基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0718-03

罗格列酮对急性冠脉综合征患者外周血单核细胞 ABCA1 蛋白表达的干预

苟连平[1,2],秦 俭[1],吕 湛[2],凡瞿明[3],程田兵[3],冯 静[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016;2. 川北医学院附属医院心内科;3. 临床检验中心,南充 637000)

【摘 要】目的:研究罗格列酮对急性冠脉综合征(Acute coronary syndrome,ACS)患者外周血单核细胞 ABCA1 蛋白表达的影响。方法:选取 ACS 患者 21 例,密度梯度法分离外周血单核细胞。实验分为:(1)不同终浓度(0 μmol/L、1.0 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L)罗格列酮分别与单核细胞孵育 24 h。(2)选定 10 μmol/L 终浓度罗格列酮分别与单核细胞孵育不同时间(0 h、6 h、12 h、24 h)。(3)PBS 对照组。每组单核细胞各培养 3 孔为测定孔,均同时设空白 1 孔。孵育结束后用流式细胞技术检测单核细胞 ABCA1 蛋白的表达水平。结果:与对照组比,单核细胞在罗格列酮作用后,其 ABCA1 蛋白表达呈浓度和时间依赖性增加。结论:罗格列酮能提高 ACS 患者外周血单核细胞 ABCA1 蛋白的表达,可能为罗格列酮抗动脉粥样硬化的重要机制之一。

【关键词】急性冠脉综合征;外周血单核细胞;ABCA1 蛋白;罗格列酮

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-25

The interventional effect of rosiglitazone on the expression of protein ABCA1 in peripheral blood mononuclear cells in patients with acute coronary syndrome

GOU Lian-ping, et al

(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the interventional effect of rosiglitazone on the expression of protein ABCA1 (ATP-binding cassette transporter-1) in peripheral blood monocytes(PBMC) in patients with acute coronary syndrome(ACS). *Methods*: Twenty-one patients with ACS were enrolled in the study. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation. The experiments included: (1) Rosiglitazone of different final concentrations(0 μmol/L, 1.0 μmol/L, 10 μmol/L, 100 μmol/L)were incubated with PBMCs for 24h. (2) Rosiglitazone of the chosen final concentration of 10 μmol/L was incubated with PBMCs for 0 h, 6 h, 12 h and 24 h, separately. (3) Control groups were also set (cells treated with PBS). Three wells served as measured wells. And one well acted as blank well in each group. Then the level of protein ABCA1 was determined by flow cytometry after incubation. *Results*: Compared with control groups, after PBMCs were intervened by rosiglitazone, the expression of protein ABCA1 of PBMCs increased in dose-and timedepe-ndent manners. *Conclusion*: Rosiglitazone can increase the expression of protein ABCA1 of PBMCs, which may be one of the possible mechanisms for rosiglitazone to play an anti-atherosclerotic role.

【Key words】Acute coronary syndrome; Peripheral blood mononuclear cell; Protein ABCA1; Rosiglitazon

ATP 结合盒转运蛋白 A1(ATP- binding cassette transport protein A1, ABCA1)是胆固醇逆向转运(Reverse cholesterol transport, RCT)的第一步限速蛋白,在胆固醇逆向转运中发挥重要作用[1],因此,ABCA1 蛋白成为预防或逆转动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的重要干预靶点。有关噻烷二酮类代表药物罗格列酮的研究表明,在细胞水平上,它作为过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)γ 激动剂,能增加 THP-1 细胞 ABCA1 蛋白的表达[2]。在动物实验上,它对高脂血症兔 AS 具有防治作用[3],但尚不知罗格列酮对急性冠脉综合征(Acute coronary syndrome, ACS)患者外周血单核细胞 ABCA1 蛋白表达的影响如何,本文旨在对此进行研究。

作者介绍:苟连平(1972-),男,硕士,研究方向:动脉粥样硬化机制。

通讯作者:秦 俭,女,副教授,E-mail:hjqj2001@yahoo.com.cn。

基金项目:四川省教育厅自然科学基金(2004A076)。

1 材料、对象与方法

1.1 研究对象

收集 2007 年 1 月至 2007 年 3 月我科收治的ACS 患者 21 例，其中，急性心肌梗死 11 例，典型不稳定性心绞痛 10 例。研究对象入选标准：①急性心肌梗死：根据 WHO 诊断标准，胸痛持续至少 30 min，至少有相邻 2 个导联 ST 段抬高超过 0.2 mV、血清肌酸磷酸激酶同工酶水平升高超过正常值水平上限的 2 倍以上及肌钙蛋白 I 超过正常值上限 2 倍以上（肌钙蛋白 I 正常范围为 0~0.4 ng/ml）。②不稳定性心绞痛：不稳定心绞痛是介于稳定性心绞痛和急性心肌梗死之间的一组临床心绞痛综合征。根据中华医学会心血管病学分会的诊断标准[4]，不稳定性心绞痛为患者入院前有典型心绞痛发作，同时心电图示 ST 段水平型或下斜型压低≥1 mm 或 ST 段抬高（肢体导联≥1 mm，胸导联≥2 mm），入院后急查心肌酶谱及肌钙蛋白值在正常范围内。以下为排除标准：肝肾功能不全、心力衰竭，合并肿瘤、创伤、感染、内分泌疾病、自身免疫性疾病、周围血管病变、糖尿病等。

1.2 试剂与仪器

罗格列酮（购自美国 Sigma 公司）；鼠抗人单克隆 ABCA1 一抗（abcam，registered in England，number：3509322）；FITC 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗（美国进口，分装，购自北京中杉金桥生物技术有限公司）；淋巴细胞分离液 LTS1007（Ficoll 液）（购自中国医学科学院生物工程研究所灏洋生物）；BD FACS Calibur 三色流式细胞仪（美国 Becton Dickinson 公司）。

1.3 方法

1.3.1 人外周血单核细胞（Peripheral blood monocytes，PBMC）的制备 参见李华波等的方法[5]。于晨起空腹时抽取肘静脉抗凝血 20 ml，等体积 Hank·s 液稀释，徐徐加至密度为 1.007 的 20 ml Ficoll 液面上，2 000 r/min 离心 20 min，吸出乳白色层，用 Hank·s 液洗涤 3 次（1 500 r/min 离心 5 min）；台盼蓝染色，计数活细胞数>95%，重悬于 RPMI1640 培养基，置于 37℃ 5%CO_2 培养箱 2 h；用 37℃预热的培养基清洗 2 次，将未贴壁细胞洗脱，贴壁细胞以瑞氏染色鉴定为单核细胞，占 90%以上；将贴壁细胞用细胞刮片轻轻刮下，调整细胞浓度为 1×10^5 个 /ml 备用。

1.3.2 实验设计 将分离培养的细胞浓度为 1×10^5 个 /ml 的 PBMCs 分为：对照组（PBS 处理）、不同浓度罗格列酮处理组（终浓度分别为 1.0 μmol/L、10 μmol/L、100 μmol/L，处理时间为 24 h）和不同时间罗格列酮处理组（据预实验确定终浓度为 10 μmol/L，处理时间分别为 6 h、12 h、24 h），各组分别按罗格列酮不同浓度或不同处理时间命名。每组单核细胞各培养 3 孔为测定孔，均同时设空白 1 孔，于 6 孔培养板置 37℃、5%CO_2 细胞培养箱孵育，以备流式细胞技术检测。

1.3.3 流式细胞术测定 ABCA1 蛋白 各组测定孔细胞经 4%多聚甲醛室温下固定 30 min，再用含 1%小牛血清的 PBS 洗 3 遍，每次 5 min，加入含 1% 小牛血清、1.5%ABCA1 一抗的 PBS，置室温 60 min，用含 1%小牛血清的 PBS 洗 3 遍，加 1:200 FITC 标记的羊抗鼠二抗，室温避光反应 30 min，含 1%小牛血清的 PBS 洗 3 遍后，移入测试管。流式细胞仪收集 10 000 个细胞/份。测定各空白孔时以 PBS 代替一抗，余条件同各组测定孔。采用 488 nm 的激发波长，利用门技术，Cell Quest 分析软件，测定细胞荧光强度。各组测定孔细胞荧光强度值减去相应空白孔细胞荧光强度值为平均荧光强度，代表该组细胞 ABCA1 蛋白表达水平。

1.4 统计方法

应用 SPSS 10.0 统计软件包进行分析。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用方差分析及 t 检验，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 ACS 患者外周血单核细胞经不同浓度罗格列酮处理 24 h 后 ABCA1 蛋白的表达

ACS 患者外周血单核细胞在对照组（即 PBS 处理组）有一定的 ABCA1 蛋白表达，经不同浓度罗格列酮处理 24 h 后，其表达呈浓度依赖性增多，其中 10 μmol/L、100 μmol/L 两组较对照组差异有统计学意义；10 μmol/L 组较 1.0 μmol/L 差异有统计学意义。见表 1。

表 1 ACS 患者外周血单核细胞受不同浓度罗格列酮处理 24 h 后 ABCA1 蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	ABCA1 蛋白表达
对照组（0 μmol/L）	3.096 ± 0.230
1.0 μmol/L 组	3.159 ± 0.253^{a}
10 μmol/L 组	$3.977\pm0.174^{b,c}$
100 μmol/L 组	$4.662\pm0.518^{b,c,d}$

注：*a*.与 0 μmol/L 罗格列酮组比较，$P>0.05$；*b*.与 0 μmol/L 罗格列酮组比较，$P<0.05$；*c*.与 1 μmol/L 罗格列酮组比较，$P<0.05$；*d*.与 10 μmol/L 罗格列酮组比较，$P>0.05$

表 2 ACS 患者外周血单核细胞受 10 μmol/L 终浓度罗格列酮处理不同时间后 ABCA1 蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$）

分组	ABCA1 蛋白表达
对照组（0h）	3.096 ± 0.230
6 h 组	3.627 ± 0.358^{a}
12 h 组	$4.150\pm0.123^{b,c}$
24 h 组	$4.613\pm0.296^{b,c,d}$

注：a.与 0 h 罗格列酮组比较，$P<0.05$；b.与 0 h 罗格列酮组比较，$P<0.01$；c.与 6 h 罗格列酮组比较，$P<0.01$；d.与 12 h 罗格列酮组比较，$P<0.05$

2.2 ACS 患者外周血单核细胞受终浓度为 10 μmol/L 罗格列酮处理不同时间后 ABCA1 蛋白的表达

10 μmol/L 罗格列酮处理 ACS 患者外周血单核细胞 6 h、12 h 和 24 h 后，ABCA1 蛋白表达呈时间依赖性增多，较对照组均有显著差异；12 h 组较 6 h 组有显著差异；24 h 组与 12 h 组比较亦有显著差异。见表 2。

3 讨 论

高密度脂蛋白(High density lipoprotein,HDL)是唯一抗 AS 的脂蛋白，一方面它可直接保护动脉血管[6]，另一方面参与 RCT 而降低荷脂巨噬细胞内胆固醇及磷脂水平，而 ABCA1 蛋白是 HDL 介导 RCT 的第 1 步，具有抗 AS 作用[7]。ABCA1 蛋白介导 RCT 分两步：第 1 步，正常外周细胞膜上的 ABCA1 介导细胞内的磷脂流出，并与细胞外的载脂蛋白 AI (apoAI)结合形成盘状的磷脂 - apoAI 复合物。第 2 步，细胞内的胆固醇通过扩散跨膜流出，被前述复合物捕获，形成前 β HDL，在卵磷脂胆固醇脂酰转移酶作用下，转变成富含胆固醇脂的球状的成熟 HDL，这表明 ABCA1 间接作为胆固醇流出的调节蛋白，与 HDL 的合成有关[8]，因而 ABCA1 蛋白成为抗 AS 药物作用靶点之一。

近来研究发现，PPAR γ 的人工合成配体罗格列酮能上调 ABCA1 蛋白的表达[9,10]，至于它能否增加 ACS 病人 ABCA1 蛋白表达，有关研究较少。本实验以不同浓度罗格列酮作用于 ACS 患者外周血单核细胞，观察 24 h 后 ABCA1 蛋白的表达情况，结果显示，罗格列酮能呈剂量依赖性增加 ABCA1 蛋白的表达，10 μmol/L 和 100 μmol/L 组与对照组差异显著。因此本实验选定罗格列酮终浓度为 10 μmol/L，进一步观察它作用于 ACS 患者外周血单核细胞不同时间(6 h、12 h 和 24 h)后 ABCA1 蛋白的表达。结果表明，罗格列酮能呈时间依赖性增加 ABCA1 蛋白的表达，且每个不同时间点的表达均较对照组有显著差异。

1.0 μmol/L 组与 0 μmol/L 组比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，100 μmol/L 组与 10 μmol/L 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)；而 100 μmol/L 组、10 μmol/L 组与 1 μmol/L 组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，这提示罗格列酮浓度过低不足以使 ABCA1 蛋白表达，浓度过高不使 ABCA1 蛋白表达显著增多。在一定范围内，随着罗格列酮浓度增加，ABCA1 蛋白表达亦增加。同时，观察在同一浓度 10 μmol/L 作用下，6 h 组、12 h 组、24 h 组与 0 h 组比较，12 h 组、24 h 组与 6 h 组比较，24 h 组与 12 h 组比较，差异有统计学意义($P<0.05\sim0.01$)，这意味着罗格列酮与单核细胞作用越久，ABCA1 蛋白表达亦多。

至于罗格列酮致 ABCA1 蛋白表达的机制，国外研究表明，ABCA1 基因启动子区存在 DR-4、锌脂蛋白 202(ZNF202)、TATA-box、GC-box、E-box、Spl 等调控元件。胆固醇和(或)cAMP 刺激 SP1、E-box 结合因子等结合到近侧启动子；而来源于脂蛋白的固醇或氧化固醇通过刺激肝 X 受体(Liver X receptor,LXR)/视黄酸 X 受体(Retinoid X receptor,RXR)与启动子区的 DR-4 结合，从而诱导 ABCA1 基因的转录。LXR/RXR 属于核受体超家族，与配体结合形成二聚体后结合到 ABCA1 基因启动子的识别序列 DR-4(DR-4 元件是由 4 个碱基对分隔的重复 TGACCA)上，促进靶基因的转录[11]。PPAR γ 被罗格列酮活化后被靶基因 LXR 内部的 PPAR 反应元件(称为 DR1 或 DR2，由 1 个碱基对分隔的重复 AGGTCA)识别而激活 LXR，LXR 与 ABCA1 基因启动区的 LXR 反应元件结合到 ABCA1 基因启动子的识别序列 DR-4 上，从而上调 ABCA1 蛋白表达[12]，即通过 PPAR-LXR -ABCA1 路径而实现。因此，PPARa 和 PPAR γ 激动剂很可能是间接通过活化 LXR/RXR 途径来上调 ABCA1 基因转录的[13]。就 ABCA1 蛋白表达增多的效应如何，Singaraja 等[14]和 Vaisman[15]等的转基因研究表明，ABCA1 过度表达可使 apoAI 介导的胆固醇流出明显增加，HDL 水平显著升高。故促进 ABCA1 蛋白的表达，可促进胆固醇 RCT，可能对 AS 的防治具有重要意义。

本研究在细胞水平显示，罗格列酮在本实验条件下呈剂量依赖性和时间依赖性升高 ACS 患者外周血单核细胞 ABCA1 蛋白的表达。进一步研究其作用机制及在体效应，将为临床更好防治 AS 和 ACS 提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Soumian S, Gibbs R, Davies A, et al. mRNA expressed of genes involved in lipid efflux and matrix degradation in occlusive and ectatic atherosclerotic disease[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(12): 1255-1260.

[2] 吕 湛，陈运贞. 过氧化物酶体增质体活化受体 γ、肝脏 X 受体 α、视黄酸 X 受体 α 活化对 THP-1 细胞 ATP 结合盒转运蛋白和

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0721-04

西洛他唑对糖尿病模型大鼠勃起功能的影响

窦红珍[1],肖明朝[1],苟 欣[1],李国秧[2],李 静[3]
(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2.重庆市神经病学重点实验室;
3.重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨西洛他唑对糖尿病模型大鼠勃起功能的影响。方法:50 只 SD 雄性大鼠腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病动物模型,成模 8 周后随机分为糖尿病对照组(DM 组)和西洛他唑治疗组(CI 组),同时喂养 10 只大鼠为正常对照组(C 组)。各组动物灌服西洛他唑[20 mg/(kg·d)]或者 NS。灌胃处理 8 周后用阿朴吗啡(Apomorphine,APO)诱导法观察勃起功能,用电生理方法测定坐骨神经的运动神经传导速度(Motor merve conduction velocity,MNCV);并取阴茎海绵体组织用比色法检测一氧化氮合酶(Nitric oxide synthaes,NOS)水平,用 TUNEL 法观察阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡情况。结果:与 DM 组相比,CI 组的勃起功能、MNCV、NOS 水平明显改善,凋亡指数显著降低($P<0.05$)。结论:西洛他唑对 DM 大鼠勃起功能的下降具有明显治疗作用。

【关键词】糖尿病;勃起功能;凋亡;西洛他唑
【中国图书分类法分类号】R698.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-28

The effect of cilostazol on erectile function in diabetic rat model

DOU Hong-zhen, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the effect of cilostazol on erectile function in diabetic rat model. *Methods*:Diabetes were induced in 50 male adult sprague-dawley (SD) rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin. The DM rats were randomly divided into diabetic group(DM group)and cilostazol therapy group(CI group) 8 weeks after the injection (another 10 normal SD rats as control, C group).The rats in each group were treated with cilostazol [20 mg/(kg·d)] or NS through a gastric perfusion for 8 weeks.Then the erectile function of all these rats was evaluated by apomorphine. Motor nerve conduction veloc-

作者介绍:窦红珍(1981-),男,硕士,
研究方向:勃起功能障碍。
通讯作者:肖明朝,男,副教授,E-mail: Xmz.2004@163.com。

CD36mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理学杂志,2004,20(8):1381-1384.
[3] 罗 丰,王朝晖.罗格列酮对兔动脉粥样硬化血脂和组织总抗氧化能力的影响[J]. 临床心血管病杂志,2006,22(05):295-297.
[4] 中华医学会心血管病学分会 中华心血管病杂志编辑委员会.不稳定性心绞痛诊断和治疗建议[J].中华心血管病杂志,2000,28(6):409-412.
[5] 李华波,全智华,杨 薪,等.罗格列酮对冠心病患者外周血单核细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(8):685-688.
[6] Naval M, Van Lenten B J, Reddy S R, et al. High-density lipoproteion and the dynamics of atherosclerotic lesions[J].Circulation, 2001, 104(20):2386-2387.
[7] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al.The gene encoding ATP binding cassette transporter lismutated in Tangier disease[J]. Nat Genet, 1999, 22(4):347-351.
[8] McNeish J, Aiello R J, Guyot D, et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accu- mulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassettetransporter-1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8):4245-4250.
[9] 苟连平,吕 湛,秦 俭.腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 A1 在动脉粥样硬化中的作用及其受控特点[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1943-1946.
[10] Goldberg R B. Impact of thiazolidenediones on serum lipoprotein levels[J]. Curr Atheroscler Rep, 2006, 8(5):397-404.
[11] Wade D P, Owen J S.Regulation of the cholesterol efflux gene, ABCA1[J].Lancet, 2001, 357(9251):161-163.
[12] Ruan X Z, Moorhead J F, Fernando R, et al.PPAR agonists protect mesangial cells from interleukin 1-induced intracellular lipid accumnlation by activating the ABCA1 cholesterol efflux pathway[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(3):593-600.
[13] Chinett 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):53-58.
[14] Singaraja R R, Fievet C, Castro G, et al. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis[J]. Clin Genet, 2002, 61(2):115-125.
[15] Vaisman B L, Lambert G, Amar M, et al.ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteienmia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice[J]. J Clin Invest, 2001, 108(2):303-309.

(责任编辑:冉明会)