

尼古丁对巨噬细胞肝 X 受体 α 表达及胆固醇外流的影响

钱宗杰¹, 曾秋棠², 邱 龄¹, 肖传实¹

(1. 山西医科大学第二医院心内科, 山西 太原 030001; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科, 湖北 武汉 430022)

中国图书分类号: R 322.47; R 329.24; R 344.81; R 342.22; R 392.11; R 543.5; R 971.91; R 971.92

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2009)06-0813-04

摘要:目的 通过研究尼古丁对巨噬细胞的肝 X 受体 α (LXR α) 及其下游的一些目的基因表达和胆固醇外流的影响, 探讨尼古丁对 LXR 信号系统的作用。方法 分离人外周血单核细胞, 并转化为巨噬细胞。在尼古丁的作用下, 观察巨噬细胞的 aopA-I 介导的胆固醇外流的变化和 LXR 及其下游一些目的基因 mRNA 表达。结果 尼古丁明显影响巨噬细胞中一些涉及胆固醇代谢及炎症反应的基因表达, 同时降低 aopA-I 介导的胆固醇外流。结论 巨噬细胞在尼古丁的作用下, 由 aopA-I 介导的胆固醇外流降低, 这种效应与尼古丁下调 LXR α 及其下游的影响胆固醇代谢的目的基因有关, 同时, 也促进一些炎症因子基因的表达。提示尼古丁在动脉粥样硬化中的作用与其影响巨噬细胞 LXR 信号途径有关, 从而影响泡沫细胞的形成。

关键词: 尼古丁; 胆固醇外流; 巨噬细胞; 肝 X 受体

动脉粥样硬化的早期病变为血管内皮下的富含胆固醇的巨噬细胞聚集, 并在各种复杂的机制下, 巨噬细胞在动脉壁转变为泡沫细胞, 从而启动动脉粥样硬化病变的发生。在巨噬细胞内部, 肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 及 LXR 诱导的信号是介导其脂代谢的重要分子基础, 也是巨噬细胞的致动脉粥样硬化的重要环节^[1]。LXR 属核受体超家族的配体激活转录因子, 胆固醇的一些代谢产物是其内源的激活配体, 人工合成的 GW3965、TO901317 是

其特异的激活剂。LXR 通过直接结合在靶基因的 DR4 (direct repeat four) 序列位点, 即 LXR 反应元件 (LXR response element, LXRE), 调节靶基因的表达。即表现为上调涉及脂代谢基因表达, 如 ATP 结合盒转移子家族 A1 (ATP binding cassette A1, ABCA1)、固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element binding protein, SREBP2)、磷脂转运蛋白 (phospholipid transfer protein, PLTP)、胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE)、aopA-I 等, 介导巨噬细胞的胆固醇外流。

尼古丁 (nicotine) 被认为是致动脉粥样硬化的烟草中的一种重要成分, 但其致动脉粥样硬化的作用机制还知之甚少。Lau 等^[2] 用 LDLR^{-/-} 小鼠模型, 经过尼古丁处理, 发现动脉壁局部病变明显, 一些核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 的目的基因表达上调, 表现为增强的炎症效应; 来自于腹腔的巨噬细胞也呈现这种变化, 所以, 尼古丁的致动脉粥样硬化作用与其炎症效应相关。本实验旨在探讨尼古丁对 LXR 信号途径的影响以及对巨噬细胞的胆固醇外流的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 21 名健康成人外周血液, 提取外周血单核细胞作为本研究的实验材料。Ficoll 淋巴细胞分层液、20 g · L⁻¹ 锥虫蓝染液、小牛血清、二甲基亚砜 (DMSO)、0.2 g · L⁻¹ EDTA (武汉亚法生物公司), 完全 RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司), [³H]胆固醇、apoA-I、TO-901317 (Sigma 公司), 佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, Alexis Biochemicals 公司), TRIzol 试剂 (Promega 公司), 用于

收稿日期: 2009-02-11, 修回日期: 2009-03-07

作者简介: 钱宗杰 (1971-), 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 介入心脏病学基础及临床, Tel: 0351-3365536, E-mail: q8375zj@yahoo.com.cn

radioactivity also showed C-Fe@C-CN was accumulated in the targeted liver. The carboplatin concentrations of B group in magnetic field tissues were increased significantly more than that of A group ($P < 0.01$). The carboplatin concentrations of non-targeted liver in B group were lower significantly than that of A group ($P < 0.01$). The blood plasma AUC and average stay time of C-Fe@C-CN was 3 and 2.6 times of car-

boplatin, respectively. C-Fe@C-CN could prolong carboplatin keeping time in blood, and increased AUC. **Conclusions** C-Fe@C-CN under the guidance of an external magnetic field is significantly effective to increase targeting rates of carboplatin to liver and prolonging effect on the action *in vivo*.

Key words: carboplatin; magnetic target; nanoparticles; normal rat; pharmacokinetics; *in vivo* distribution

Tab 1 Sense and antisense primers used for RT-PCR

| Gene | Sense primer | Antisense primer | Product/bp |
|----------------|--------------------------|-------------------------|------------|
| LXR α | CTTCTGGAGACATCTCGGAGGT | CTGATAGCAATGAGCAAGGCAA | 410 |
| ABCA1 | ATAAGCCCTCTATACATAAATGCC | ACAGCGTAAAGTGCTTGAATG | 470 |
| SREBP2 | ATAGGTGGCAGGCCAGAAAC | AATCAAGACGCTACAGCAACTCA | 300 |
| CETP | AAGATGCCCAAGATCTCCTG | AAGCTCTGGAGGAAATCCAC | 445 |
| PLTP | CTGCCAGAGGTGATTGAGAAGA | CAGGCTATGAATGTGGGAAAAG | 330 |
| apoE | GCCGATGGAGGAGATGGG | AGGCAGGAGGCACGGGGT | 304 |
| MMP-9 | CTTCCACTACCGAGAGAAAGCC | CAAAGGTGAGAAGAGAGGGCC | 200 |
| MIP-1 α | CGCCTGCTGCTTCAGCTACAC | TGTGGAGGTCACACGCATGTT | 200 |
| GAPDH | CCCATGTTCCATCGGGTGT | TGGTCATGACTCCTCCACGATA | 140 |

RT-PCR 的试剂和 Marker DL-2000 (TaKaRa Biotr-
chology 公司), 尼古丁(中山生物公司)。

1.2 外周血单核细胞分离 抽取患者动脉血 10 ml, 采用 Picoll (密度 $1.077 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 密度梯度离心法分离收集外周血单个核细胞。以 $1 \times 10^{10} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞浓度加入 6 孔细胞培养板, 每孔 2 ml, 置 37°C , $50 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CO}_2$ 贴壁培养 2 h, 收集贴壁的细胞, 姬姆萨染色纯度 90% 以上, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 锥虫蓝染液染色示细胞活力 95% 以上。

1.3 巨噬细胞的转化 按文献的方法^[3], 将收集的单核细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, 转入 6 孔培养板, 在含有 $100 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛血清, 青霉素 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 1640 培养液, 加 $3.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PMA, $50 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CO}_2$, 37°C 的培养箱中孵育 24 h。

1.4 巨噬细胞的处理及胆固醇外流的测定 根据文献资料^[1,5], $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尼古丁对巨噬细胞的免疫信号途径发挥作用, 而无明显的细胞毒作用, $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TO-901317 对 LXR 的激动作用最佳, 故以样本中加终浓度 0、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尼古丁和同时加或不加 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TO-901317 进行分组。

参照文献^[4]描述的方法, 将巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在含有 $100 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ 小牛血清, 青霉素 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RPMI 1640 培养液中加 $7.4 \times 10^3 \text{ Bq} \cdot \text{L}^{-1}$ [^3H] 胆固醇共培养 48 h, 用 PBS 液洗涤细胞。获得的巨噬细胞调整为 $3.0 \times 10^9 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度, 转入 6 孔细胞培养板, 在上述培养液中, 按分组要求加入试剂, 培养 24 h。再用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ apoA-I 新培养液中培育细胞 12 h, 用闪烁计数法检测培养液和细胞的 [^3H] 胆固醇。胆固醇流出用 [培养液中 CPM (每分钟记数)/总 CPM] $\times 100\%$ 来表示。

1.5 逆转录聚合酶链反应 收集上述各组细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总

RNA $2 \mu\text{g}$ 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 $10 \mu\text{l}$ 进行 PCR 循环。 94°C 预变性 5 min, PCR 扩增 34 个循环 (94°C 变性 1 min, 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min) 后, 72°C 再延伸 10 min, 然后 4°C 5 min。PCR 引物由武汉伯杰生物公司合成, 引物序列如 Tab 1。反应结束后, 取反应产物 $10 \mu\text{l}$ 进行 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表各基因的表达量。

1.6 统计学分析 应用 SAS 统计分析软件分析各组数据。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 尼古丁对巨噬细胞胆固醇外流的影响 本研究中, 由 apoA-I 介导的人外周血来源的巨噬细胞胆固醇外流, 在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尼古丁作用下明显降低。另一方面, 巨噬细胞在有 TO-901317 活化 LXR 时, 促进胆固醇的细胞外流, 但在尼古丁的作用下 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), LXR 促进胆固醇细胞外流的作用明显降低 (Tab 2)。

Tab 2 Effect of nicotine on apoA-I mediated cholesterol efflux in macrophage ($\% \bar{x} \pm s, n = 21$)

| Group | 0/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 100/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| Without TO-901317 | 15.21 \pm 1.32 | 10.33 \pm 1.14 [▲] |
| With TO-901317 | 27.74 \pm 2.59 ^{△△} | 21.91 \pm 1.57 ^{△△▲} |

^{△△} $P < 0.01$ vs groups without TO-901317; [▲] $P < 0.05$ vs groups without nicotine

2.2 尼古丁对人外周血来源的巨噬细胞 LXR α 及下游基因 mRNA 表达的影响 在尼古丁的作用下, 人外周单核细胞来源的巨噬细胞, 其涉及胆固醇外流的基因 LXR α 、ABCA1、SREBP2、PLTP、apoE、CETP 的 mRNA 表达均下调。在本研究中的巨噬细胞, 无论有无尼古丁的刺激, 在有 LXR 激活剂 TO-901317 的作用下, ABCA1、SREBP2、PLTP、apoE 和

Tab 3 Effect of nicotine on LXRoand it's target gene expression on macrophage(% , $\bar{x} \pm s, n = 21$)

| | 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | | 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| | without TO-901317 | with TO-901317 | without TO-901317 | with TO-901317 |
| LXR α | 29.33 \pm 2.18 | 41.27 \pm 2.58 ^{**} | 18.12 \pm 3.29 $\Delta\Delta$ | 20.36 \pm 2.74 ^{**} |
| ABCA1 | 32.78 \pm 2.43 | 48.69 \pm 3.34 ^{**} | 17.48 \pm 2.52 $\Delta\Delta$ | 29.37 \pm 1.78 ^{**} |
| SREBP2 | 18.63 \pm 2.31 | 34.12 \pm 2.75 ^{**} | 10.73 \pm 2.45 Δ | 23.26 \pm 1.94 ^{**} |
| CETP | 28.09 \pm 1.57 | 43.57 \pm 2.73 ^{**} | 13.75 \pm 1.32 $\Delta\Delta$ | 25.48 \pm 2.37 ^{**} |
| PLTP | 36.85 \pm 2.54 | 51.23 \pm 2.71 ^{**} | 21.93 \pm 2.47 $\Delta\Delta$ | 32.04 \pm 2.84 ^{**} |
| apoE | 34.49 \pm 2.59 | 52.78 \pm 3.81 ^{**} | 16.47 \pm 2.35 $\Delta\Delta$ | 28.14 \pm 2.73 ^{**} |
| MMP-9 | 29.31 \pm 2.54 | 20.19 \pm 2.19 ^{**} | 41.38 \pm 2.14 Δ | 30.63 \pm 2.23 ^{**} |
| MIP-1 α | 21.18 \pm 1.78 | 34.07 \pm 2.75 ^{**} | 40.92 \pm 2.79 $\Delta\Delta$ | 19.14 \pm 2.04 ^{**} |

^{**} $P < 0.01$ vs group without TO-901317 between similar saturation of nicotine; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ nicotine without TO-901317; ^{**} $P < 0.01$ vs group 0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ nicotine without TO-901317

CETP 的 mRNA 表达上调。而涉及炎症反应的基因基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alfa, MIP-1 α) 的 mRNA 表达水平则表现为尼古丁使其增高, TO-901317 使其表达下调 (Tab 3, Fig 1)。

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。当氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 或经修饰的 LDL 存在时, 这些巨噬细胞就积聚胆固醇酯而转化为泡沫细胞。当刺激动脉壁中巨噬细胞, 促使其胞内胆固醇外流转化成 HDL, 可抑制泡沫细胞形成, 阻止动脉粥样硬化的发生和发展。

近年来的研究表明, 许多涉及脂代谢平衡、炎症及免疫反应的基因均接受 LXR 的调节^[1]。巨噬细胞中, LXR 被内源性配体激活后, 调节巨噬细胞脂代谢平衡; 同时, 激活 LXR 也可抑制一些致炎基因的表达^[6]。本研究发现, 体外培养的人巨噬细胞, 刺激 LXR 信号, 上调涉及脂代谢基因表达, 如 ABCA1、SREBP2、PLTP、apoE 和 CETP 等, 可促进巨噬细胞的胆固醇外流; 相反涉及炎症反应的基因 MMP-9、MIP-1 α 则表达下调。

吸烟是动脉粥样硬化的危险因子, 尼古丁是其中主要的有害成分。一般而言, 尼古丁通过与尼古丁乙酰胆碱 (nicotinic acetylcholine, nACh) 受体结合, 介导其生理作用, 也与 CYP2A6 酶相关^[7]。Heesch 等^[8]的研究发现, 尼古丁促进动脉粥样斑块病变的进展, 导致心脏的缺血事件发生。Aicher 等^[9]在研究尼古丁致动脉粥样硬化作用的实验中, 发现尼古丁活化病变处包括单核细胞等抗原提呈细胞, 主要活化几种激酶, 如 ERK1/2、p38MAPK 和 Akt, 这些细胞激酶的激活, 导致这些抗原提呈细胞启动先天性或获得性免疫功能, 也分泌大量的炎症因子, 参与免疫和炎症反应, 最终导致动脉粥样硬化的进展。

在 LDLR^{-/-} 小鼠模型, Lau 等^[2]的研究发现, 尼古丁具有致动脉粥样硬化作用, 依赖于其促进巨噬细胞的炎症因子分泌。尼古丁作为一个被认为可以致动脉粥样硬化的因素, 但是它的具体机制并不很

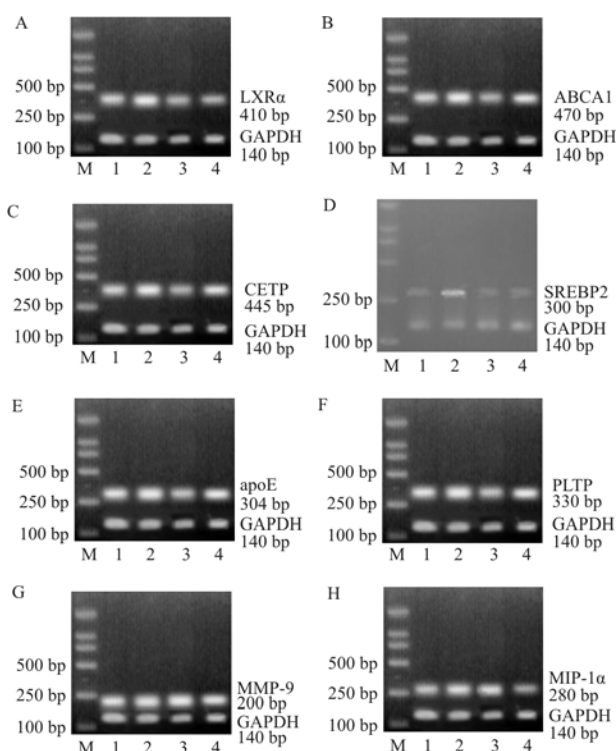


Fig 1 Gel electrophoresis map for RT-PCR of LXR α and it's target gene in macrophage

M: DNA Marker; 1: Without TO-901317 and nicotine, 2: With TO-901317 but without nicotine; 3: nicotine 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, without TO-901317, 4: nicotine 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, and with TO-901317, A: LXR α ; B: ABCA1; C: CETP; D: SREBP2; E: apoE; F: PLTP; G: MMP-9; H: MIP-1 α

3 讨论

动脉粥样硬化病变的特征是动脉壁内的脂代谢改变从而导致血管壁表现为慢性炎症状态。动脉粥样

清楚,目前在炎症和免疫机制方面有一定的作用。对于脂代谢的影响的研究并不多,有报道^[10]尼古丁能抑制 CETP 和 PLTP 的活性。本研究中,发现尼古丁可以抑制 LXR 信号途径,影响巨噬细胞的胆固醇外流,并可通过 LXR 途径来促进炎症的发生,这可能是吸烟能致动脉粥样硬化的一个方面。

参考文献:

- [1] Levin N, Bischoff E D, Daige C L, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(1):135-42.
- [2] Lau P P, Li L, Merched A J, et al. Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(1):143-9.
- [3] Suzuki S, Tomoko N M, Tamehiro N, et al. Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via liver X receptor-independent mechanism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**(3):519-25.
- [4] Lin G R, Bornfeldt K E. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290**(2):663-9.
- [5] Zhang S L, Day I, Ye S. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2001, **154**(1):277-83.
- [6] Ricote M, Villedor A F, Glass C K. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**(2):230-9.
- [7] 陈尧,周宏灏. CYP2A6 酶活性调节机制的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2006, **22**(12):1415-8.
- [7] Chen Y, Zhou H H. Research about the activity of CYP2A6 that related to regulative mechanism[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, **22**(12):1415-8.
- [8] Von E A, Nofer J R, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**(1):13-27.
- [9] Heeschen C, Jang J J, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2001, **7**(4):833-7.
- [9] Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M M, et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: Potential role for progression of atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 2003, **107**(3):604-11.
- [10] Zaratin A, Danelon M, Nunes V, et al. Plasma hepatic lipase, CETP and PLTP activities are reduced in normolipidemic smokers [J]. *XII th International Symposium on Atherosclerosis*, WeT5:W22 (abstract).

Regulation of macrophage cholesterol efflux and liver X receptor α activation by nicotine

QIAN Zong-jie¹, ZENG Qiu-tang², QIU Ling¹, XIAO Chuan-shi¹

(1. Institute of Cardiology, the Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Institute of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huangzhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract; Aim To investigate the characteristic of liver X receptor alfa (LXR α) and its target gene expression as well as cholesterol efflux from human macrophages under nicotine. **Methods** Human monocyte-derived macrophages were collected. Before apoA-I-mediated human monocyte-derived macrophage cholesterol efflux, and mRNA expression of LXR α , and some of its target genes being detected, the macrophages were induced with or without nicotine. **Results** Preincubation of Human monocyte-derived macrophages with nicotine, cholesterol efflux via apolipoprotein AI was

suppressed. Nicotine also inhibited LXR α and affected other genes expressions involved cholesterol metabolism, and facilitated some inflammatory genes expressions. **Conclusion** The changed function of cholesterol efflux and some genes expression may be the pathogenic cause, and LXR activity of macrophage may offer potential therapeutic benefit in the treatment of atherogenesis. Thus nicotine can regulate foam cell formation by inhibiting LXR pathway.

Key words: nicotine; cholesterol efflux; human monocyte-derived macrophage; liver X receptor