DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.022
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
924 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0924-04

PPARα、γ配体对单核细胞来源的巨噬细胞的作用观察

舒茂琴[1],何作云[2],王国超[1],方玉强[3],李晓霞[4] (第三军医大学:[1]附属西南医院心血管内科,重庆 400038;[2]附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[3]基础医学部微生物学教研室,重庆 40038;[4]解放军总医院临床检验中心,北京 100853)

提 要:目的 探讨PPARα和γ配体在动脉粥样硬化病变局部的作用。方法 观察PPARα和γ配体对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)介导的巨噬细胞清道夫受体A(SRA)基因表达、肿瘤坏死因子(TNF-α)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)释放、细胞增殖与凋亡的影响。结果 中低浓度的PPARα和γ配体不但增强ox-LDL介导的巨噬细胞TNF-α、MMP-9表达,而且有促细胞凋亡和抗细胞增殖的作用;PPARγ配体不但能显著增加巨噬细胞PPARγ mRNA表达,而且还能抑制ox-LDL介导的巨噬细胞SRA。结论 PPARα和γ基因激活可能有抗炎和抗细胞增生的作用,后者可能还有助于减少粥样斑块脂质内容。

关键词:核受体;泡沫细胞;细胞凋亡;单核巨噬细胞
中图法分类号:R392.11;R541.4 文献标识码:A

Effects of PPARα and γ ligands on monocyte-derived macrophages

SHU Mao-qin, HE Zuo-yun, WANG Guo-chao, FANG Yu-qiang, Li Xiao-xia (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To probe the roles of the ligands of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) and PPARγ in the pathogenesis of atheroma lesion. Methods The effects of PPARα and γ ligands on expressions of scavenger receptor A (SRA) gene, release of cytokines (TNF-α and MMP-9) and the cell growth and apoptosis induced by ox-LDL were analyzed. Results (1) Both PPARα and γ ligands not only promoted macrophage cells apoptosis and inhibited the cells growth, but also decreased the expression of TNF-α and MMP-9 protein induced by ox-LDL; (2) PPARγ ligand not only significantly lowered macrophages SRA gene expression induced by ox-LDL, but also increased macrophages PPARγ mRNA expression, while PPARα gene expression had no effects of SRA gene expression induced by ox-LDL. Conclusion PPARα and PPARγ gene translation may suppress cell growth and inflammatory reaction, and the latter may be helpful for lowering lipid contents of atheromatous plaque.

Key words: nuclear receptor; foam cell; apoptosis; monocyte-macrophage cell

核受体过氧化酶体增殖激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)包括PPARα、β、γ,经配体激活途径发挥作用,抗糖尿病噻唑烷二酮类属PPARγ配体,贝特类降脂药属PPARα配体,这两类药物能调节血脂水平[1,2],但在血管局部的作用知之甚少。研究表明PPARα和γ基因能调节脂代谢及细胞因子基因转录[3,4],而巨噬细胞在动脉粥样硬化形成过程中最突出的变化是脂代谢及细胞因子表达的变化。研究显示单核巨噬细胞通过清道夫受体A(Scavenger receptor A, SRA)途径,摄取氧化修饰的低密度脂蛋白(ox-LDL),导致细胞内大量胆固醇酯积聚是泡沫细胞形成的主要机制,因此我们比较PPARα、γ配体对巨噬细胞SRA基因表达、细胞因子释放以及生长状态的作用,以探讨PPARα、PPARγ配体在血管病变局部的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及分组

细胞培养:U937-人类单核细胞株,采用10%胎牛血清RPMI1640培养基进行细胞培养。细胞生长达一定数量后分瓶,置细胞于6孔培养板中,加PMA(100 ng/ml)入细胞培养液12 h,使悬浮生长的未分化细胞分化成贴壁生长的巨噬细胞。调整细胞数为1×10^6/ml,加入24孔培养板或75 cm^2培养瓶,更换无血清培养基,加入干预因子4 h后,继续与ox-LDL或空白对照培养48 h,观察有关指标的变化。75 cm^2培养瓶所得的细胞用于Northern印记杂交,每组6个标本混匀使细胞总数大于1×10^8/ml。

分组:本研究选择的PPARγ配体为曲列格酮,PPARα配体为吉非贝齐。将分化后的单核巨噬细胞分为对照组、ox-LDL组、曲列格酮+ox-LDL组、吉非贝齐+ox-LDL组。

1.2 LDL氧化修饰的方法

参照Calvo等[5]方法:3 mg/ml LDL(蛋白含量)+20 μmol/L $CuSO_4$ 37 ℃水浴作用20~24 h,加入0.1 μmol/L的EDTA冷却即可。

1.3 细胞增殖、凋亡的测定

参照碘化丙啶染色法,利用DNA荧光染色及细胞光散射特点,流式细胞仪记录细胞周期、并将凋亡细胞及坏死细胞区别开来。处理后的细胞离心留置100 μl细胞悬液,75%酒精固定4 ℃保存待用。测定时用PBS清洗1~2次,加RNA酶37 ℃ 30 min消化细胞,加入碘化丙啶与消化后的细胞反应30 min以上,测定各细胞周期-G_1、G_0、S和G_2+M期的比例。S+G_2/M期为细胞增殖指数,代表细胞增殖变化,G_1峰左侧出现的亚二倍体的小峰(AP峰)为凋亡细胞数目。

1.4 细胞涂片免疫荧光染色方法

采用间接荧光染色法:培养细胞制成细胞悬液,均匀涂在

作者简介:舒茂琴(1965-),女,四川省仁寿县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事高脂血症和动脉粥样硬化发病机制的研究,发表论文20余篇。电话:(023)65387390

收稿日期:2001-08-25;修回日期:2002-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多聚赖氨酸处理后的载玻片上, 固定、烤干, 细胞涂片密封－20 ℃保存待用。取制备好的细胞涂片采用 PBS 洗 2 次, 10% 羊血清反应 15～20 min 以消除非特异性干扰, 吸干血清加入 1∶50 稀释的一抗, 37 ℃湿盒作用 1 h, PBS 洗 2 次, 滴加 FITC 标记的二抗, 37 ℃作用 1 h, 清水冲洗 3 次, 封固细胞涂片, 共聚焦显微镜检查。

1.5　cDNA 探针合成、总 RNA 提取、同位素标记及 Northern 印记杂交

2 种 cDNA 探针序列如下: SRA 为 5′-CCC ACT TCA GGA GTT GAG CTG GCA TTA TTG CGA TSA GAGG-3′; PPAR-γ 为 5′-TCC GCC CAA ACC TGA TGG CAT TAT GAG ACA TCC CCA CAGC-3′, 其合成纯化由上海生物化学研究所完成; 放射性同位素^{32}P 标记, 参照 Boehringer 公司提供的 DNA 5′末端标记试剂盒的操作说明进行, [γ-^{32}P] ATP 由北京亚辉生物医学工程公司提供; Northern 杂交参照分子克隆实验指南(第 2 版)进行。

1.6　统计学处理

计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表达, 统计学处理采用 Microsoft excel 软件在计算机上进行方差分析, t 检验。

2　结果

2.1　PPARα 和 γ 配体对细胞凋亡和增殖的影响

对照组约 15% 的单核巨噬细胞为增殖期(S＋G_2/M 期)细胞, 45% 的细胞为凋亡期细胞。ox-LDL 均能显著抑制细胞凋亡、促进细胞增殖, 而 PPARγ 配体曲列格酮, PPARα 配体吉非贝齐均能阻止 ox-LDL 的作用, 见表 1。本研究凋亡细胞比例较高, 可能与采用无血清培养时间较长(48 h)有关。本研究显示当 ox-LDL 20 μg/ml 时, 继续增加浓度并不能显著增强其作用, 而当吉非贝齐 6 mmol/L、曲列格酮 50 μmol/L 时, 继续增加浓度, 严重影响了细胞生长, 故我们选择这些浓度作为研究观察指标。

表 1　各组细胞凋亡及增殖变化

Tab 1　Changes of cell apoptosis and growth in different groups

Group	Apoptosis cells(%)	S＋G_2/Mcells(%)
Contiol	45. 8＋6. 4	15. 6＋4. 7
ox-LDL	15. 7＋4. 8 *	25. 4＋5. 9 *
Gemf＋ox-LDL	69. 3＋11. 5△	10. 3＋3. 7△
Treg＋ox-LDL	57. 8＋3. 2△	12. 4＋4. 1△

*: $P<0.05$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* ox-LDL group; total cell number× 10^4

2.2　激光共聚焦显微镜观察细胞涂片荧光抗体染色情况

对照组抗巨噬细胞抗体(CD68)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)以及 SRA 荧光抗体阳性染色细胞比例较高, ox-LDL 增加了 TNF-α、MMP-9 表达, 而吉非贝齐或曲列格酮的作用则相反。ox-LDL 也显著增加 SRA 表达, 曲列格酮则抑制其表达。CD68 和 SRA 在细胞膜表达, TNF-α 和 MMP-9 为典型的胞质染色, 呈"月牙型或肾型"改变见图 1。

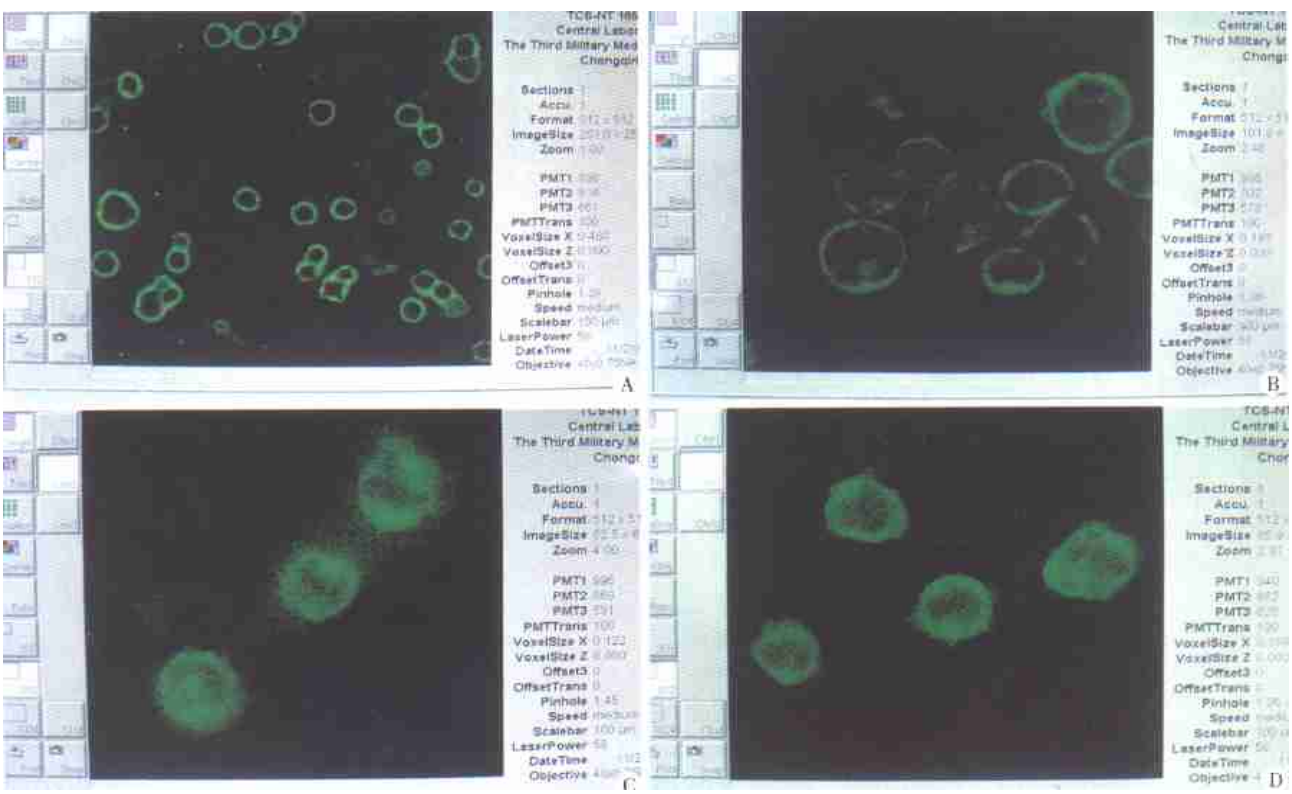


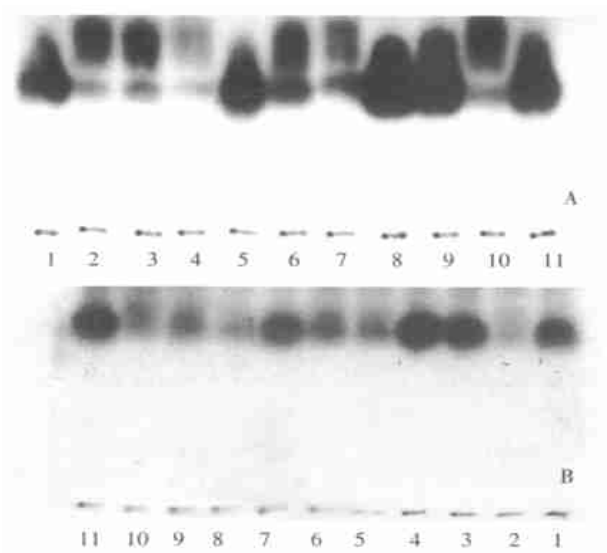
图 1　抗人巨噬细胞(CD68)(A)、清道夫受体 A(SRA)(B)、ox-LDL 组基质金属蛋白酶-9(MMP-9)(C)、ox-LDL 组肿瘤坏死因子 α(TNF-α)(D)荧光抗体染色

Fig 1　Expressions of CD68 (A), SRA (B), MMP-9 (C), and TNF-α (D) all with fluorescent staining in differentiated macrophages

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 吉非贝齐和曲列格酮对巨噬细胞 SRA mRNA 表达的影响

SRA mRNA 表达，见图 2A：SRA cDNA 探针可检测到 3.2 kb mRNA 染色带，ox-LDL 组的 SRA mRNA 显著高于对照组，曲列格酮则显著抑制 ox-LDL 介导的 SRA 基因转录，而吉非贝齐无此作用。PPAR-γ mRNA 表达，见图 2B：PPAR-γ cDNA 探针可检测到 2.1 kb mRNA 染色带，未分化细胞无 PPAR-γ mRNA 表达，而对照组为阳性表达，曲列格酮能显著增加其表达量，吉非贝齐和 ox-LDL 的作用不明显。



1：control；2：Undifferentiated macrophages cells；3 and 4：Intervention groups with Troglitatone of 25 and 50 μmol/L；5 and 6：Intervention groups with gemfibrozi of 13 and 6 mmol/L；7 to 9：Intervention groups with ox-LDL at 5，10 and 20 μg/ml；10：Intervention group with troglitatone 50 μmol/L＋ox-LDL 20 μg/ml；11：Intervention group with gemfibrozi 16 μmol/L＋ox-LDL 20 μg/ml

图 2 各组巨噬细胞 SRA mRNA(A)、PPARγ mRNA(B)的变化(Northern blot)

Fig 2 Northern blot of SRA mRNA (A) and PPARγ mRNA (B) of macrophage cells in different groups

2.4 PPARγ mRNA 表达与巨噬细胞生长状态、细胞因子和 SRA 表达相关性分析

曲列格酮干预组凋亡期细胞较多、增殖期细胞相对较少，细胞因子 TNF-α 和 MMP-9 表达量显著降低，ox-LDL 介导的 SRA 基因转录均受到显著抑制，而此组的 PPAR-γ mRNA 表达量是显著增加的，即 PPAR-γ mRNA 表达与凋亡细胞增多、增殖细胞减少、细胞因子释放减少以及脂蛋白受体基因转录受抑制密切相关。PPARα 配体吉非贝齐不增加巨噬细胞 PPAR-γ mRNA 表达，对巨噬细胞 SRA 基因转录无作用，但能促进巨噬细胞凋亡、抑制细胞增殖和细胞因子释放。

3 讨论

3.1 PPARγ 基因转录与巨噬细胞分化及泡沫细胞形成

本研究表明 PPARγ mRNA 基因仅在分化后的巨噬细胞表达，未分化细胞无表达，甚至高浓度的 ox-LDL 对转录无明显作用(我们选用的 ox-LDL 浓度已能显著促进细胞增殖、抑制凋亡)，提示 ox-LDL 对 PPARγ 基因表达作用不明显可能与细胞分化状态有关，可能参与分化后过程[6,7]。

研究表明噻唑烷二酮类药物(曲列格酮第一个应用于临床)与 PPARγ 亲和力(KD＝30～710 nmol/L)最大、特异性最强[8]，本研究采用 Trog 50 μmol/L 浓度为中低浓度(为 KD 值 100～300 倍)，这种浓度不但能显著增加巨噬细胞 PPARγ mRNA 表达，而且能显著抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 SRA 基因转录和蛋白质表达。Ricote 等[3]研究表明噻唑烷二酮类药物能拮抗转录因子 AP-1，而 SRA 基因转录的激活依赖于转录因子 AP-1 等的活性，提示 PPARγ 可能通过抑制转录因子 AP-1 活性，使巨噬细胞 SRA 基因表达受抑制，导致摄取脂蛋白能力下降，PPARγ 有阻止泡沫细胞形成的作用。

3.2 PPARα 和γ 基因与巨噬细胞生长状况及炎症因子释放

本研究 ox-LDL 能增加分化后巨噬细胞 TNF-α、MMP-9 释放，中等浓度的曲列格酮和吉非贝齐不但能阻止 ox-LDL 的作用，而且能促进细胞凋亡、抑制细胞增殖，导致细胞生长受抑制。TNF-α 是最具特征性的促炎因子，参与炎症等多种病理过程，MMP-9 被认为是粥样硬化斑块不稳定最主要的基质金属蛋白酶，通过降解细胞外基质而发挥作用。研究表明，PPARγ 配体-15 d-PGJ2 以剂量依赖形式抑制巨噬细胞 MMP-9 等细胞因子表达，其抗炎作用与拮抗 NF-κB 活性有关[3,7]。PPARγ 配体也能诱导未分化的细胞凋亡，PPARα、γ 两种配体的促进凋亡作用也与抑制核因子 NF-κB 激动亚单位-P65/RelA 的转录活性有关[6,9]。以上结果提示 PPARα、γ 配体能抑制细胞因子释放、促凋亡、抑制增殖的作用，有助于抗炎和抗抗动脉粥样硬化形成。

本研究显示 PPARα 和 γ 配体对在泡沫细胞形成过程中的作用存在差异，原因可能有二：PPARα 和 γ 基因在巨噬细胞内分布不同，研究表明 PPARα 基因主要位于胞质，PPARγ 仅存在于胞核内[9]；PPARα 和 γ 基因分布不同，前者主要位于平滑肌及肝脏，后者主要存在于巨噬细胞及脂肪细胞[9]。研究表明 PPARγ 配体曲列格酮不但调节糖脂代谢，而且能增加胰岛素敏感性。目前代谢综合征所造成的动脉粥样硬化等并发征已成为的最主要致死原因，而胰岛素敏感性降低被认为是代谢综合征的关键原因。噻唑烷二酮类药物可能有多方面的益处：①直接针对造成血脂紊乱等代谢综合征的原因，增加胰岛素敏感性；②改善血脂紊乱；③局部抗炎及抗脂质摄取作用等[10]，故此类药物将是非常有前途的药物。

参考文献：

[1] Mueller E，Sarraf P，Tontonoz P，*et al*. Terminal differentiation of human breast cancer through PPARγ[J]. Mol Cell，1998，1(3)：465－470.

[2] Lefebvre A M，Peinado-onsurbe J，Leitersdor F I，*et al*. Regulation of lipoprotein metabolism by thiazolidinediones occurs through a distinct but

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

complementary mechanism relative to fibrate[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(8): 1 756—1 764.
[3] Ricote M, Andrew C Li, Willson T M, *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptor-γ is a negative regulator of macrophage activation[J]. Nature, 1998, 391(1): 79—82.
[4] Jiang C, Cheng Yu, Adrian T, *et al*. PPARγ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines[J]. Nature, 1998, 391(7): 862—865.
[5] Calvo D, Coronado D, Suarez Y, *et al*. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoprotein HDL, LDL and VLDL[J]. J Lipid Res, 1998, 39(3): 777—788.
[6] Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, *et al*. Activation of proliferactor-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages[J]. J Biol Chem, 1998, 273(40): 25 575—25 580.
[7] Marx N, Sukhova G, Murphy C, *et al*. Macrophages in human atheroma contain PPARγ[J]. Am J Pathol, 1998, 153(1): 17—23.
[8] Horn V J, Ishmael J E, Bhattachayya N, *et al*. Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(3): 644—655.
[9] Staels B, Koeng W, Habib A, *et al*. Activation of human aortic smooth-muscle cells in inhibited by PPARα but not by PPARγ activators[J]. Nature, 1998, 393(25): 790—793.
[10] Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, *et al*. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated recetporγ in human adipocytes. Diabetes, 1999, 48(3): 699—705.

(编辑 谢义霞)

文章编号: 1000-5404(2002)08-0927-01

个案与短篇

30 470 例血清 HBV 阳性标志模式分析

Analysis on positive patterns of HBV serum markers in 30 470 patients

李碧清[1], 陈 伟[1], 梅雪芬[2] ([1] 第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所检验科; [2] 重庆医科大学检验系 96 级, 重庆 400042)

HBV 感染是危害人类健康的重大疾病之一。血清 HBV 标志物检测是临床诊断、药物治疗及乙肝疫苗预防接种效果观察的主要依据。本研究统计分析了 30 470 例 HBV 阳性标志的检测结果, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本院住院、查体及门诊病人, 血清检测。男性 17 442 例, 女性 13 028 例, 年龄 5~78 岁。

1.2 方法

全自动酶联免疫吸附分析仪, ELISA 法。

1.3 统计学处理

计数资料两样本率的比较用 U 检验。

2 结果与讨论

本研究统计了 30 470 例病人, 出现 14 种模式。"$HBsAb^+$" 42.85%, 咨询证实约 70%的病人接种过乙型肝炎疫苗。从结果中可以看出"$HBsAb^+$"的出现率, 女性显著高于男性($P<0.05$)。

"大三阳"($HBsAg^+$、$HBeAg^+$、抗-HBC^+)、"小三阳"($HBsAg^+$、抗-HBe^+、抗-HBC^+)的出现率分别为 10.81%、19.84%。"小三阳"出现率明显高于"大三阳"($P<0.05$), 与文献[1]报道相似, 可能原因为: ①"小三阳"一般为 HBV 急性感染趋向恢复、慢性乙肝和 HBV 健康携带者, 由于临床症状不明显, 常被人们忽视。②"大三阳"传染性强, 大部分有临床症状而被重视加以治疗, 可能转变成"小三阳"及其他模式。在男女病人中, 男性"大三阳" 12.05%, "小三阳" 为 22.0%, 女性"大三阳" 为 9.15%, "小三阳" 为 16.94%。两种模式的出现率男性显著高于女性($P<0.05$)。

普遍认为 HBeAg 仅能在 HBsAg 阳性血清中检出。本次统计中出现 24 例"$HBeAg^+HBcAb^+$"的罕见模式, 杨正德等[2]曾报道过 17 例经 HBVDNA 检测及肝穿活检证实的 HBsAg 阴性的乙型肝炎患者, 这提示血清 HBsAg 阴性的病人仍可能存在 HBV 感染, 造成这种感染状态的原因可能为: ① 病毒变异或与宿主的斗争及药物治疗造成基因突变, 使病毒颗粒的组装或分泌改变, 血清 HBsAg 结构异常或含量过低而不能检出; ② 处在亚临床急性肝炎的恢复期; ③ ELISA 检测 HBsAg 是双抗体夹心法, 厂家在制备抗血清的过程中不可能针对 HBsAg 不同的亚型抗原决定簇, 从而导致 HBsAg 不能检出。

单独"$HBcAb^+$"的出现, 有学者认为有以下几种可能: ① HBV 既往感染; ②窗口期, 即急性乙肝 HBsAg 消失后, HBsAb 尚未出现; ③被动获得 HBcAb, 如输用含 HBcAb 的血液; ④HCV 感染, HCVAg 与 HBcAg 有相同抗原成分。"$HBsAg^+$ $HBcAb^+$" 7.03%的出现率, 且男性显著高于女性($P<0.05$), 是否由于 e 系统衍变及病毒变异所致, 有待研究证实。

本次统计结果显示人群中 HBV 感染模式多样, 常见模式与类似文献[3]报道相同。对于出现的少见模式, 有待于进一步研究。

关键词: HBV 标志; HBV 感染; 模式分析
中图法分类号: R512.620.4 文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈菊梅 主编. 现代传染病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 251.
[2] 杨正德, 万漠彬, 焦平华, 等. 血清 HBsAg 阴性的乙型肝炎[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(5): 344—345.
[3] 叶狄庆, 彭 辉, 陈宏础, 等. 71 456 例血清 HBV 标志物检测结果的回顾性分析[J]. 四川医学, 1999, (3): 255—256.

(编辑 王 红)

作者简介: 李碧清(1950—), 女, 四川省彭山县人, 副主任技师, 主要从事免疫检验方面的研究。电话(023)68757272

收稿日期: 2002-04-25; 修回日期: 2002-07-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net