

· 论 著 ·

普伐他汀与罗格列酮联合作用对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响*

李华波

(湖北民族学院附属医院心内科,恩施 445000)

摘要:目的 观察普伐他汀与罗格列酮联合应用对 THP-1 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)表达的影响。方法 THP-1 细胞经 160 nmol/L 佛波酯(PMA)孵育 24 h,诱导分化成巨噬细胞,分别与 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 普伐他汀及 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮单独或联合作用 24 h,提取各组细胞总 RNA 和蛋白质,分别采用 RT-PCR 和 Western Blot 检测 ABCA1 的 mRNA 和蛋白的表达。结果 普伐他汀增强 PPAR γ mRNA 表达,但抑制 LXR α mRNA 表达($P < 0.05$),对 ABCA1 的表达不产生明显效应($P > 0.05$);罗格列酮单独或与普伐他汀联合作用均可引起 ABCA1 表达明显增加,同时 PPAR γ 及 LXR α mRNA 表达亦上调($P < 0.05$)。结论 普伐他汀与罗格列酮联合应用能增强巨噬细胞 ABCA1 的表达。

关键词:巨噬细胞;普伐他汀;罗格列酮;三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

中图分类号:R972.6;R446.61

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)07-0777-03

Effects of pravastatin and rosiglitazone combination therapy on the expression of ABCA1 in THP-1 macrophage*

LI Hua-bo

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: Objective To examine the effects of pravastatin and rosiglitazone combination therapy on the expression of ATP-Binding Cassette Transporter A1(ABCA1) in THP-1 macrophage. **Methods** After incubated with 160 nmol/L PMA for 24 h, THP-1 was induced to macrophage. The macrophage was incubated with 10.0 $\mu\text{mol/L}$ pravastatin or/and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone for 24 h, respectively. Total RNA and protein of macrophage were extracted. The levels of ABCA1 mRNA and protein were measured by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot. **Results** Pravastatin increased PPAR γ mRNA's expression, and inhibited LXR α mRNA's expression($P < 0.05$), but couldn't increase the expression of ABCA1 mRNA and protein in macrophage($P > 0.05$); Rosiglitazone or combined with pravastatin could increase the expression of ABCA1 mRNA and protein in macrophage($P < 0.05$). **Conclusion** Pravastatin and rosiglitazone combination therapy can increase the expression of ABCA1 mRNA and protein in macrophage.

Key words: macrophage; pravastatin; rosiglitazone; ABCA1

许多研究表明高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)通过参与胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)发挥抗动脉粥样硬化作用,与冠心病发病危险性呈独立的负相关^[1]。在 RCT 过程中, HDL 及其载脂蛋白介导外周组织过剩的胆固醇转运至肝脏经胆汁排泄。目前认为,三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)的主要作用是将细胞内胆固醇和磷脂转运至细胞膜外并与载脂蛋白 A1 结合,形成新生 HDL 颗粒,启动 RCT 过程。由此可见, ABCA1 在 RCT 和 HDL 生成的起始步骤中起重要作用^[2]。对 ABCA1 基因表达调控的研究表明,肝 X 受体/维甲酸类受体(liver X receptor/retinoid X receptor, LXR/RXR)二聚体能诱导负荷脂质细胞 ABCA1 的表达;过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)亦可通过 LXR 途径调节 ABCA1 的表达。

他汀类药物在冠心病的防治中占有重要地位。主要阻断羟甲戊酸途径并增加肝脏 LDL 受体表达而降低 LDL 的浓度。Hitoshi 等^[3]报道他汀类药物在体外抑制 ABCA1 的表达。临床上联合应用能增强 ABCA1 表达的 LXR 激动剂类药物,对提高血浆 HDL 水平,预防动脉粥样硬化或许具有重大意义。动物试验证实,人工合成的 LXR 激动剂虽能提高血浆 HDL 的浓度,但同时也升高血浆三酰甘油水平。PPAR γ 激动剂罗

格列酮不仅能调节糖代谢及改善胰岛素抵抗,还可提高血浆 HDL-C 水平^[4],能诱导 LXR 的表达。本文旨在探讨普伐他汀联合应用罗格列酮对体外培养的 THP-1 巨噬细胞 PPAR γ 、LXR α mRNA 和 ABCA1 mRNA 及蛋白表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 THP-1 人单核细胞株由中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库提供;逆转录-多聚酶链反应试剂盒为 Promega 公司产品;高保真 PCR 扩增试剂盒为上海生物工程公司产品;羊抗人 ABCA1 一抗、辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗、兔抗人 β -actin 抗体为武汉博士德公司产品;普伐他汀为 NBC 公司产品,罗格列酮原药粉为 cayman 公司产品。ABCA1、LXR α 、GAPDH、PPAR γ 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 细胞培养 THP-1 单核细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静置培养。培养液中加入青霉素和链霉素各 1.0×10^5 u/L,在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯(PMA)孵育 THP-1 单核细胞 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。然后分为 4 组:空白对照组、普伐他汀(10 $\mu\text{mol/L}$)组、罗格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)组、普伐他汀(10 $\mu\text{mol/L}$) + 罗格列酮(10 $\mu\text{mol/L}$)组,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内培养 24 h。

* 基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划中青年人才基金项目(B200792004)。

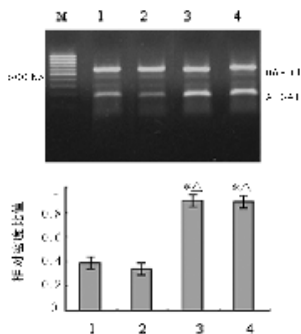
1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 收集各组细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μg 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA,再各取 2 μL 逆转录产物分别进行 PCR 循环。ABCA1 引物序列:上游 5'-GTA TTT TTG CAA GGC TAC CAG TTA CAT TTG ACA A-3';下游 5'-GAT TGG CTT CAG GAT GTC CAT GTT GGA A-3',PCR 扩增产物长度为 177 bp。PPAR γ 引物序列:上游 5'-TGT GAA GCC CAT TGA AGA CA-3';下游 5'-GAG CGG GTG AAG ACT CAT GT-3',扩增片段长度为 199 bp。LXR α 引物序列:上游 5'-GCG AGG GCT GCA AGG GAT TCT-3';下游 5'-ATG GGC CAA GGC GTG ACT CG-3',扩增片段长度为 376 bp。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',PCR 扩增产物长度为 697 bp。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 32 个循环,末次循环 72 $^{\circ}\text{C}$,延伸 10 min。反应结束后,取反应产物 6 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。用 Alphamager 3400 Imaging 图像分析系统采集、处理电泳图,以目的基因与 GAPDH 基因灰度比值代表目的基因的表达水平。

1.4 Western 印迹检测 ABCA1 蛋白表达 在收获好的细胞中加入三去污细胞裂解液裂解细胞,0 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 2 min,弃除沉淀,用 BCA 法蛋白定量。取 50 μg 蛋白加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,立刻置于冰上备用。6%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转 PDVF 膜,丽春红染色观察转移效果。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h;按 1:200 加入羊抗人 ABCA1 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min;1:2 000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次。用 Western blot 印迹荧光检测试剂盒显示于 X 线片。用 Alphamager 3400 Imaging 图像分析系统扫描胶片,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。

1.5 统计学方法 实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

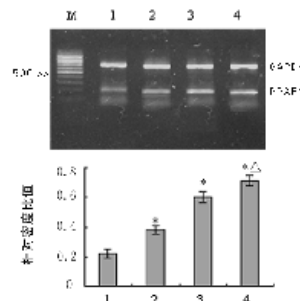
2.1 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响 如图 1 所示,普伐他汀不增强单核细胞 ABCA1 mRNA 表达($P > 0.05$);罗格列酮单独作用及与普伐他汀联合作用均能上调 ABCA1 mRNA 表达($P < 0.01$)。



M:100 bp Marker;1:空白对照组;2:普伐他汀组;3:罗格列酮组;4:普伐他汀加罗格列酮组;* :与空白对照组比较, $P < 0.01$;Δ:与普伐他汀组比较, $P < 0.05$ ($n=6$)。

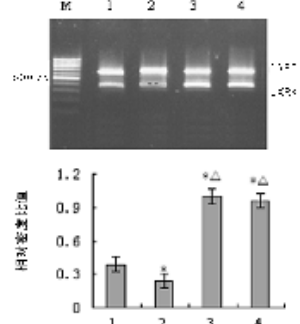
图 1 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

2.2 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 PPAR γ 及 LXR α mRNA 表达的影响 如图 2、3 所示,普伐他汀增强 PPAR γ mRNA 表达,但抑制 LXR α mRNA 表达($P < 0.05$);罗格列酮单独或与普伐他汀联用均能增强单核细胞 PPAR γ 及 LXR α mRNA 表达($P < 0.05$)。



M:100 bp Marker;1:空白对照组;2:普伐他汀组;3:罗格列酮组;4:普伐他汀加罗格列酮组;* :与空白对照组比较, $P < 0.01$;Δ:与普伐他汀组比较, $P < 0.05$ ($n=6$)。

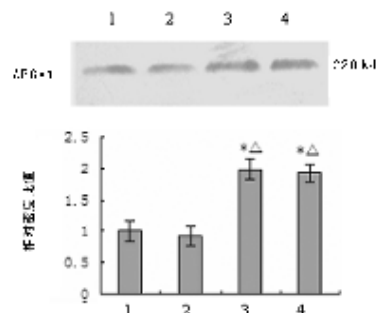
图 2 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响



M:100 bp Marker;1:空白对照组;2:普伐他汀组;3:罗格列酮组;4:普伐他汀加罗格列酮组;* :与空白对照组比较, $P < 0.01$;Δ:与普伐他汀组比较, $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 3 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 LXR α mRNA 表达的影响

2.3 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 ABCA1 蛋白表达的影响 如图 4 所示,经普伐他汀作用后单核细胞 ABCA1 蛋白质表达无明显增加;罗格列酮单独或与普伐他汀联用均能增强单核细胞 ABCA1 蛋白表达($P < 0.05$)。



M:100 bp Marker;1:空白对照组;2:普伐他汀组;3:罗格列酮组;4:普伐他汀加罗格列酮组;* :与空白对照组比较, $P < 0.01$;Δ:与普伐他汀组比较, $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 4 普伐他汀与罗格列酮对单核细胞 ABCA1 蛋白表达的影响

3 讨论

HDL 对动脉血管壁有直接的保护作用,并参与 RCT 而降

低荷脂巨噬细胞内胆固醇及磷脂水平,从而稳定动脉粥样斑块,使动脉粥样硬化病变消退^[5]。他汀类药物在临床上广泛用于冠心病的防治,不仅在于能降低 LDL,还能升高 HDL。文献报道单用他汀类药物仅能使 HDL 升高 6%~8%左右。尽管 ABCA1 在 HDL 生成的起始步骤中起关键作用,但他汀类药物对 ABCA1 的表达并没有促进作用^[3]。

PPARs 具有多种生物学效应,与糖、脂质代谢及心血管疾病的发生发展密切相关。有研究发现,PPAR α 及 PPAR γ 对 ABCA1 基因表达有重要的调节作用^[6]。贝特类药物作为 PPAR α 激动剂可诱导 ABCA1 的表达而升高 HDL,但由于不良反应大,临床上患者依从性较差,在与其他汀类药物合用时,可增加横纹肌溶解等肌病的发生率,限制了二者在临床上的联合应用^[7]。PPAR γ 激动剂噻唑烷酮类药物(罗格列酮等)目前在临床上广泛应用于 2 型糖尿病及代谢综合征的治疗,这类药物除了具有调节糖代谢及改善胰岛素抵抗的作用外,还具有调节脂质代谢以及抗炎等作用,表现为重要的抗动脉粥样硬化的作用^[8]。2 型糖尿病及代谢综合征是动脉粥样硬化的重要危险因素,这些患者常同时存在胰岛素抵抗及脂代谢紊乱,这为临床上联合应用他汀类药物与 PPAR γ 激动剂提供了重要的理论基础。

有研究表明普伐他汀在体外虽能诱导 THP-1 巨噬细胞 PPAR γ 的表达^[9],但抑制 LXR 的表达,因而不能促进 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 的表达。其机制主要与他汀类药物抑制 HMG-coA 还原酶,使中间产物羟甲戊酸(MVA)及终产物胆固醇的生成减少,而胆固醇及氧化固醇在体内可诱导 LXR 及 ABCA1 的表达^[3]。罗格列酮通过激活 PPAR γ 上调 LXR 的转录,促进 ABCA1 的表达。普伐他汀联合应用罗格列酮后,与二者单独作用比较,可进一步激活 PPAR γ ,表现出协同效应;而对 LXR 的表达与普伐他汀单独作用比较,表现为明显的增强效应,与罗格列酮单独作用比较差异无统计学意义。由于普伐他汀与罗格列酮在激活 PPAR γ 表达方面具有协同效应,二者联合应用后 ABCA1 mRNA 及蛋白的表达增强。因此,普伐他汀与罗格列酮联合应用可通过增强 ABCA1 表达的途径升高血浆 HDL 水平,促进胆固醇逆转运,降低外周细胞内过剩胆固醇,稳定富含脂质的粥样硬化斑块,促进粥样硬化斑块的消退,有利于更好地发挥其抗动脉粥样硬化的效应。本研究仅通过体外试验表明普伐他汀与罗格列酮联合作用可促进 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 的表达,为临床联合用药提供了理论依据,尚有待于进一步通过临床试验观察评价二者联合应用所产生的效应与安全性。

参考文献:

- [1] Sacks FM. The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease; expert group recommendations [J]. *AM J Cardiol*, 2002, 90(2):139.
- [2] Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1 partners in the removal of excess cellular cholesterol [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5):720.
- [3] Hitoshi A, Shuichi T, Hisashi Y, et al. Effects of atorvastatin on the expression of ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *JPET*, 2004, 311(1):420.
- [4] Nassirah K, Philippe D, Isabelle BB, et al. Rosiglitazone, a PPAR γ , inhibits the jun NH2-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury [J]. *Diabetes*, 2002, 51(5):1507.
- [5] Rong JX, Li J, Reis ED, et al. Elevating high-density lipoprotein cholesterol in apolipoprotein E-deficient mice remodels advanced atherosclerotic lesions by decreasing macrophage and smooth muscle cell content [J]. *Circulation*, 2001, 104(20):2447.
- [6] Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, et al. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway [J]. *Nat Med*, 2001, 7(1):53.
- [7] 何作云. 合理应用他汀类药物 [J]. *重庆医学*, 2006, 35(6):560.
- [8] Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, et al. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects [J]. *Ante Throm Vasc Biol*, 2005, 25(9):1903.
- [9] Miyuki Y, Takeshi M, Takafumi S, et al. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages [J]. *Circulation Research*, 2007, 100(10):1442.

(收稿日期:2009-08-02 修回日期:2009-09-07)

(上接第 776 页)

- Predictive validity of event-related potentials (ERPs) in relation to the directed forgetting effects [J]. *Clin-Neurophysiol*, 2004, 115(2):369.
- [4] Kashani JH, Sherman DD, Parker DR, et al. Utility of the beck depression inventory with clinic-referred adolescents [J]. *Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1990, 29:278.
 - [5] 李荣宝, 彭聘聆, 王春茂. 语言认知加工过程中的早期皮

层电位 [J]. *心理科学*, 2001, 14(6):667.

- [6] Schapkin SA, Gusev AN, Kuhl J. Categorization of unilaterally presented emotional words; an ERP analysis [J]. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*, 2000, 60:17.
- [7] 汪涛, 冯正直, 杨国愉, 等. 伴抑郁症状大学生指向遗忘的特点 [J]. *中华脑科学与行为医学*, 2009, 18(3):266.

(收稿日期:2009-08-23 修回日期:2009-09-28)