论著

文章编号:1000-5404(2012)18-1822-04

高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白刺激下脂肪细胞 TNF-α 表达的影响

谢湘竹[1],赵水平[2],于碧莲[2],钟巧青[2] (100853 北京,解放军总医院南楼心血管一科[1];410011 长沙,中南大学湘雅二医院心内科[2])

[摘要] **目的** 观察高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,oxLDL)刺激下 3T3-L1 脂肪细胞肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)mRNA 表达的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 3T3-L1 脂肪细胞促分化成熟后,oxLDL 刺激脂肪细胞,给予不同浓度的 HDL(10 ~ 100 μg/ml),及 H-89(10 μmol/L) + HDL(100 μg/ml)干预,收集细胞,测定脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达水平,IκB 蛋白浓度及核因子-κB(NF-κB)活性。**结果** OxLDL刺激使 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达及 NF-κB 活性明显增强。HDL 浓度依赖性抑制 TNF-α mRNA 表达、NF-κB 活化和 IκB 降解。与 oxLDL 刺激组比较,100 μg/ml HDL 使 TNF-α mRNA 表达降低 64.5%,NF-κB 活性减少 49%,并明显增加 IκB 蛋白水平。HDL 的这些抗炎效应能被蛋白激酶 A(PKA)抑制剂 H-89 部分抑制。**结论** HDL 能抑制 oxLDL 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达,PKA-IκB-NF-κB 信号通路是其中作用途径之一,该效应不需要 HDL 与 oxLDL 的直接接触作用。

[关键词] 脂肪细胞;氧化型低密度脂蛋白;高密度脂蛋白;肿瘤坏死因子-α;核因子 κB;蛋白激酶 A

[中图法分类号] Q513.5;R329.26;R394.3 [文献标志码] A

High density lipoprotein suppresses oxidized low density lipoprotein-induced tumor necrosis factor-α in 3T3-L1 adipocytes

Xie Xiangzhu[1], Zhao Shuiping[2], Yu Bilian[2], Zhong Qiaoqing[2] ([1]First Department of Cardiology in South Building, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [2]Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410011, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of high density lipoprotein (HDL) on the mRNA expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α) in oxidized low density lipoprotein (oxLDL)-stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Methods** Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were incubated in the medium containing various concentrations of HDL (10 to 100 μg/ml) with oxLDL (50 μg/ml) stimulation, with/without H-89 (10 μmol/L) preincubation. TNF-α mRNA expression was determined by RT-PCR, NF-κB activity was measured by ELISA, and IκB protein level was tested by Western blotting. **Results** OxLDL stimulation induced a significant increase of TNF-α mRNA and NF-κB activity in 3T3-L1 adipocytes. HDL inhibited TNF-α mRNA expression, NF-κB activation and IκB degradation in a dose-dependent manner. Compared with oxLDL stimulation, HDL at 100 μg/ml resulted in a decrease of TNF-α mRNA expression by 64.5% and NF-κB activation by 49%, and an increase of IκB protein. The anti-inflammatory effect of HDL was abolished by PKA inhibitor H-89 partially. **Conclusion** HDL could suppress TNF-α mRNA expression in oxLDL-stimulated 3T3-L1 adipocytes through PKA- IκBα-NF-κB signaling pathway, without any direct contact between HDL and oxLDL.

[**Key words**] adipocytes; oxidized low density lipoprotein; high density lipoprotein; tumor necrosis factor-α; nuclear factor-kappa B; protein kinase A

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30470705). Corresponding author: Zhao Shuiping. E-mail: zhaosp@medmail.com.cn

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,目前认为,炎症反应参与了动脉粥样硬化发生、发展的所有阶段[1-2]。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)是一种炎症性细胞因子,在动脉粥样硬化的发病机制中具有重要作用。脂肪细胞和脂肪组织参与脂

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30470705)

[通信作者] 赵水平,E-mail: zhaosp@medmail.com.cn

质和能量代谢的同时,还参与了炎症反应,是内源性 TNF-α 的重要来源。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)除了参与形成泡沫细胞外,还在局部慢性炎症反应中起一定的作用[3],具有明确的致动脉粥样硬化的作用[4-5]。与 oxLDL 相反,HDL 被认为具有抗动脉粥样硬化及心血管保护作用[6-7],该效应部分地与其抗炎作用有关[8],但其具体机制尚不十分清楚。研究已经证实 HDL 参与调节脂肪细胞内脂质代谢,但 HDL 对脂肪细胞炎症反应调节的报道甚少。本研究观察 HDL 对 oxLDL 刺激状态下脂肪细胞炎症因子表达的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

3T3-L1 前脂肪细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院,氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)、高密度脂蛋白(HDL)购自美国 Sigma 公司,H-89 购自 Calbiochem 公司。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。细胞核蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒由碧云天生物技术研究所提供。NF-κB 活性检测试剂盒购自 Active Motif 公司。Anti-IκBα 及 anti-β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1 前脂肪细胞培养、诱导分化与鉴定 参见文献[9]的方法。

1.2.2 药物干预 脂肪细胞分化成熟后,用含 0.2% BSA 的无血清培养液饥饿疗法 24 h 后,分别用不同浓度 HDL(0、10、50、100 μg/ml)干预细胞,或以 H-89(10 μmol/L)预孵育 1 h 后再加入 HDL(100 μg/ml)干预,18 h 后,弃去培养基,以 PBS 洗涤细胞 2 次,再加入含 50 μg/ml oxLDL 培养基孵育 1 h。收取培养细胞 -70 ℃冻存备用。

1.2.3 TNF-α mRNA 表达水平的测定 用 TRIzol 一步法提取总 RNA,应用 RT-PCR 法检测 TNF-α mRNA 表达水平,引物序列为:上游 5′-GCCACCACGCTCTTCTG-3′,下游 5′-GGTGT-GGGTGAGGAGCA-3′,产物 342 bp;内参 GAPDH 引物序列为:上游 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游 5′-TCCACCAC-CCTGTTGCTGTA-3′,产物 439 bp。PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 50 s,50 ℃(TNF-α)、58 ℃(GAPDH)退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,循环 36 次,72 ℃终末延伸 10 min。反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,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 TNF-α mRNA 的表达量。

1.2.4 核蛋白提取及 NF-κB 活性检测 使用细胞核蛋白和细胞质蛋白抽提试剂盒提取核蛋白,BCA 法定量,-70 ℃保存备用,ELISA 法检测 NF-κB 活性。

1.2.5 Western blot 检测 IκB 的表达 取 75 μg 总蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳后将蛋白转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 4 ℃过夜,加入兔抗小鼠多克隆 I-κB 抗体室温下作用 2 h,然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔-IgG 抗体室温作用 1 h,BCIP/NBT 显色液显色,5 min 后蒸馏水终止反应。以 β-actin 作为内参。

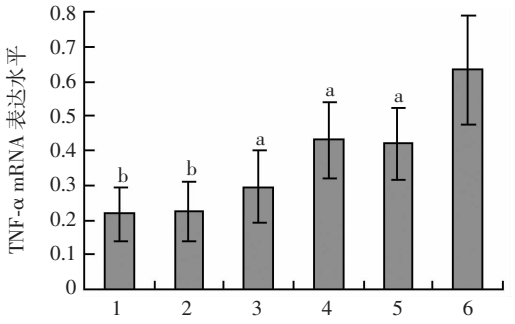
1.3 统计学方法

以上实验重复 3 次。应用 SPSS 11.5 统计软件包,指标进行正态性检验,正态分布的指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本间比较采用单因素方差检验。

2 结果

2.1 HDL 抑制 oxLDL 诱导的 TNF-α mRNA 表达水平

与空白组比较,oxLDL(50 μg/ml)刺激使 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达水平增高至 2.9 倍($P<0.001$)。HDL 呈剂量依赖性抑制脂肪细胞 oxLDL 诱导的 TNF-α mRNA 表达,与无 HDL 干预时 oxLDL 诱导的 TNF-α mRNA 表达水平比较,10、50、100 μg/ml HDL 分别显著抑制 TNF-α mRNA 表达 31.2%、53.2% 与 64.5%($P<0.05$)(图 1)。



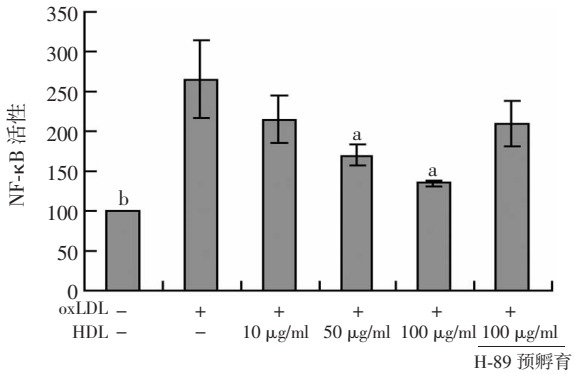
1:空白组;2:HDL100 μg/ml;3:HDL50 μg/ml;4:HDL10 μg/ml;5:HDL100 μg/ml + H-89;6:oxLDL

a: $P<0.05$,b: $P<0.001$,与 50 μg/ml oxLDL 比较

图 1 不同浓度 HDL 对 oxLDL 诱导的 TNF-α mRNA 表达水平的影响

2.2 HDL 抑制 oxLDL 介导的 NF-κB 活化和 IκB 降解

HDL 呈剂量依赖性抑制 oxLDL 诱导的脂肪细胞 NF-κB 活化。与 oxLDL 刺激组比较,50 μg/ml 和 100 μg/ml HDL 分别显著抑制 NF-κB 活性 35.8% 和 49%($P<0.05$)(图 2)。NF-κB 活化与胞质内 NF-κB 抑制子 IκB 的降解相关,由图 3 可以看出,HDL 也呈剂量依赖性抑制 IκB 降解。

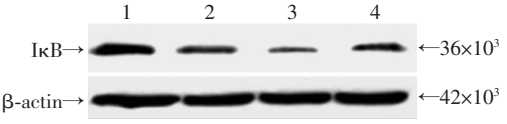


a: $P<0.05$,b: $P<0.001$,与 50 μg/ml + oxLDL 比较

图 2 不同浓度 HDL 对 NF-κB 活性的影响

2.3 PKA 抑制剂 H-89 减弱 HDL 的抗炎效应

与单用 HDL(100 μg/ml)干预 oxLDL 刺激的 3T3-L1 脂肪细胞组比较,联合使用 PKA 抑制剂 H-89(10 μmol/L)和 HDL(100 μg/ml)干预 oxLDL 刺激的 3T3-L1 脂肪细胞,使得脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达水平增加 30.7%($P<0.05$)(图 1),使 NF-κB 活性由(2.08 ± 0.44)增加至(3.22 ± 0.69)($P<0.05$)(图 2),而使 IκB 蛋白水平明显降低(图 3)。



1:HDL 100 μg/ml;2:HDL 100 μg/ml + H-89;3:HDL 10 μg/ml;4:HDL 50 μg/ml

图 3 不同浓度 HDL 对 IκB 表达的影响

3 讨论

近年来脂肪组织分泌的炎症性细胞因子引起人们极大的关注。有学者认为,CRP、IL-6 及 TNF-α 的水平与肥胖密切相关,并认为脂肪组织是低水平慢性炎症状态的重要决定因素[10-11]。还有研究[12-13]显示,肥胖时在脂肪组织过度表达的 TNF-α 及瘦素可能诱导 IL-6、CRP 及其他急性相反应物的产生,从而导致长期的慢性炎症状态,而这种慢性炎症状态可能与肥胖及其并发症的进展有关。我们以前的研究[14]发现,高胆固醇血症兔脂肪细胞 TNF-α 的分泌水平及皮下脂肪组织 TNF-α mRNA 的表达水平[12]均明显增高,且体外使用脂多糖(LPS)刺激脂肪细胞后其分泌的 TNF-α 水平亦明显增高[15]。而就 LDL 而言,目前研究[16-17]已经发现,LDL 及修饰后 LDL 均能明显刺激人单核/巨噬细胞 TNF-α 的表达,具有明显的促炎效应[18]。在本研究中,我们发现,体外使用 oxLDL 刺激同样能增强 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 的表达,提示 oxLDL 刺激也能造成脂肪细胞的体外炎症状态。

进一步,我们观察了 HDL 对 oxLDL 诱导下 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 表达水平的影响。我们发现,HDL 呈剂量依赖性抑制 oxLDL 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞 TNF-α mRNA 的表达,能直接对抗 oxLDL 的致炎效应,其体外干预实验表现出明显的抗炎作用。这就提示,HDL 可成为治疗动脉粥样硬化的新方法。

HDL 抑制 oxLDL 诱导的脂肪细胞 TNF-α 表达的确切分子机制目前尚不清楚。研究[19]显示,在 LDL 刺激导致人类单核细胞源性的巨噬细胞产生炎症状态的过程中,核因子 κB(NF-κB)起关键性作用。本研究中我们观察到,oxLDL 亦能明显增强 3T3-L1 脂肪细胞 NF-κB 活性,而 HDL 呈剂量依赖性抑制 oxLDL 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞 IκB 降解和 NF-κB 活化,且 HDL 的这种保护作用不需要其与 oxLDL 的直接接触。这就提示,HDL 的该效应与其对具有生物学活性的脂质的转运作用无关。更进一步我们发现,加入蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)抑制剂 H-89 后,IκB 的降解、NF-κB 的活化和 TNF-α 的表达均增强,提示抑制 PKA 能明显减弱 HDL 的抗炎效应。已有研究[20-22]显示,cAMP-PKA 信号通路活化后,能够通过稳定 IκB-α 从而减弱 NF-κB 的活性。基于以上研究结果,我们提出假想,HDL 通过活化 cAMP-PKA 信号通路,减少 IκB 降解,抑制 NF-κB 活化,从而对抗 oxLDL 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞的炎症反应。

由于 PKA 抑制剂 H-89 并未完全阻断 HDL 的抗炎作用,因此我们推测,可能还存在其他的信号通路参与了 HDL 的抗炎效应过程中,这还有待于更进一步的研究。

参考文献:

[1] Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. J Atheroscler Thromb, 2003, 10(2): 63-71.

[2] Badimon L, Storey R F, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis[J]. Thromb Haemost, 2011, 105 Suppl 1: S34-S42.

[3] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T E, *et al*. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity [J]. N Engl J Med, 1989, 320(14): 915-924.

[4] Lusis A J. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-241.

[5] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.

[6] Besler C, Heinrich K, Riwanto M, *et al*. High-density lipoprotein-mediated anti-atherosclerotic and endothelial-protective effects: a potential novel therapeutic target in cardiovascular disease[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(13): 1480-1493.

[7] Libby P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein[J]. Am J Cardiol, 2001, 88(12A): 3N-8N.

[8] Feig J E, Shamir R, Fisher E A. Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport[J]. Curr Drug Targets, 2008, 9(3): 196-203.

[9] 谢湘竹, 赵水平, 于碧莲, 等. HDL 和 ApoA-I 模拟肽对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1034-1038.

[10] Yudkin J S, Stehouwer C D, Emeis J J, *et al*. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(4): 972-978.

[11] Galic S, Oakhill J S, Steinberg G R. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 316(2): 129-139.

[12] Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, *et al*. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression[J]. Obes Res, 2003, 11(4): 525-531.

[13] Lionetti L, Mollica M P, Lombardi A, *et al*. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflam-

mation[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19(2): 146-152.
[14] Zhao S P, Wu J. Fenofibrate reduces tumor necrosis factor-alpha serum concentration and adipocyte secretion of hypercholesterolemic rabbits[J]. Clin Chim Acta, 2004, 347(1/2): 145-150.
[15] Zhao S P, Wu Z H, Wu J, *et al*. Effect of atorvastatin on tumor necrosis factor alpha serum concentration and mRNA expression of adipose in hypercholesterolemic rabbits[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005, 46(2): 185-189.
[16] Barath P, Cao J, Forrester J S. Low density lipoprotein activates monocytes to express tumor necrosis factor[J]. FEBS Lett, 1990, 277(1/2): 180-184.
[17] Jovinge S, Ares M P, Kallin B, *et al*. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16(12): 1573-1579.
[18] Chavez-Sanchez L, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet M V, *et al*. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1β, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 117.
[19] Hakala J K, Lindstedt K A, Kovanen P T, *et al*. Low-density lipoprotein modified by macrophage-derived lysosomal hydrolases induces expression and secretion of IL-8 *via* p38 MAPK and NF-kappaB by human monocyte-derived macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(11): 2504-2509.
[20] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, *et al*. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway[J]. Circulation, 2000, 102(11): 1296-1301.
[21] Solt L A, May M J. The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signaling[J]. Immunol Res, 2008, 42(1/3): 3-18.
[22] Gerlo S, Kooijman R, Beck I M, *et al*. Cyclic AMP: a selective modulator of NF-κB action[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(23): 3823-3841.

(**收稿**:2012-03-16;**修回**:2012-05-03)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2012)18-1825-01

个案与短篇

以反复发作性偏侧肢体无力为主要表现的脑梗死1例

郑宗菊,李光勤 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[**关键词**] 脑梗死;内囊警示综合征;TIA
[**中图法分类号**] R743.33 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,34岁,因"突发右侧肢体无力40 min"于2012年2月23日入院。入院前40 min,患者突发右侧肢体无力伴吐词不清、右侧肢体麻木。入院后查体:右侧中枢性面舌瘫,右侧肢体肌力0级,右侧偏身感觉减退,右侧Babinski征(+)。急诊头颅CT平扫未见异常。NIHSS评分:12分。入院后立即给予氯吡格雷75 mg/d和阿司匹林300 mg/d双重抗血小板治疗,并拟行rt-PA静脉溶栓治疗。症状持续72 min后完全缓解,考虑TIA,暂停溶栓治疗。间隔14 min后,上述症状第2次发作,查体右侧肢体肌力0级,右侧病理征阳性,持续48 min后完全缓解。加用阿托伐他汀(立普妥)40 mg/d治疗。间隔49 min后,上述症状第3次发作,查体:右上肢肌力0级,右下肢肌力Ⅲ级。第3次发作后80 min时(距第1次发作4 h 28 min)症状未缓解,给予rt-PA 50 mg(0.7 mg/kg,患者体质量75 kg)静脉溶栓治疗(先静推10%,余剂量1 h内静脉滴注),溶栓开始后20 min症状缓解,查体见右上肢肌力Ⅴ级,右下肢肌力Ⅳ级。溶栓结束后20 min症状第4次发作,查体见右侧肢体肌力0级,持续约5 min后,右侧上下肢肌力恢复至Ⅴ⁻级。溶栓治疗结束后30 min及2 h,症状第5次和第6次发作,发作时查体见右侧肢体肌力均为0级,分别持续60 min和30 min后完全缓解。患者当天共发作6次,溶栓前发作3次,溶栓过程中发作1次,溶栓结束后发作2次,此后症状未再发作,但诉触摸右侧偏身时有麻木不适感,客观检查感觉正常。患者否认高血压、糖尿病、冠心病病史,吸烟15年(20支/d),偶有饮酒。入院后查血脂提示TC 4.32 mmol/L(0~5.20 mmol/L),TG 2.40 mmol/L(0.35~1.70 mmol/L),LDL-c 2.46 mmol/L(1.60~3.60 mmol/L),HDL-c 1.01 mmol/L(0.90~1.80 mmol/L)。查同型半胱氨酸为16.1 μmol/L(0~14.0 mmol/L)。心脏彩超提示左室肥大。头颈部CTA提示双侧颈内动脉颅外段及椎动脉走形迂曲,余主要大血管未见明显异常。发病后32 h作头颅MRI平扫提示左侧基底节区新鲜梗死灶,DWI序列呈高信号(图1A)。发病后6 d复查头颅MRI提示病灶范围变化不大,DWI信号降低(图1B),治疗11 d痊愈出院。

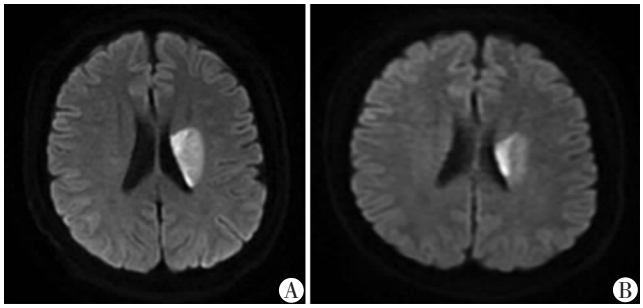


图1 脑梗死患者发病后32 h(A)及6 d(B) MRI表现

[**通信作者**] 李光勤, E-mail:liguangqin@tom.com

(下转1830页)