

· 论 著 ·

硫化氢上调 ABCA1 表达促进泡沫细胞胆固醇流出的实验研究*

李国术¹, 何平平², 王 波³, 周寿红², 欧阳新平^{2△}

(1. 衡阳市中心医院急诊科, 湖南衡阳 421001; 2. 南华大学心血管疾病研究所/生理学教研室, 湖南衡阳 421001; 3. 南华大学附属第一医院麻醉科, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 探讨外源性硫化氢(H₂S)对泡沫细胞胆固醇流出和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)表达的影响。方法 氧化低密度脂蛋白孵育 RAW264.7 细胞诱导泡沫化, H₂S 供体硫化氢钠处理细胞, 测定胆固醇流出率, 高效液相色谱测定细胞内游离胆固醇(FC)、胆固醇酯(CE)和总胆固醇(TC)浓度。实时定量 PCR 和蛋白印迹法检测泡沫细胞中 ABCA1 mRNA 和蛋白表达。结果 与泡沫细胞组相比, 外源性 H₂S 以时间和浓度依赖的方式增加泡沫细胞胆固醇流出($P < 0.05$), 降低细胞中 TC、FC 和 CE 及 CE/TC 水平($P < 0.05$), 上调细胞中 ABCA1 表达。结论 外源性 H₂S 上调泡沫细胞中 ABCA1 表达, 促进胆固醇流出。

关键词: 硫化氢; 胆固醇流出; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3596-03

The study of hydrogen sulfide up-regulates the expression of ABCA1 and promotes the cholesterol efflux in foam cells*

Li Guoshu¹, He Pingping², Wang Bo³, Zhou Shouhong², Ouyang Xinping^{2△}

(1. Department of Emergency, Central Hospital of Hengyang City, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Physiology/Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Department of Anesthesia, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hydrogen sulfide (H₂S) on the cholesterol efflux and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression in foam cells. Methods RAW 264.7 macrophages were incubated with oxidized low density lipoprotein to induce foam cells. Foam cells were incubated with H₂S donor sodium hydrosulfide. Cholesterol efflux from macrophages was tested by labeled cholesterol. The cellular levels of free cholesterol (FC), cholesterol ester (CE) and total cholesterol (TC) were measured by high performance liquid chromatography assays. The mRNA and protein expressions of ABCA1 were detected by Real-time PCR and Western blot. Results Compared with the foam cells, the rates of cholesterol efflux were significantly increased, the levels of TC, FC, CE and CE/TC ratio were significantly decreased ($P < 0.05$) and expression of ABCA1 was significantly increased by treatment with H₂S in dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Conclusion H₂S up-regulates of expression ABCA1 and promotes cholesterol efflux in RAW 264.7 macrophage-derived foam cells.

Key words: hydrogen sulfide; cholesterol efflux; ATP-binding cassette transporter A1

泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)重要的病理学基础, 单核巨噬细胞吞噬修饰的低密度脂蛋白, 特别是氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)而形成泡沫细胞^[1]。肝外组织细胞中的胆固醇通过血液运输到肝脏, 合成胆汁排出体外, 称为逆向胆固醇转运(reverse cholesterol transport, RCT)。RCT能力的减弱是泡沫细胞形成的重要原因。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)被称作 RCT 的“看门人”, 发挥抗 AS 作用^[2]。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)被称为第 3 种气体信号分子, 广泛分布于各系统中^[3-4]。H₂S 能延缓 AS 的进程, 缩小 AS 斑块, 具有抗 AS 作用^[5]。本研究旨在观察 H₂S 对泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响, 探讨 H₂S 抗 AS 的机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养与分组 RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞库。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中。

细胞融合 60%~70% 时, ox-LDL(50 μg/mL)孵育 48 h, 转变成泡沫细胞。实验分为泡沫细胞组、硫化氢钠(sodium hydrosulfide, NaHS)(10⁻⁵、10⁻⁴ 和 10⁻³ mol/L)处理 0、12、24 和 48 h 组。

1.2 方 法

1.2.1 试剂及仪器 NaHS 购自 Sigma 公司。[3H]标记的胆固醇(原子能院同位素所)。ABCA1 兔抗鼠一抗以及辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司。MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒、总 RNA 提取试剂盒和 Hot Star Taq Master Mix 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2.2 胆固醇流出检测 对数生长的细胞, 浓度为 3.0 × 10⁶ 个/mL, 接种 6 孔板, 含 10% 胎牛血清、0.2 μCi/L [3H]标记的胆固醇和 ox-LDL(50 μg/mL)的培养液共敷育 48 h。H₂S 组用 NaHS(10⁻⁵、10⁻⁴ 和 10⁻³ mol/L)继续敷育 12、24 和 48 h。更换培养液, 细胞在无血清含 50 μg/mL 载脂蛋白 AI 的新鲜培养液中敷育 12 h, 液闪仪检测培养液和细胞中的 [3H]胆固醇

表 1 H₂S 对泡沫细胞内 FC 及 CE 浓度的影响 (n=5)

组别	TC(mg/g, $\bar{x} \pm s$)	FC(mg/g, $\bar{x} \pm s$)	CE(mg/g, $\bar{x} \pm s$)	CE/TC (%)
泡沫细胞组	524.57 ± 31.22	179.09 ± 12.35	345.48 ± 24.18	65.86
NaHS(10 ⁻⁵ mol/L)24 h 组	523.06 ± 37.75	180.30 ± 13.32	342.76 ± 17.21	65.53
NaHS(10 ⁻⁴ mol/L)24 h 组	365.21 ± 21.64 ^{abd}	166.88 ± 13.42	198.33 ± 10.03 ^{abd}	54.04 ^{abd}
NaHS(10 ⁻³ mol/L)24 h 组	217.45 ± 18.24 ^{abc}	119.18 ± 11.35 ^{abc}	98.27 ± 8.76 ^{abc}	45.19 ^{abc}
NaHS(10 ⁻⁴ mol/L)12 h 组	507.36 ± 31.28	176.12 ± 16.34	331.24 ± 24.69	65.29
NaHS(10 ⁻⁴ mol/L)48 h 组	209.32 ± 18.32 ^{ae}	118.04 ± 7.21 ^{ade}	91.28 ± 5.36 ^{ade}	43.61 ^{ade}

^a: P < 0.05, 与泡沫细胞组比较; ^b: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁵ mol/L)24 h 组比较; ^c: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁴ mol/L)24 h 组比较; ^d: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁴ mol/L)12 h 组比较, NaHS(10⁻⁴ mol/L)24 h 组比较。

表 2 H₂S 对泡沫细胞内胆固醇流出的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	胆固醇流出率 (%)			
	0 h	12 h	24 h	48 h
泡沫细胞组	13.46 ± 1.76	14.39 ± 2.06	15.15 ± 1.94	17.82 ± 2.25
NaHS(10 ⁻⁵ mol/L)组	13.79 ± 1.54	14.26 ± 1.84	17.69 ± 2.17	20.43 ± 3.14
NaHS(10 ⁻⁴ mol/L)组	14.21 ± 1.13	15.51 ± 1.64	28.91 ± 3.65 ^{abde}	36.80 ± 1.13 ^{abdef}
NaHS(10 ⁻³ mol/L)组	14.68 ± 1.79	16.37 ± 2.12	42.77 ± 4.21 ^{abcde}	54.17 ± 5.71 ^{abcdef}

^a: P < 0.05, 与泡沫细胞组比较; ^b: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁵ mol/L)组比较; ^c: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁴ mol/L)组比较; ^d: P < 0.05, 与 NaHS 处理 0 h 比较; ^e: P < 0.05, 与 NaHS 处理 12 h 比较; ^f: P < 0.05, 与 NaHS 处理 24 h 比较。

醇浓度。胆固醇流出率用培养液中 [3H]/总值 [3H] (培养液 + 细胞) × 100% 表示。

1.2.3 高效液相色谱检测 超声破碎细胞, BCA 法蛋白定量。细胞裂解产物分成两份, 一份测定游离胆固醇 (free cholesterol, FC), 加入等体积 8.9 mmol/L 的 KOH 醇。另一份测定总胆固醇 (total cholesterol, TC), 加入等体积的 15% KOH 醇。两份样本加入 6% 三氯乙酸及等体积正己烷和异丙醇的混合溶液, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集上层有机相。加入 100 μL 异丙醇、正庚烷和乙晴的混合溶液溶解样品。1 500 r/min 离心 5 min, 收集上清液进行高效液相色谱分析。采用 C18 柱, 以异丙醇 : 正庚烷 : 乙晴为流动相进行非梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 216 nm 波长下检测, 以峰面积定量胆固醇。胆固醇酯 (cholesterol ester, CE) 经胆固醇酯酶水解为胆固醇, 测定 TC 量, TC 量减去 FC 量为 CE 量, 以 mg/mg 细胞蛋白为胆固醇和 CE 单位。

1.2.4 实时定量 PCR 检测 收集细胞, Trizol 提取细胞的总 RNA。提取的总 RNA 为模板进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链。取 cDNA 样品梯度稀释, 进行实时定量 PCR 反应, 反应总体积为 30 μL, 包含 cDNA 4 μL, 上下游引物各 1 μL, dNTP Mix (2 ×) 8 μL。ABCA1 引物: 上游: 5'-AGG AAA CCC AAT CCC AGA TAC CC-3', 下游: 5'-GCT CGG AGG AAG TGC TTG AGA AT-3'。β-actin 引物: 上游: 5'-CCA TCA TCT TGC AGG AGC G-3', 下游: 5'-CTG GCA GTG AGC TAT ACT CG-3'。采用 2^{-ΔΔ}CT 法处理数据。

1.2.5 Western blotting 检测 提取细胞总蛋白, BAC 法蛋白定量。100 μL 样本加入到 2 × SDS 凝胶加样缓冲液中煮沸。凝胶电泳 1 h 分离蛋白质, 分离的蛋白转膜至聚偏氟乙稀膜上。10% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入兔抗鼠 ABCA1 和 β-actin 一抗, 4℃ 下过夜。加入羊抗兔二抗, 孵育 6 h。显影后进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析后, 组间差异比较用 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 H₂S 对泡沫细胞内 FC 及 CE 浓度的影响 与泡沫细胞组相比, NaHS(10⁻⁴、10⁻³ mol/L) 处理 24 h 或 NaHS(10⁻⁴ mol/L) 处理 48 h 均显著降低了泡沫细胞中 TC、FC 和 CE 及 CE/TC 水平 (P < 0.05)。NaHS(10⁻⁵ mol/L) 处理 24 h 和 NaHS(10⁻⁴ mol/L) 处理 12 h 细胞中 TC、FC 和 CE 及 CE/TC 水平与泡沫细胞组相比差异无统计学意义 (P > 0.05), 见表 1。

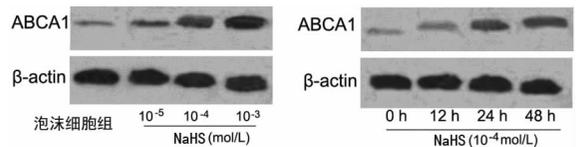


图 1 H₂S 对泡沫细胞 ABCA1 蛋白表达的影响

表 3 H₂S 对泡沫细胞 ABCA1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ABCA1 mRNA 相对表达水平 (%)	ABCA1 蛋白 相对表达水平
泡沫细胞组	100.00 ± 0.00	0.15 ± 0.02
NaHS (10 ⁻⁵ mol/L)24 h 组	103.27 ± 3.65	0.17 ± 0.03
NaHS (10 ⁻⁴ mol/L)24 h 组	125.76 ± 5.14 ^{abd}	0.48 ± 0.05 ^{abd}
NaHS (10 ⁻³ mol/L)24 h 组	148.63 ± 8.36 ^{abc}	0.98 ± 0.12 ^{abc}
NaHS (10 ⁻⁴ mol/L)12 h 组	105.38 ± 2.47	0.16 ± 0.02
NaHS (10 ⁻⁴ mol/L)48 h 组	156.79 ± 5.96 ^{ade}	0.96 ± 0.13 ^{ade}

^a: P < 0.05, 与泡沫细胞组比较; ^b: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁵ mol/L)24 h 组比较; ^c: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁵ mol/L)24 h 组比较; ^d: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁴ mol/L)12 h 组比较; ^e: P < 0.05, 与 NaHS(10⁻⁴ mol/L)24 h 组比较。

2.2 H₂S 对泡沫细胞内胆固醇流出的影响 与泡沫细胞组相比,NaHS(10⁻⁴、10⁻³ mol/L)处理 24 和 48 h 时间和浓度依赖的方式增加泡沫细胞胆固醇流出($P < 0.05$)。NaHS(10⁻⁵ mol/L)处理 12、24 和 48 h 及 NaHS(10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³ mol/L)处理 12 h 没有影响泡沫细胞胆固醇流出($P > 0.05$),见表 2。

2.3 H₂S 对泡沫细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达的影响 与泡沫细胞组相比,NaHS(10⁻⁴ 和 10⁻³ mol/L)处理 24 h 或 NaHS(10⁻⁴ mol/L)处理 48 h 均显著上调细胞中 ABCA1 mRNA 和蛋白表达($P < 0.05$),呈时间和浓度依赖性。NaHS(10⁻⁵ mol/L)处理 24 h 及 NaHS(10⁻⁴ mol/L)处理 12 h 细胞中 ABCA1 的表达与泡沫细胞组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1 和表 3。

3 讨 论

AS 发病机制十分复杂,至今尚未阐明。H₂S 具有改善血管内皮功能、调节平滑肌细胞凋亡和增殖、抑制血管重构、舒张血管和抗氧化等心血管保护作用^[6]。研究表明 H₂S 具有抗 AS 的作用,但机制没有完全阐明^[7]。研究发现 H₂S 可以延缓对 ApoE 基因敲除小鼠 AS 的进程,减小 AS 斑块^[8]。本研究结果表明 H₂S 降低了泡沫细胞内胆固醇和胆固醇酯的浓度,增加胆固醇的流出率。

在致病因素的作用下,单核巨噬细胞在血管内膜下吞噬过多的胆固醇和磷脂,特别是 ox-LDL,以脂滴的形式聚集在细胞内形成泡沫细胞^[9-10]。巨噬细胞摄取过多脂质并沉积于血管内膜下,本身是一种自我保护机制,关键是这些细胞摄取脂质后能否将其代谢并转运出去。细胞脂质摄取与流出的失衡是泡沫细胞形成的关键。ABCA1 在巨噬细胞胆固醇流出和 RCT 的过程中发挥十分重要的作用^[11]。研究发现 H₂S 能下调巨噬细胞 CD36 mRNA 和蛋白表达,减少 ox-LDL 摄取,抑制泡沫细胞形成^[12]。那么 H₂S 能否影响细胞 RCT,而发挥抗 AS 的作用? 本研究结果表明 H₂S 以剂量和浓度依赖方式上调了巨噬细胞性泡沫细胞中 ABCA1 mRNA 和蛋白的表达,并增加泡沫细胞中胆固醇流出。因此 H₂S 抗 AS 的作用可能与通过上调泡沫细胞中 ABCA1 表达并促进胆固醇流出有关。

参考文献:

[1] Karper JC, Ewing MM, Habets KL, et al. Blocking toll-like receptors 7 and 9 reduces postinterventional remodeling via reduced macrophage activation, foam cell formation, and migration[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): e72-e80.

[2] 饶春燕, 乐湘华. 硫化氢在炎症反应中的作用研究进展

[J]. *重庆医学*, 2012, 41(6): 609-611.

[3] Martelli A, Testai L, Breschi MC, et al. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery[J]. *Med Res Rev*, 2012, 32(6): 1093-1130.

[4] Chen Y, Zhao J, Du J, et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake via K(ATP) Channel and PI3K/Akt pathway[J]. *Life Sci*, 2012, 91(7/8): 271-278.

[5] Zhang H, Guo C, Wu D, et al. Hydrogen sulfide inhibits the development of atherosclerosis with suppressing CX3CR1 and CX3CL1 expression [J]. *PLoS One*, 2012; 7(7): e41147.

[6] Qiao W, Chaoshu T, Hongfang J, et al. Endogenous Hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 182-186.

[7] Mani S, Li H, Untereiner A. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis [J]. *Circulation*. 2013, 127(25): 2523-2534.

[8] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of Hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2): 173-179.

[9] Huang Z, Dong F, Li S, et al. Berberine-induced inhibition of adipocyte enhancer-binding protein 1 attenuates oxidized low-density lipoprotein accumulation and foam cell formation in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690(1/2/3): 164-169.

[10] 李华波. 普伐他汀与罗格列酮联合作用对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(7): 777-779.

[11] Ma L, Dong F, Zaid M, et al. ABCA1 protein enhances Toll-like receptor 4 (TLR4)-stimulated interleukin-10 (IL-10) secretion through protein kinase A (PKA) activation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(48): 40502-40512.

[12] Zhao ZZ, Wang Z, Li GH, et al. Hydrogen sulfide inhibits macrophage-derived foam cell formation [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(2): 169-176.

(收稿日期: 2013-04-05 修回日期: 2013-08-27)

(上接第 3595 页)

VO(2) (max) during prolonged high-altitude exposure [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 89(1): 29-37.

[25] Palmer BF. Physiology and pathophysiology with ascent to altitude[J]. *Am J Med Sci*, 2010, 340(1): 69-77.

[26] Wu TY, Ding SQ, Liu JL, et al. Smoking, acute mountain sickness and altitude acclimatisation: a cohort study[J].

Thorax, 2012, 67(10): 914-919.

[27] O'connor T, Dubowitz G, Bickler PE. Pulse oximetry in the diagnosis of acute mountain sickness[J]. *High Alt Med Biol*, 2004, 5(3): 341-348.

(收稿日期: 2013-06-05 修回日期: 2013-08-22)