in Px rats compared to those in sham-operated rats at the 12th week ($P<0.05$). The ABCA1 mRNA expression was significantly decreased in Px group compared to sham-operated group ($P<0.01$). The differences of serum-induced and apolipoprotein A1-induced cholesterol efflux rates between 0th and 12th weeks in Px group were both significantly lowered compared to those in sham-operated group ($P<0.01$). **Conclusions** Melatonin deficiency promotes the metabolism abnormality of blood lipids and glucose, and attenuates ABCA1-mediated cholesterol efflux.

褪黑素是一种主要由松果体分泌的激素, 既往发现其具有调节动物胆固醇代谢作用^[1]。胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 是由高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 将组织中的胆固醇转运至肝脏后排出体外的过程, 从而抑制或

延缓动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生。胆固醇外流是其中最初的关键步骤, 是将细胞内游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 等转运到胞外新生 HDL 颗粒的过程^[2]。三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 在此过

[收稿日期] 2012-10-09

[作者简介] 王雨, 博士研究生, E-mail 为 andy00120@gmail.com。通讯作者严晓伟, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂代谢, E-mail 为 xswy_pumc@yahoo.com.cn。

程中起重要作用^[3]。褪黑素能否通过影响机体胆固醇的外流从而影响 As 的发生过程,目前尚无报道。本研究建立了去松果体致褪黑素缺乏的大鼠模型,探讨褪黑素缺乏环境下大鼠血脂、血糖代谢的改变,巨噬细胞 ABCA1 表达及其介导的细胞内胆固醇外流功能的变化。

1 材料和方法

1.1 去松果体动物模型的建立

Wistar 雄性大鼠 36 只,10 周龄,220~230 g,饲养于协和医院动物中心。随机分为去松果体组 18 只和假手术组 18 只。术前于夜间经眶静脉采血 0.5 mL 测褪黑素基础值。去松果体手术主要步骤:腹腔麻醉大鼠,头部固定后消毒皮肤,在颅顶上纵向切开,暴露颅骨。用齿科牙钻在矢状缝和人字缝交汇处钻开颅骨,形成并移除 0.5 cm×0.5 cm 矩形骨瓣。剪开硬脑膜,用眼科线分别结扎上矢状窦的前、后端并切断。暴露松果体后用眼科镊夹住基底部并摘除,明胶海绵压迫止血,放回骨瓣,缝合皮肤。假手术组除不摘除松果体外,其余步骤与上述相同。术后单笼饲养至恢复后采血测量夜间褪黑素水平。

1.2 血清生化指标测定

术前(0 周)和术后第 12 周禁食 10 h 后称重,内眦静脉采血 2 mL,分离血清。血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、游离脂肪酸(free fatty acide, FFA)和血糖均由协和医院检验科 7600 全自动生化分析仪检测。血清褪黑素用大鼠褪黑素 ELISA 试剂盒(Rapidio 公司)检测。血清胰岛素用大鼠胰岛素放射免疫试剂盒(北京华英生物技术研究)检测。采用公式计算血清极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、非 HDLC(NonHDLc)水平及胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)。

1.3 腹腔巨噬细胞的分离与培养

分别于 0 周和 12 周腹腔注射麻醉大鼠,浸入 75% 乙醇数秒后置于无菌操作台,从侧腹部注入 8 mL D-Hanks 液及 2 mL 空气,反复轻揉腹部 1 min。用眼科镊提起下腹皮肤,剪 1~2 mm 小口,用吸管将腹腔内液体吸出,用同样方法再冲洗腹腔 2 次,合并 3 次腹腔冲洗液,1000 r/min 离心 10 min。收集腹腔巨噬细胞于培养皿中,加入含 10% 胎牛血清的

RPMI1640 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养,细胞贴壁后每 48 h 换液一次。

1.4 巨噬细胞胆固醇外流率的测定

调整 24 孔板内巨噬细胞至每孔 2.0×10⁴ 个,用无血清培养基同步化 6 h。加入 1.0 mCi/L 的³H-胆固醇孵育液,37℃ 孵育 24 h 后弃去并清洗细胞。加入 4 种诱导流出液:阴性对照、全血清诱导、标准载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 诱导和标准 HDL 诱导流出液。诱导完成后收集液体,离心取上清为细胞外流液。细胞清洗后加入 0.5% Triton-X100,振荡 1 h 后收集细胞裂解液。分别将两种液体与闪烁液混合,充分混匀后液闪计数。所有样品计数值均减去对应的阴性对照值,并计算外流率:³H-胆固醇外流率=细胞外流液计数值/(细胞外流液计数值+细胞裂解液计数值)×100%。

1.5 巨噬细胞 ABCA1 实时荧光定量 PCR 检测

提取巨噬细胞总 RNA,逆转录得到 cDNA。PCR 引物用 Primer 5.0 软件设计。ABCA1 基因上游引物 5'-ACT CCT CAA TGC TCT AAC C-3',下游引物 5'-GTT CTT CAT CGT CCA GTT C-3';内参基因 GAPDH 上游引物 5'-CAC GGC AAG TTC AAC GGC ACA GT-3',下游引物 5'-AGC GGA AGG GGC GGA GAT GAT-3'。在 ABI7500 real-time PCR 仪上进行,通过各孔样品的 Ct 值计算样品 mRNA 的相对表达量。

1.6 巨噬细胞 ABCA1 蛋白免疫印迹检测

提取巨噬细胞胞浆蛋白,BCA 定量后取 40 μg 样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离和转膜,用含 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 60 min,加入 ABCA1 和 β-actin 的一抗(稀释比 1:1000),4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 15 min×3 次后,加入 1:2500 稀释的相应二抗室温孵育 60 min,再次用 TBST 洗膜 15 min×3 次,ECL 发光试剂盒显色,X 光片感光显影,以 Quantity One 4.0 图像分析软件进行灰度分析。

1.7 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。两组间差异的比较采用独立样本 t 检验,两组间干预前后变化值差异的比较用协方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去松果体手术前后褪黑素水平比较

实验结束时共有 4 只大鼠死亡,其中去松果体组有 2 只大鼠死于手术,假手术组 2 只大鼠死于采血。去松果体组共 16 只、假手术组共 14 只大鼠最

终进入统计分析。手术前后测量夜间褪黑素水平,去松果体组夜间褪黑素水平减少至术前的 20%,且显著低于假手术组 ($P < 0.01$),表明褪黑素缺乏模型制作成功(表 1)。

2.2 去松果体对大鼠体重、血脂和血糖的影响

两组动物体重和血清指标的基线水平一致。术后第 12 周,去松果体组大鼠的体重、血清 TG、VLDLC 及 FFA 与假手术组相比显著增加 ($P < 0.05$),血清 TC、HDLC 和 LDLC 与假手术组相比无显著差异(表 2);去松果体组大鼠的血糖水平与假

手术组相比显著增加,ISI 显著降低 ($P < 0.05$),但胰岛素水平的增高无显著意义(表 3)。

表 1. 手术前后大鼠夜间血清褪黑素水平 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)
Table 1. Serum melatonin levels in rats before and after surgery at night

分 组	手术前	手术后
去松果体组($n = 16$)	40.38 \pm 7.32	8.19 \pm 2.05 ^a
假手术组($n = 14$)	40.34 \pm 6.93	42.96 \pm 7.62

a 为 $P < 0.01$,与术前去松果体组、术后假手术组比较。

表 2. 0 周和 12 周大鼠体重和血脂水平 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2. Body weight and serum lipid levels in rats at the 0th and 12th weeks

指 标	0 周		12 周	
	去松果体组($n = 16$)	假手术组($n = 14$)	去松果体组($n = 16$)	假手术组($n = 14$)
体重(g)	233.56 \pm 35.46	231.75 \pm 37.72	498.25 \pm 77.81 ^a	434.69 \pm 57.95
TG(mmol/L)	0.38 \pm 0.16	0.39 \pm 0.13	0.67 \pm 0.25 ^a	0.45 \pm 0.31
TC(mmol/L)	1.73 \pm 0.28	1.73 \pm 0.25	1.88 \pm 0.57	1.62 \pm 0.44
HDL(mmol/L)	0.53 \pm 0.04	0.54 \pm 0.04	0.58 \pm 0.23	0.45 \pm 0.14
LDL(mmol/L)	0.21 \pm 0.10	0.21 \pm 0.06	0.28 \pm 0.09	0.32 \pm 0.12
FFA(μ mol/L)	664.50 \pm 197.74	664.93 \pm 194.56	1244.33 \pm 374.64 ^b	668.00 \pm 319.78
NonHDL(mmol/L)	1.20 \pm 0.26	1.20 \pm 0.23	1.31 \pm 0.36	1.17 \pm 0.34
VLDL(mmol/L)	0.17 \pm 0.07	0.17 \pm 0.06	0.30 \pm 0.11 ^a	0.20 \pm 0.14

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与假手术组 12 周时比较。

表 3. 0 周和 12 周大鼠血糖、胰岛素水平及胰岛素敏感指数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Serum glucose, insulin and ISI in rats at the 0th and 12th weeks

指 标	0 周		12 周	
	去松果体组($n = 8$)	假手术组($n = 8$)	去松果体组($n = 8$)	假手术组($n = 8$)
血糖(mmol/L)	8.46 \pm 1.88	8.32 \pm 1.28	13.56 \pm 2.93 ^a	9.06 \pm 3.24
胰岛素(U/L)	17.01 \pm 1.63	16.56 \pm 0.68	17.30 \pm 1.80	15.58 \pm 1.61
ISI	-4.94 \pm 0.23	-4.92 \pm 0.16	-5.17 \pm 0.39 ^a	-4.91 \pm 0.40

a 为 $P < 0.05$,与假手术组 12 周时比较。

2.3 去松果体对大鼠腹腔巨噬细胞胆固醇外流率的影响

两组动物腹腔巨噬细胞胆固醇外流率的基线值基本一致。去松果体组 12 周巨噬细胞胆固醇外流率与假手术组相比略有下降,但全血清诱导的胆固醇外流率、ApoA1 诱导的胆固醇外流率及 HDL 诱导的胆固醇外流率在两组间的差异均无显著意义(表 4)。而在校

正了 0 周基线水平后,去松果体组 12 周全血清诱导的胆固醇外流率(-7.29% \pm 5.91% 和 -3.80% \pm 4.79%, $P < 0.01$)以及 ApoA1 诱导的胆固醇外流率相对 0 周的变化值(-4.21% \pm 4.82% 和 -1.20% \pm 2.12%, $P < 0.01$)与假手术组相比均显著下降,但 HDL 诱导的胆固醇外流率的变化值在两组间仍无显著差异(-0.31% \pm 1.33% 和 -0.30% \pm 1.43%)。

表 4. 0 周和 12 周大鼠腹腔巨噬细胞胆固醇外流率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4. Cholesterol efflux rates of the peritoneal macrophages in rats at the 0th and 12th weeks

胆固醇外流率(%)	0 周		12 周	
	去松果体组($n = 6$)	假手术组($n = 6$)	去松果体组($n = 6$)	假手术组($n = 6$)
全血清诱导	38.10 \pm 2.75	38.41 \pm 4.81	30.80 \pm 4.42	34.57 \pm 3.64
ApoA1 诱导	17.31 \pm 2.44	17.50 \pm 2.19	13.11 \pm 4.60	6.26 \pm 3.61
HDL 诱导	12.28 \pm 2.75	12.60 \pm 2.82	11.93 \pm 2.82	12.30 \pm 2.66

2.4 去松果体对大鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达的影响

去松果体组 12 周巨噬细胞 ABCA1 mRNA 的表

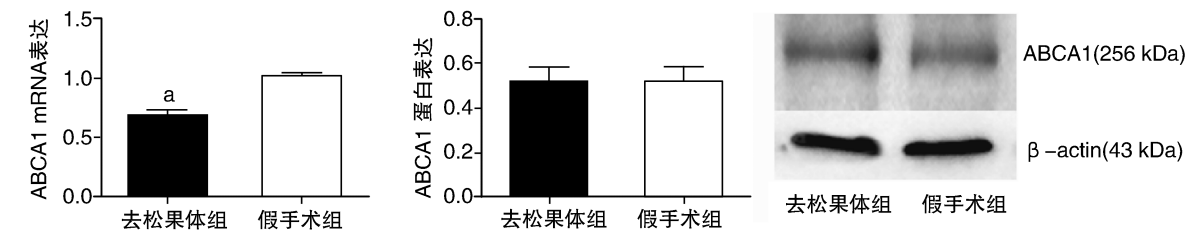


图 1. 12 周大鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白的表达 (n=6) a 为 $P<0.01$, 与假手术组相比。

Figure 1. mRNA and protein expression of ABCA1 on the peritoneal macrophages in rats at the 12th week

3 讨论

本研究建立了去松果体致褪黑素缺乏大鼠的实验动物模型,首次从褪黑素缺乏的角度探讨了褪黑素与血脂、血糖代谢水平等动脉粥样硬化危险因素及细胞胆固醇外流的关系。

本研究发现,褪黑素缺乏使大鼠血清 TG、VLDL-C 和 FFA 水平显著升高。提示褪黑素可能主要通过影响体内 TG 的代谢,造成相应组分的脂代谢异常。早期研究^[4]表明,机体在高 TG 血症状态下,其富含 TG 的脂蛋白(主要为 VLDL)在外周酶类的作用下形成富含胆固醇酯的 VLDL 残基,表现为 VLDL-C 增高。FFA 为富含 TG 的脂蛋白水解后的终产物。研究发现,其水平的显著增高与体内氧化应激和胰岛素抵抗的增高有关^[5]。术后 12 周去松果体组大鼠血糖及 ISI 显著升高。以往 Peschke 等^[6]的研究证实褪黑素水平的降低与 2 型糖尿病的发生密切相关,本研究中去松果体组糖代谢指标的变化也表明褪黑素水平降低具有促胰岛素抵抗的作用,这与 TG 代谢的变化密切相关。上述结果表明,褪黑素缺乏导致大鼠血糖、血脂代谢显著异常。

RCT 是机体抗 As 的主要机制,其中介导胆固醇从巨噬细胞转运至细胞外的主要受体之一为 ABCA1^[7]。研究表明,ABCA1 与乏脂 ApoA1 结合促进 FC 流出形成前 β -HDL 颗粒,最终形成成熟 α -HDL 并参与 RCT 的后续步骤^[8]。故巨噬细胞胆固醇外流的变化对促进或抑制 As 病变有重要意义。我们首次探讨了褪黑素缺乏大鼠巨噬细胞 ABCA1 的表达及其功能的变化,发现去松果体组 ABCA1 转录水平的表达显著下调,且 ApoA1 诱导胆固醇外流率的

达与假手术组相比显著下降 ($P<0.01$),但去松果体组 ABCA1 蛋白的表达与假手术组相比无显著性差异(图 1)。

变化值显著下降,表明去松果体组 ABCA1 介导胆固醇外流功能已显著异常。然而,去松果体组 ABCA1 蛋白水平表达无显著变化,表明体内褪黑素缺乏可能仅影响 ABCA1 蛋白的功能。这可能与动物实验时间较短,干预因素较为单一有关。

综上所述,褪黑素缺乏可导致大鼠血糖、血脂代谢异常,ABCA1 介导的巨噬细胞胆固醇外流功能下降。

[参考文献]

- [1] Hussain SA. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats [J]. J Pineal Res, 2007, 42 (3): 267-271.
- [2] Luo DX, Cao DL, Xiong Y, et al. A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31 (10): 1 243-257.
- [3] 徐萍,陈连凤,王晋峰. 脂联素对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达及细胞内胆固醇含量的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (6): 427-430.
- [4] Whitman SC, Miller DB, Wolfe BM, et al. Uptake of type III hypertriglyceridemic VLDL by macrophages is enhanced by oxidation, especially after remnant formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17 (9): 1 707-715.
- [5] Blachnio-Zabielska A, Zabielski P, Baranowski M, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and elevation of plasma FFA on ceramide metabolism in rat skeletal muscle [J]. Horm Metab Res, 2010, 42 (1): 1-7.
- [6] Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, et al. Melatonin and type 2 diabetes—a possible link [J]? J Pineal Res, 2007, 42 (4): 350-358.
- [7] Kasza I, Hegyi Z, Szabo K, et al. Model system for the analysis of cell surface expression of human ABCA1 [J]. BMC Cell Biol, 2009, 10: 93.
- [8] Okuhira K. Regulatory factors for ABCA1 activity of HDL generation [J]. Seikagaku, 2012, 84 (4): 285-290.

(此文编辑 文玉珊)