

# PDTC 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响

赵国军<sup>1,2</sup>, 汤石林<sup>1</sup>, 田国平<sup>1</sup>, 欧阳新平<sup>1</sup>, 吕运成<sup>1</sup>, 何平平<sup>1</sup>, 姚峰<sup>1</sup>  
唐艳艳<sup>1</sup>, 吴剑锋<sup>1</sup>, 王甲林<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>

(1. 南华大学心血管病研究所 动脉硬化湖南省重点实验室 生命科学研究中心, 湖南 衡阳 421001;  
2. 南华大学医学院组织学与胚胎学教研室)

**摘要:** 目的 研究核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响。方法 60 nmol/L PMA 孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h 后,分为 3 组:对照组、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)组(100  $\mu$ g/mL)和 PDTC 组(100  $\mu$ g/mL ox-LDL + 50  $\mu$ mol/L PDTC)。用油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况,高效液相色谱分析法检测细胞内胆固醇水平,用液体闪烁计数法观察细胞内胆固醇的流出。结果 PDTC 抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积,明显降低细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯的含量,增加载脂蛋白 A-I (apoA-I)介导的胆固醇流出,但对 HDL 介导的胆固醇流出无明显影响。结论 PDTC 抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积,促进 apoA-I 介导的胆固醇流出。

**关键词:** 二硫代氨基甲酸吡咯烷; THP-1 巨噬细胞; 脂质蓄积; 胆固醇流出

中图分类号:R363.1 文献标识码:A

## Effect of PDTC on Lipid Accumulation and Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophages Induced by ox-LDL

ZHAO Guojun, TANG Shilin, TINA Guoping, et al

(Institute of Cardiovascular Research, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of NF- $\kappa$ B inhibitor pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) on lipid accumulation and cholesterol efflux in THP-1 macrophages induced by ox-LDL. **Methods** Human THP-1 macrophage was induced using phorbol-12-myristate acetate (PMA, 160 nmol/L) for 24 h. Then cells were divided into three groups: control group, ox-LDL group (100  $\mu$ g/mL) and PDTC group (100  $\mu$ g/mL ox-LDL + 50  $\mu$ mol/L PDTC). Oil red O staining was used to observe the intracellular lipid droplets. Cellular cholesterol was determined by high performance liquid chromatography analysis. Cholesterol efflux was determined by liquid scintillation counting. **Results** PDTC inhibited the lipid accumulation in THP-1 macrophage induced by ox-LDL. Cellular total cholesterol, free cholesterol and cholesterol ester were decreased by application of PDTC. PDTC increased apoA-I mediated cholesterol efflux and had no significant effect on HDL-mediated cholesterol efflux. **Conclusion** PDTC inhibits lipid accumulation induced by ox-LDL and increases apoA-I mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage.

**Key words:** PDTC; THP-1 macrophages; lipid accumulation; cholesterol efflux

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是伴有胆固醇代谢紊乱的慢性炎症性病理生理学过程,其中血管壁炎症反应和巨噬细胞胆固醇过量蓄积是其发病的两个关键因素,而两者之间又相互促进<sup>[1]</sup>。因此,研究血管炎症致巨噬细胞内胆固醇蓄积的机制对As的防治具有重要的意义。

核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)是广泛存在于真核细胞胞质中的转录因子,参与众多与免疫和炎症反应有关的基因转录<sup>[2]</sup>。文献[3]报道,As斑块处可见到活化的NF- $\kappa$ B,且主要定位于巨噬细胞和泡沫细胞中,许多学者认为NF- $\kappa$ B激活可能是心血管炎性疾病的共同发病环节,抑制其活化是一个有效治疗As的策略。二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC)是NF- $\kappa$ B的特异性抑制剂,能明显抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)所诱导的NF- $\kappa$ B活化<sup>[4]</sup>。因此,本实验采用PDTC处理巨噬细胞,观察PDTC是否能调节ox-LDL所致的巨噬细胞脂质蓄积,并探讨其对胆固醇流出的影响,为As的防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

THP-1巨噬细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心;RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)、PDTC和<sup>[3H]</sup>胆固醇购自美国Sigma公司;小牛血清购自杭州四季青公司;载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I, apoA-I)购自Fluka Biochemika公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞培养及脂蛋白的分离

THP-1巨噬细胞用RPMI-1640培养基常规培养,实验前用160 nmol/L PMA孵育24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。换无血清培养基培养后加处理因素。健康人血浆购自衡阳市中心血站,应用超速离心机作序列超速离心制备低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL),氧化修饰和鉴定后备用。

### 1.3 油红O染色

将THP-1细胞接种于放有消毒盖玻片的6孔培养板内,细胞诱导分化为巨噬细胞。细胞分为3组:对照组、ox-LDL组(加100  $\mu$ g/mL ox-LDL)和PDTC组(同时加100  $\mu$ g/mL ox-LDL和50  $\mu$ mol/L PDTC)。ox-LDL组和PDTC组的处理时间均为24

h。用PBS洗涤细胞3次,依次用50%异丙醇固定1~2 min,油红O染色液染色10 min,去离子水冲洗3次,每次1~2 min,苏木素染核5 min,去离子水冲洗20 min,1%盐酸酒精分色1~2 s,再用去离子水返蓝后,甘油封片,显微镜下观察并拍照,红色颗粒为脂质。

### 1.4 高效液相色谱分析

参照文献[5]方法,待细胞处理结束后,弃培养基,PBS洗3遍,加入细胞裂解液200  $\mu$ L,反复冻融3次裂解细胞,BCA法定量蛋白后,7.2%三氯乙酸沉淀蛋白,800  $\times$  g离心10 min,取上清进行胆固醇检测,以豆甾醇为内标。取100  $\mu$ L上清液,加入8.9 mol/L氢氧化钾溶液200  $\mu$ L,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥,100  $\mu$ L乙晴-异丙醇(80:20)溶解样品,上样于高效液相色谱仪。采用C-18柱,柱温4 $^{\circ}$ C,流速1 mL/min,250 nm紫外光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,以mg/g细胞蛋白为单位。

### 1.5 胆固醇流出实验

胆固醇流出检测参照文献[6]方法进行。培养THP-1细胞,实验前用160 nmol/L佛波酯孵育THP-1细胞24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。各组细胞在加新鲜培养基与ox-LDL时,同时加0.2  $\mu$ Ci/mL<sup>[3H]</sup>胆固醇孵育细胞48 h。用PBS液洗涤细胞,加2 mg/mL牛血清白蛋白,再加10  $\mu$ g/mL apoA-I或50  $\mu$ g/mL HDL孵育细胞12 h后,用闪烁计数法检测培养基和THP-1细胞内的<sup>[3H]</sup>胆固醇(每分钟计数, cpm)。胆固醇流出率用培养基中cpm除以总cpm(培养基cpm + 细胞cpm),再乘以100%来表示。

### 1.6 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用SPSS12.0进行统计处理,组间比较采用方差分析及t检验,以 $P < 0.05$ 判定差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 PDTC对THP-1巨噬细胞脂质蓄积的影响

油红O染色结果表明,与对照组比较,THP-1巨噬细胞经ox-LDL孵育后,细胞内可见大量的红色脂滴,而加入PDTC后,细胞内的脂滴明显下降,说明PDTC可减少ox-LDL所致的细胞内脂质蓄积(图1)。

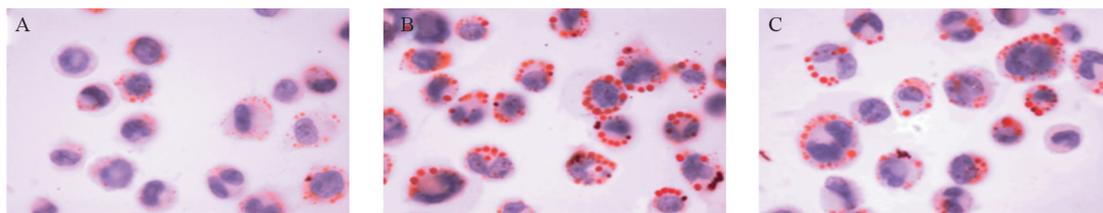


图 1 PDTC 对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响 (油红 O × 1 000) A: 对照组; B: ox-LDL 组; C: PDTC 组 (同时加 ox-LDL 和 PDTC)

## 2.2 PDTC 对 THP-1 巨噬细胞胆固醇含量的影响

THP-1 巨噬细胞与 ox-LDL 共同孵育后,细胞内总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯均明显增加,与对照组比较差异均有显著性,其中细胞内胆固醇酯从 93 mg/g 蛋白刷增到 351 mg/g 蛋白,说明细胞内有大量胆固醇酯聚集;与 ox-LDL 组比较,PDTC 组细胞内总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯均明显减少,但还是大于对照组 (表 1,  $P < 0.05$ )。

表 1 PDTC 对 THP-1 巨噬细胞胆固醇含量的影响 ( $n = 3$ , mg/g)

组别	总胆固醇 (TC)	游离胆固醇 (FC)	胆固醇酯 (CE)	CE/TC (%)
对照组	256 ± 15	163 ± 11	93 ± 7	36.3
ox-LDL 组	641 ± 28 <sup>a</sup>	289 ± 12 <sup>a</sup>	351 ± 21 <sup>a</sup>	54.8
PDTC 组	481 ± 17 <sup>ab</sup>	229 ± 15 <sup>ab</sup>	253 ± 20 <sup>ab</sup>	52.6

与对照组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL 组比较, b:  $P < 0.05$

## 2.3 PDTC 对 apoA-I 介导的胆固醇流出的影响

细胞内流出的胆固醇主要由 apoA-I 和 HDL 接受。其中 apoA-I 接受膜上 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 转运出的胆固醇,是胆固醇流出的主要接受体<sup>[7]</sup>。因此,在细胞培养基中加入 10 μg/mL apoA-I,检测巨噬细胞胆固醇流出水平的变化。结果发现,PDTC 组 apoA-I 介导的胆固醇流出明显增高 (表 2),提示 PDTC 可能影响了膜转运体 ABCA1 的功能。

表 2 PDTC 对 apoA-I 和 HDL 介导的胆固醇流出的影响

组别	apoA-I (%)	HDL (%)
对照组	4.8 ± 0.3	10.1 ± 0.6
ox-LDL 组	7.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	11.8 ± 1.1
PDTC 组	15.9 ± 1.2 <sup>ab</sup>	12.2 ± 0.9

与对照组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与 ox-LDL 组比较, b:  $P < 0.05$

## 2.4 PDTC 对 HDL 介导的胆固醇流出的影响

HDL 接受三磷酸腺苷结合盒转运体 G1 (ATP-

binding cassette transporter G1, ABCG1) 和 B 族 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B I) 介导的胆固醇流出<sup>[8]</sup>。PDTC 处理细胞后,对 HDL 介导的胆固醇流出无明显影响 (表 2),提示 PDTC 可能不影响膜转运体 ABCG1 和 SR-B I。

## 3 讨 论

泡沫细胞形成是 As 形成和发展中的早期变化。研究证明,ox-LDL 而不是 LDL,是致 As 的独立危险因素。巨噬细胞通过摄入 ox-LDL,引起血管壁泡沫细胞的堆积和脂纹的形成;ox-LDL 还可促进巨噬细胞释放多种致炎细胞因子<sup>[9]</sup>。本研究结果发现,使用 NF-κB 活化的特异性抑制剂 PDTC 处理 THP-1 巨噬细胞,可明显降低 ox-LDL 所诱导的巨噬细胞脂质蓄积;进一步对 PDTC 降低脂质蓄积的机制研究发现,PDTC 可以促进 apoA-I 介导的巨噬细胞胆固醇流出。巨噬细胞泡沫化过程可作为 As 防治过程中的重要靶点,胆固醇流出受阻是巨噬细胞泡沫化形成的重要原因之一<sup>[10]</sup>,因此,研究泡沫细胞形成以及胆固醇流出的影响因素及相关机制,对 As 疾病的预防及治疗具有十分重要的意义。

动物实验证实,使用 NF-κB 活化抑制剂或含 κB 序列的寡聚脱氧核苷酸抑制 NF-κB,均能有效减轻斑块内巨噬细胞脂质蓄积,延缓小鼠 As 病程进展<sup>[11]</sup>。虽然 NF-κB 可以影响病变区炎症因子的改变,但其导致巨噬细胞内脂质异常蓄积的原因尚未完全阐明。本实验在观察 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的基础上,通过 PDTC 抑制巨噬细胞内的 NF-κB 活化,发现巨噬细胞内脂质含量明显下降,而且,apoA-I 介导的巨噬细胞胆固醇流出也明显升高,提示 NF-κB 可能是通过抑制巨噬细胞胆固醇流出,进而促进细胞内脂质蓄积。

PDTC 是 NF-κB 的特异性抑制剂,抑制 NF-κB

活化可显著降低巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6) 和白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等炎症因子的释放。研究发现,这些炎症因子与冠心病的发生有密切关系,这些细胞因子可通过相互诱导、相互协同共同参与冠心病的发生、发展过程<sup>[12]</sup>。本研究使用 PDTC 抑制 NF- $\kappa$ B 活化,一方面说明,PDTC 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径减少巨噬细胞炎症因子的释放,另一方面也证明了,PDTC 可减轻巨噬细胞内脂质蓄积。因此,PDTC 可能通过两种不同而又相互有联系的机制,影响心血管病的发生。

巨噬细胞胆固醇代谢稳态的失衡则是导致泡沫细胞形成的关键。研究发现,胆固醇外流是调节巨噬细胞胆固醇动态平衡的重要环节,对减少细胞内胆固醇蓄积、防止泡沫细胞形成和 As 发生具有重要意义。胆固醇外流主要由 ABCA1、ABCG1 和 SR-B I 介导,其中 ABCA1 的接受体是 apoA-I<sup>[13]</sup>,而 ABCG1 和 SR-B I 的接受体是 HDL<sup>[14-15]</sup>。本课题组前期研究发现,使用致炎因素脂多糖 (LPS) 处理巨噬细胞,可下调细胞 ABCA1 的表达<sup>[16]</sup>。本实验分别使用 apoA-I 和 HDL 作为胆固醇流出的接受体,发现 PDTC 抑制 NF- $\kappa$ B 活化后,apoA-I 介导的胆固醇流出明显增加,而 HDL 介导的胆固醇流出无明显改变,说明 PDTC 可能选择性的作用于不同的胆固醇转运体,进而导致胆固醇流向特定的接受体,其具体分子机制,有待进一步研究。

总之,本实验研究发现,通过 PDTC 抑制巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 活化,可明显改善 ox-LDL 所致的细胞脂质蓄积,其机制可能与促进巨噬细胞胆固醇外流有关。本研究进一步阐明了泡沫细胞形成过程中 NF- $\kappa$ B 的部分作用机理,对更深入地了解 As 的炎症免疫机制有着重要意义。深入研究 PDTC 及 NF- $\kappa$ B 在巨噬细胞脂质蓄积中的作用,有助于人们找到治疗 As 性疾病新的治疗策略。

#### 参考文献:

[1] 闫凤,陈压西,赵长海.慢性炎症与动脉粥样硬化关系的研究进展[J].现代生物医学进展,2011,11(20):3964-3967.

[2] Gonzalez-Ramos R,Defrere S,Devoto L. Nuclear factor-kappa B;a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology [J]. Fertil Steril, 2012,98(3):520-528.

[3] Chen H,Yang J,Zhang Q,et al. Corosolic acid ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by regu-

lating the nuclear factor-kappaB signaling pathway and inhibiting monocyte chemoattractant protein-1 expression [J]. Circ J,2012,76(4):995-1003.

[4] Zhai JX,Zhang ZX,Feng YJ,et al. PDTC attenuate LPS-induced kidney injury in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr mice [J]. Mol Biol Rep,2012,39(6):6763-6771.

[5] 唐朝克,易光辉,王佐,等.干扰素- $\gamma$  对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响[J].生物化学与生物物理进展,2004,31(2):127-133.

[6] Mo ZC,Xiao J,Liu XH,et al. AOPPs inhibits cholesterol efflux by down-regulating ABCA1 expression in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner[J]. J Atheroscler Thromb,2011,18(9):796-807.

[7] Zhao GJ,Yin K,Fu YC,et al. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids[J]. Mol Med,2012,18(1):149-158.

[8] 莫中成,陈欣,谢远杰,等.高密度脂蛋白对 THP-1 巨噬细胞 B 类 I 型清道夫受体的表达及胆固醇流出的影响[J].实用医学杂志,2010,26(5):726-728.

[9] 张弛,黄靓,余美华,等.褪黑素对 ox-LDL 所致巨噬细胞 TNF- $\alpha$  释放及核因子  $\kappa$ B 活性的影响[J].中南医学科学杂志,2011,39(1):14-17.

[10] 涂剑,廖端芳,周志刚,等. Caveolin-1 在氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞荷脂过程中的表达[J].南华大学学报:医学版,2009,37(4):390-392.

[11] Halle M,Hall P,Tornvall P. Cardiovascular disease associated with radiotherapy; activation of nuclear factor kappa-B [J]. J Intern Med,2011,269(5):469-477.

[12] 朱建华.动脉粥样硬化炎症机制新视点 [J]. 同济大学学报:医学版,2009,30(2):6-9.

[13] 赵国军,唐朝克. ApoA-I 与 ABCA1 结合激活信号通路并介导细胞内胆固醇流出 [J]. 中南医学科学杂志,2011,39(4):361-366.

[14] Tang CK,Tang GH,Yi GH,et al. Effect of apolipoprotein A-I on ATP binding cassette transporter A1 degradation and cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2004,36(3):218-226.

[15] 路倩,陈五军,尹凯,等.动脉粥样硬化中胆固醇外流的研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2012,39(4):319-326.

[16] 曹冬黎,尹凯,莫中成,等.脂多糖通过核因子- $\kappa$ 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.