

脂多糖通过上调 SSAO 活性抑制泡沫细胞 ABCA1 表达和促进细胞内脂质蓄积

曹冬黎, 王立金, 邓云

(安徽理工大学医学院, 安徽省淮南市 232001)

[关键词] 脂多糖; 氨基胍敏感性胺氧化酶; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 脂质蓄积

[摘要] **目的** 探讨脂多糖(LPS)是否通过调节氨基胍敏感性胺氧化酶(SSAO)活性改变血管平滑肌细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)蛋白质的表达和脂质蓄积。**方法** 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)孵育小鼠主动脉平滑肌原代细胞使其泡沫化,不同浓度 LPS 和 SSAO 抑制剂氨基胍(SEM)处理细胞 6 h 后,高效液相色谱分析细胞 SSAO 活性、总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量,葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法检测培养基葡萄糖含量,荧光分光光度计检测过氧化氢(H_2O_2)含量,液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出,Western blot 检测 ABCA1 蛋白质表达的变化。**结果** LPS 增加泡沫细胞 SSAO 活性,促进葡萄糖消耗,增加 H_2O_2 生成,SEM 作用后完全抑制此作用;LPS 抑制细胞 ABCA1 蛋白质的表达,细胞内胆固醇流出减少,细胞总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯增加;SEM 作用后部分抑制 LPS 的这种作用。**结论** LPS 下调 ABCA1 蛋白质表达而促进细胞内脂质蓄积与 SSAO 活性增加相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Lipopolysaccharide Inhibits Foam Cell ABCA1 Expression and Promotes Intracellular Lipid Accumulation by Up-regulating SSAO Activity

CAO Dong-Li, WANG Li-Jin, and DENG Yun

(School of Medicine, Anhui University of Science & Technology, Huainan, Anhui 232001, China)

[KEY WORDS] Lipopolysaccharide; Semicarbazide-sensitive Amine Oxidase; ATP-binding Cassette Transporter A1; Lipid Accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the protein expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and the accumulation of lipid could be regulated by the activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) in vascular smooth muscle cells (VSMC) derived foam cells treated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Vascular smooth muscle cells derived foam cells were exposed to different concentration of LPS along or together with SSAO inhibitor semicarbazide (SEM) for 6 hours. The activity of SSAO and the cellular lipid accumulation were determined by high-performance liquid chromatography analysis. The concentration of glucose in the samples was determined in a glucose oxidase-peroxidase method. Fluorospectrophotometer was used to determine the intracellular or medium H_2O_2 levels. Cholesterol efflux was determined by FJ-2107P type liquid scintillator. Western blot was used to determine the protein levels of ABCA1. **Results** The activity of SSAO, glucose consumption, H_2O_2 production were increased after treated with LPS and these changes can be reversed by SEM completely. The cellular lipid accumulation was increased, while the cellular cholesterol efflux and the protein expression of ABCA1 were decreased in vascular smooth muscle cells derived foam cells but these changes can be reversed by SEM partly. **Conclusion** LPS can down-regulate the protein expression of ABCA1 and promote the cellular lipid accumulation by up-regulating the activity of SSAO partly in vascular smooth muscle cells derived foam cells.

[收稿日期] 2016-01-07

[修回日期] 2016-04-20

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(KJ2013Z069)

[作者简介] 曹冬黎, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发生机制, E-mail 为 pearina123@163.com。王立金, 硕士, 教授, 研究方向为多器官功能不全综合征的发生机制, E-mail 为 244078245@qq.com。邓云, 博士, 教授, 研究方向为中药在心脑血管疾病防治中的机制, E-mail 为 yunfree196@yeah.net。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等心血管并发症是常见的代谢性疾病—糖尿病患者致残率、病死率增高的主要原因。氨基脒敏感性胺氧化酶 (semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO) 在糖尿病患者血液中的活性显著增加^[1-2]。相对于无糖尿病合并症的患者,伴有 As 的糖尿病患者表现出更高的 SSAO 活性^[3]。SSAO 介导细胞毒性代谢产物如甲醛、丙酮醛等毒性醛、H₂O₂ 和氨的大量产生,促进氧化应激的发生,损伤血管内皮,与糖尿病心血管并发症密切相关^[4]。氨基脒 (semicarbazide, SEM)、氨基胍和 2-溴乙胺等均为 SSAO 的抑制剂。临床上,糖尿病患者易罹患感染,而多种病原微生物尤其是革兰氏阴性菌的感染也可促进 As 的发生发展。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,具有多方面的致 As 的作用^[5]。LPS 介导巨噬细胞源性泡沫细胞形成,促进粥样斑块产生^[6],但其促进泡沫细胞形成的机制尚不完全明确。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 调控胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT),任何 ABCA1 的缺陷或损伤都会阻碍胆固醇的流出^[7]。研究证实,LPS 下调 RAW 细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白质的表达^[8]。那么,LPS 是否通过升高 SSAO 活性导致细胞毒性代谢产物和氧化应激的增加而影响 ABCA1 的功能,进而促进 As 的发生呢? 因此,本研究以小鼠主动脉平滑肌细胞 (smooth muscle cells, SMC) 源性泡沫细胞为观察对象,探讨 LPS 作用下,SSAO 活性改变对泡沫细胞 ABCA1 表达和细胞内脂质蓄积的影响,进一步探讨 LPS 对 As 斑块形成的可能机制,寻找相关的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

8~10 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购自中科院上海斯莱克动物中心;DMEM 培养基干粉和胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司;LPS、SEM 购自美国 Sigma 公司;蛋白 Marker 购自美国 Bio-Rad 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;ABCA1 兔抗人一抗购自美国 Novus 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司;鼠抗 GAPDH 购自 Santa Cruz 公司;Western blot 荧光检测试剂盒购自北京中杉金桥公司;MTT、BCA 蛋白含量测定试剂、DCFH-DA 购自碧云天生物技术研究所;Triton-X100 购自 Amresco 公司,上海生工分装;葡萄糖测试盒购

自南京建成生物工程研究所;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 小鼠主动脉平滑肌原代细胞培养

C57BL/6J 小鼠颈椎脱臼致死,无菌条件下取出并分离主动脉中膜层,眼科剪剪碎,2 g/L 胶原酶消化 1 h,加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素) 中,37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养 3 天,获得小鼠主动脉血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC)。使用分离培养的第 3~8 代 VSMC,待细胞生长至 85% 汇合时更换无血清培养液培养细胞 24 h,再用含有 50 mg/L ox-LDL 无血清培养液继续培养 48 h,高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测细胞内总胆固醇和胆固醇酯含量,当胆固醇酯占总胆固醇 50% 以上即获得小鼠 VSMC 源性泡沫细胞,然后加入不同处理因素并用 MTT 比色法检测细胞活性。

1.3 HPLC 检测细胞 SSAO 活性

根据文献[9],收集细胞,PBS 洗 3 次,最后一次 PBS 洗涤液作为空白对照;超声细胞破碎仪破碎细胞,取 200 μ L 细胞悬液,加入 20 μ L 氯吉灵 (1 mmol/L) 室温孵育 30 min 以确保单胺氧化酶活性被完全抑制;加入 180 μ L 苯甲胺 (1 mmol/L),37℃ 水浴 30 min,加入 100 μ L 三氯乙酸 (20%, w/v) 终止反应,12000 r/min 离心 8 min;取 300 μ L 上清液于 5 mL 玻璃离心管,加入 50 μ L 2,4-二硝基苯肼 (3 g/L),40℃ 水浴 15 min;衍生化后的产物用乙酸乙酯萃取两次,每次 1 mL,45℃ 下 N₂ 吹干,干燥产物用 500 μ L 乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (50:50, v/v) 溶解,用于 HPLC 分析;采用 HP1100 HPLC 系统用于测定苯甲醛衍生物,色谱分离柱为 Agilent Zorbax SB-C18,柱温 45℃,流速为 1 mL/min,检测波长为 382 nm。

1.4 葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法测定培养基葡萄糖含量

实验前将试剂 1 (酶试剂:葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、4-氨基安替吡啉、磷酸盐缓冲液) 和试剂 2 (酚试剂:苯酚、磷酸盐缓冲液) 等体积混合;10 μ L 样品或标准品 (5.55 mmol/L) 加入 1 mL 混合试剂,混匀,37℃ 水浴 15 min,10 μ L 蒸馏水作为空白管;以空白管调零,505 nm 处测定各管吸光值,计算葡萄糖浓度。

1.5 荧光分光光度计检测 H₂O₂ 水平

将小鼠原代 VSMC 接种于 24 孔板,每孔 2×10^6

个细胞;加入 ox-LDL 无血清培养液获得 VSMC 源性泡沫细胞后,弃去培养液,PBS 洗 3 次;加入各处理因素,同时加入 DCFH-DA 作为检测 H_2O_2 的探针^[10],使每孔终浓度为 $15\ \mu\text{mol/L}$, 37°C 孵育 1 h,收集培养基上清;细胞经 PBS 洗 3 次; 0.1% v/v Triton-X100 裂解 10 min;荧光分光光度计(激发波长 $485\ \text{nm}$,发射波长 $530\ \text{nm}$)分别检测上清及细胞裂解液的荧光强度。结果以处理组/阴性对照表示。

1.6 Western blot 检测蛋白质表达

收集细胞,经 PBS 洗涤 3 次,裂解细胞, 4°C 、 $10000\times g$ 离心,取上清液,以 BCA 法进行蛋白定量检测。蛋白质样品($20\ \mu\text{g}$ 总蛋白量/泳道)加入适量 $10\%\beta$ -巯基乙醇和 $5\times\text{SDS}$ 上样缓冲液, 100°C 煮沸 10 min, 6% 或 $10\%\text{SDS-PAGE}$ 电泳(积层胶 $80\ \text{V}$,分离胶 $120\ \text{V}$)后电转移($100\ \text{mA}$,1 h)至 PVDF 膜上。 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,分别加入 $1:500$ ABCA1 一抗或者 $1:2000$ GADPH 一抗, 4°C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 $1:1000$ 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。Western blot 荧光检测试剂盒显示于 X 光片。Labwork 凝胶图像分析系统对胶片进行灰度值扫描,做半定量分析。

1.7 ^3H -胆固醇标记法检测细胞内胆固醇流出

参照文献[11],用 $0.2\ \text{mCi/L}$ ^3H -胆固醇在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中共同孵育细胞,待细胞长至 85% 时,置含脂蛋白的无血清 DMEM 培养液中培养 24 h。PBS 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的 ^3H -胆固醇,并计算胆固醇流出率。

1.8 HPLC 检测细胞总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量

参照文献[12]方法,收集细胞,PBS 洗 3 次,加入 $200\ \mu\text{L}$ 细胞裂解液,反复冻融 3 次裂解细胞,加入 7.2% 三氯乙酸, $800\times g$ 离心 10 min。取 $100\ \mu\text{L}$ 上清液,加入 $200\ \mu\text{L}$ 氢氧化钾溶液($8.9\ \text{mol/L}$),水解胆固醇酯为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液(豆甾醇)混匀,以正己烷和无水乙醇抽提,三氧化铬($1.5\ \text{mol/L}$)进行氧化衍生并真空干燥,干燥产物用 $100\ \mu\text{L}$ 乙腈-异丙醇($80:20$,v/v)溶解,用于 HPLC 分析。色谱分离柱为 Agilent Zorbax SB-C18 柱,柱温 4°C ,流速 $1\ \text{mL/min}$,检测波长为 $250\ \text{nm}$ 。

1.9 统计学分析

实验所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 和 SEM 对泡沫细胞 SSAO 活性的影响

小鼠原代 VSMC 经 $50\ \text{mg/L}$ ox-LDL 无血清培养液培养 48 h,经 HPLC 检测细胞内胆固醇酯均占总胆固醇 58% 以上,获得泡沫细胞,再经不同浓度(0 、 50 和 $100\ \mu\text{g/L}$) LPS 和 $500\ \mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 6 h 后,MTT 比色法检测发现细胞活性无显著差异,而 HPLC 检测发现 LPS 增加细胞 SSAO 活性,SEM 可以抑制这种作用(图 1)。

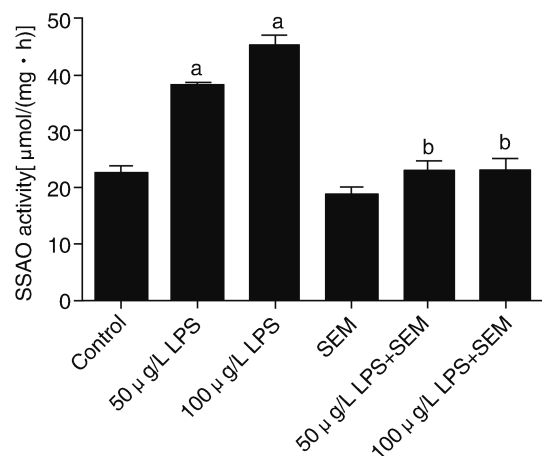


图 1. LPS 和 SEM 处理对泡沫细胞 SSAO 活性的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与相应 LPS 组比较。

Figure 1. Effects of LPS and SEM treatment on the activity of SSAO in foam cells($n=3$)

2.2 LPS 和 SEM 对泡沫细胞葡萄糖消耗的影响

小鼠原代 VSMC 源性泡沫细胞经不同浓度(0 、 50 和 $100\ \mu\text{g/L}$) LPS 和 $500\ \mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 6 h 后,葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法检测培养基葡萄糖含量,结果发现,LPS 增加细胞葡萄糖消耗,随着 SSAO 的活性被 SEM 抑制,葡萄糖的消耗不增加(图 2)。

2.3 LPS 和 SEM 对泡沫细胞产生 H_2O_2 的影响

小鼠原代 VSMC 源性泡沫细胞经不同浓度(0 、 50 和 $100\ \mu\text{g/L}$) LPS 和 $500\ \mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 6 h 后,荧光分光光度计检测细胞内和培养基上清中 H_2O_2 含量,结果发现,LPS 增加细胞内和培养基上清中 H_2O_2 的产生,SEM 可以抑制 LPS 的这种作用(图 3)。

2.4 LPS 和 SEM 对泡沫细胞 ABCA1 蛋白质表达的影响

小鼠原代 VSMC 源性泡沫细胞经 50 $\mu\text{g/L}$ LPS 和 500 $\mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 6 h 后,提取细胞总蛋白质,采用 Western blot 检测 ABCA1 蛋白质的表达。LPS 处理后,细胞 ABCA1 蛋白质的表达显著少于对照组;SEM 处理细胞,细胞 ABCA1 蛋白质的表达无显著变化;LPS 和 SEM 共同处理细胞,细胞 ABCA1 蛋白质的表达显著低于对照组而高于 LPS 处理组。提示,LPS 降低 ABCA1 蛋白质的表达与 SSAO 活性增加相关(图 4)。

2.5 LPS 和 SEM 对泡沫细胞胆固醇流出的影响

小鼠原代 VSMC 源性泡沫细胞经 50 $\mu\text{g/L}$ LPS 和 500 $\mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 6 h 后,液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。LPS 处理细胞,细胞内胆固醇流出比对照组明显减少;SEM 处理细胞,细胞内胆固醇流出无显著变化;LPS 和 SEM 共同处理细胞,细胞内胆固醇流出低于对照组而高于 LPS 处理组。提示 SSAO 抑制剂可以部分减轻 LPS 对细胞内胆固醇流出的抑制作用(图 5)。

2.6 LPS 和 SEM 对泡沫细胞脂质蓄积的影响

小鼠原代 VSMC 源性泡沫细胞经 50 $\mu\text{g/L}$ LPS 和 500 $\mu\text{mol/L}$ SEM 分别或共同处理 12 h 后,采用

HPLC 检测细胞内胆固醇和胆固醇酯含量。LPS 处理细胞,细胞内胆固醇和胆固醇酯含量比对照组明显增加;SEM 处理,细胞内胆固醇和胆固醇酯含量与对照组相比无显著变化;LPS 和 SEM 共同处理细胞,细胞内胆固醇和胆固醇酯含量低于对照组而高于 LPS 组。提示抑制 SSAO 活性可以部分减轻 LPS 导致的细胞内胆固醇和胆固醇酯的蓄积(表 1)。

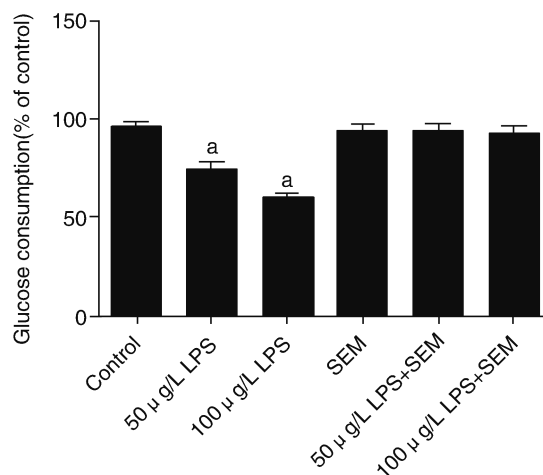


图 2. LPS 和 SEM 处理对泡沫细胞葡萄糖消耗量的影响 ($n=3$) a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

Figure 2. Effects of LPS and SEM treatment on glucose consumption of foam cells ($n=3$)

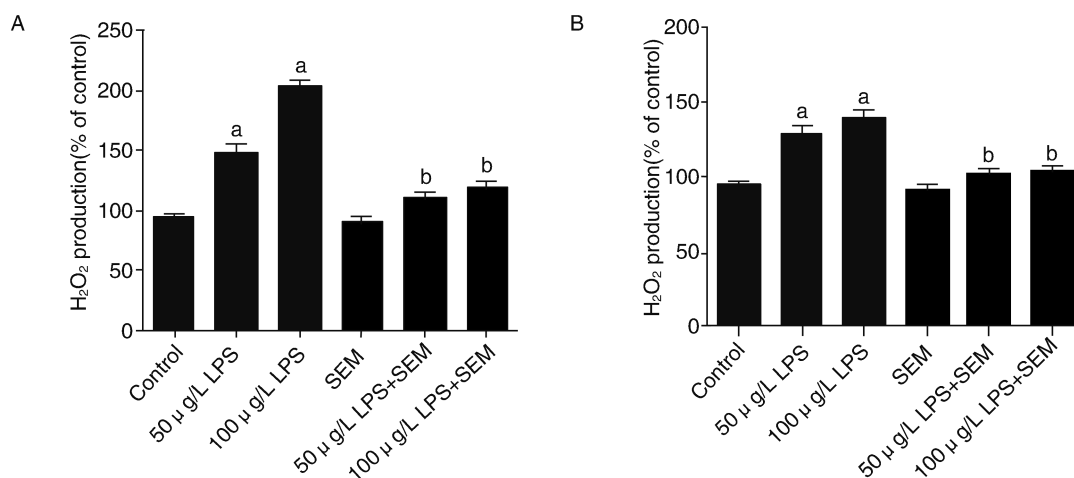


图 3. LPS 和 SEM 处理对泡沫细胞内和培养基上清中 H_2O_2 产生的影响 ($n=3$) A 图为细胞内 H_2O_2 水平, B 图为培养基中 H_2O_2 水平。a 为 $P<0.05$,与对照组比较; b 为 $P<0.05$,与相应 LPS 组比较。

Figure 3. Effects of LPS and SEM treatment on H_2O_2 production in foam cells and culture media ($n=3$)

3 讨论

As 是糖尿病患者晚期并发症之一,高血糖及并

发的高血脂等多种因素造成血管内膜受损,血液中脂质浸入动脉壁,平滑肌细胞和巨噬细胞向内膜迁移,吞噬大量的脂质形成泡沫细胞,导致脂质在内膜

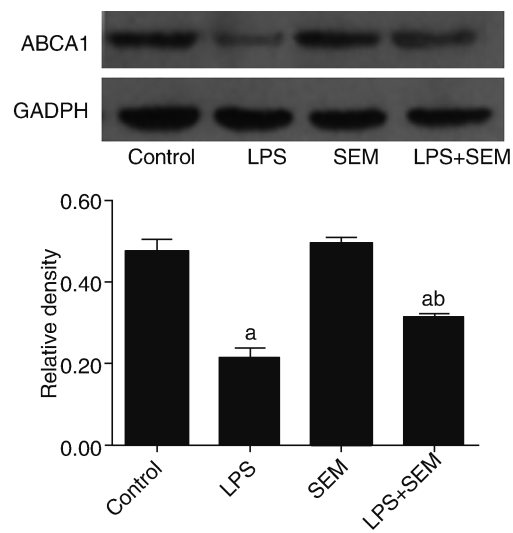


图 4. LPS 和 SEM 处理对泡沫细胞 ABCA1 蛋白质表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 4. Effects of LPS and SEM treatment on the expression of ABCA1 protein in foam cells($n=3$)

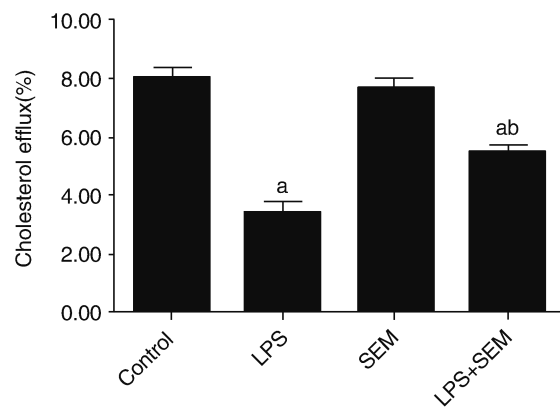


图 5. LPS 和 SEM 处理对泡沫细胞胆固醇流出的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 LPS 组比较。

Figure 5. Effects of LPS and SEM treatment on cholesterol efflux in foam cells($n=3$)

表 1. LPS 和 SEM 对泡沫细胞内胆固醇和胆固醇酯含量的影响($n=3$)

Table 1. Effects of LPS and SEM on cholesterol and cholesterol esters in foam cells($n=3$)

项目	对照组	LPS 组	SEM 组	LPS+SEM 组
总胆固醇 (mg/L)	512±34	712±49 ^a	504±78	578±62 ^{ab}
游离胆固醇 (mg/L)	213±17	241±43 ^a	215±33	221±58 ^{ab}
胆固醇酯 (mg/L)	299±22	471±26 ^a	289±47	357±14 ^{ab}
胆固醇酯/总胆固醇	58.40%	66.15% ^a	57.34%	61.76% ^{ab}

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

下蓄积,进而形成 As 斑块^[13]。既往认为 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化是 As 斑块脂质蓄积的主要原因,近期研究显示人冠状动脉内膜下的泡沫细胞主要来源于 VSMC^[14]。因此本研究选择小鼠 VSMC 源性泡沫细胞做为实验对象,观察 LPS 作用下泡沫细胞内脂质蓄积的变化与 SSAO 活性改变的关系,以期了解 SSAO 是否影响细胞脂质的转运,进一步探讨 LPS 促进 As 斑块发生发展的相关机制。

LPS 促进 As 的发生是多方面的。LPS 可以激活 Toll 样受体—核因子 κ B 途径,产生大量的炎症细胞因子,损伤血管壁内膜;也可以促进巨噬细胞源性泡沫细胞形成,加速粥样斑块的产生,但其机制尚未完全明确。本研究中,所使用的 LPS 浓度极低($\leq 100\text{ }\mu\text{g/L}$),经 MTT 比色法检测细胞活性在组间无显著差异,所以 LPS 的作用与细胞活性改变无关。LPS 诱导 SSAO 活性增加,随 SSAO 活性增加,培养基上清中葡萄糖含量减少,细胞和细胞外 H_2O_2 产生增多。SSAO 有膜结合和可溶型两种形式,膜结合型主要分布在哺乳动物的 VSMC、内皮细胞和脂肪细胞中,可溶型存在于血液循环。SSAO 清除内源性和外源性胺的同时产生有毒性的代谢产物(尤其是甲醛),通过氧化应激反应引起蛋白质交联,损伤血管内皮细胞,导致糖尿病患者出现 As、视网膜病变等血管病变^[15]。因此,LPS 作用后,SSAO 活性增高具有促进 VSMC 损伤的作用。研究发现,少量 SSAO 表达于细胞内含葡萄糖转运蛋白-4 (glucose transporter 4, GLUT4) 的内涵体中, GLUT4 在 SSAO 底物的作用下,可转运至细胞膜,使细胞对葡萄糖的摄取增加^[16-17]。本研究中细胞和细胞外 H_2O_2 在 LPS 作用下随 SSAO 活性增高而产生增多。 H_2O_2 也是 SSAO 氧化甲胺等底物的产物,可激活磷脂酰肌醇激酶 3 和蛋白激酶 B,这两种酶对促使 GLUT-4 聚集到质膜起关键性作用^[18]。因此,随着 SSAO 活性的增加,细胞大量消耗葡萄糖,使得细胞处于相对缺乏营养易于损伤的状态。 H_2O_2 还是氧化应激的媒介之一,可通过 Fenton 反应产生大量的自由基,导致血管内皮损伤,而 As 病变早期的表现之一就是动脉壁的损伤。本研究中,加入 $500\text{ }\mu\text{mol/L}$ SSAO 抑制剂 SEM 时,由 LPS 引起的 SSAO 活性增高被完全抑制,细胞的葡萄糖消耗量和 H_2O_2 的产生恢复正常,说明 SEM 减少细胞葡萄糖的消耗和 H_2O_2 的产生与抑制 SSAO 活性密切相关。因此,SSAO 抑制剂的使用将有助于预防及治疗 SSAO 代谢产物所引起的血管病变。

LPS 可以促进巨噬细胞源性泡沫细胞形成,但

其机制尚未完全明确。Khovidhunkit 等^[19]研究表明 LPS、肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 可以下调鼠巨噬细胞 ABCA1 的表达。ABCA1 在处理细胞内游离胆固醇和磷脂的流出中非常关键,通过调控 RCT,可以改善泡沫细胞内的脂质蓄积。本研究结果发现,LPS 下调 VSMC 源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质的表达,抑制 ABCA1 胆固醇逆转运功能,使泡沫细胞脂质蓄积进一步增加,加重细胞泡沫化程度;而使用 SSAO 抑制剂 SEM 可以改善 LPS 对 ABCA1 蛋白质表达的抑制作用,减少细胞内脂质蓄积,有很好地改善细胞泡沫化程度的作用,但是只能部分抑制,说明 LPS 促进 VSMC 源性泡沫细胞内脂质蓄积加重除了与 SSAO 活性增加有关外还存在其他的作用机制。还有研究表明,SSAO 位于成熟脂肪细胞表面的小凹内^[20]。这些小凹被认为参与脂质内流,因此脂肪细胞的 SSAO 可能参与了脂质的内向转运,但具体方式还有待研究。

综上,本研究进一步阐明 LPS 在 As 斑块形成和发展中的部分作用机制,LPS 可以通过 SSAO 活性的增加促进细胞毒性醛类和 H₂O₂ 的产生,损伤血管内膜,下调 ABCA1 蛋白质的表达,减少细胞内胆固醇流出,促进细胞脂质蓄积和加重细胞泡沫化。选择合适的 SSAO 特异性抑制剂将为 As 的治疗提供新的靶点,达到更好的预防和治疗 As 的目的。

[参考文献]

- [1] Nunes SF, Figueiredo IV, Pereira JS, et al. Monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase kinetic analysis in mesenteric arteries of patients with type 2 diabetes[J]. *Physiol Res*, 2011, 60 (2): 309-315.
- [2] Januszewski AS, Mason N, Karschikus CS, et al. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in type 1 diabetes is related to vascular and renal function but not to glycaemia[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2014, 11 (4): 262-269.
- [3] Solé M, Unzeta M. Vascular cell lines expressing SSAO/VAP-1: a new experimental tool to study its involvement in vascular diseases[J]. *Biol Cell*, 2011, 103 (11): 543-557.
- [4] Ullah K, Xie B, Iqbal J, et al. Arterial vascular cell line expressing SSAO: a new tool to study the pathophysiology of vascular amine oxidases[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2013, 120 (6): 1 005-013.
- [5] 甘祥海, 吕 湛. NLRP3 炎性小体在动脉粥样硬化发生发展中的作用[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35 (3): 462-468.
- [6] 曹冬黎, 尹 凯, 莫中成, 等. 脂多糖通过核因子- κ B 途径下调泡沫细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37 (5): 540-548.
- [7] Van Eck M, Van Berkel TJ. ATP-binding cassette transporter A1 in lipoprotein metabolism and atherosclerosis: a new piece of the complex puzzle[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (10): 2 281-283.
- [8] Fu Y, Zhou E, Wei Z, et al. Glycyrrhizin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts in RAW264.7 cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840 (6): 1 755-764.
- [9] Lin Z, Li H, Luo H, et al. Benzylamine and methylamine, substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase, attenuate inflammatory response induced by lipopolysaccharide[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (8): 1 079-089.
- [10] Li J, Wang S, Yang X, et al. Effect of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* on vascular endothelial cells in psychological stress rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151 (1): 601-608.
- [11] 吕运成, 王 佐, 姚 峰, 等. 薯蓣皂苷元对 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (7): 680-684.
- [12] 谈春芝, 谭玉林, 姚 峰, 等. 白细胞介素 4 对 THP-1 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23 (12): 1 203-209.
- [13] Mehta JL. Oxidized or native low-density lipoprotein cholesterol: which is more important in atherogenesis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48 (5): 980-982.
- [14] Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, et al. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2014, 129 (15): 1 551-559.
- [15] Yoshikawa N, Noda K, Shinoda H, et al. Serum vascular adhesion protein-1 correlates with vascular endothelial growth factor in patients with type II diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2013, 27 (2): 162-166.
- [16] McDonald A, Tipton K, O'Sullivan J, et al. Modelling the roles of MAO and SSAO in glucose transport[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2007, 114 (6): 783-786.
- [17] Zorzano A, Palacín M, Martí L, et al. Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds[J]. *J Inorg Biochem*, 2009, 103 (4): 559-566.
- [18] Carpené C, Grès S, Rascalou S. The amine oxidase inhibitor phenelzine limits lipogenesis in adipocytes without inhibiting insulin action on glucose uptake[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2013, 120 (6): 997-1 003.
- [19] Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, et al. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR[J]. *J Lipid Res*, 2003, 44 (9): 1 728-736.
- [20] Repessé X, Moldes M, Muscat A, et al. Hypoxia inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in adipocytes[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 411: 58-66.

(此文编辑 文玉珊)