

·基础研究·

锌离子抑制动脉粥样硬化进程中的巨噬细胞泡沫化

田甜, 周芳敏, 汤勇波

(中山大学中山医学院药理学教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探究锌离子在动脉粥样硬化巨噬细胞泡沫化及斑块形成过程中的影响及其机制。【方法】用氧化低密度脂蛋白(oxLDL)刺激THP-1细胞建立巨噬细胞泡沫化模型,用油红O染色法检测在0、30和60 $\mu\text{mol/L}$ 锌浓度环境下泡沫化程度,用荧光标记法检测巨噬细胞对脂质的吞噬情况,用免疫印迹法检测相关清道夫蛋白CD36、SR-A蛋白的表达,用实时荧光定量PCR检测锌离子转运体的mRNA相对表达量。用ApoE^{-/-}小鼠随机分4组:正常饲料组(Chow group)、高脂缺锌组(HFD-ZnD)、高脂正常锌组(HFD)、高脂高锌组(HFD-ZnS)。直至第13周检测小鼠血脂、主动脉斑块及主动脉蛋白表达情况。【结果】缺锌组与正常锌组相比,加oxLDL刺激后巨噬细胞油红O密度显著增加($P < 0.05$);补充锌离子可减缓巨噬细胞对DiI-oxLDL的摄取($P < 0.01$);泡沫细胞SR-A、CD36蛋白表达增加($P < 0.05$),15 $\mu\text{mol/L}$ 的Zn²⁺处理后与oxLDL组相比,细胞SR-A、CD36蛋白的含量减少($P < 0.05$)。oxLDL处理组与对照组相比,锌调控-铁调控相关蛋白基因(ZIP)中,ZIP10、ZIP12、ZIP14的mRNA表达量升高($P < 0.05$),ZIP4、ZIP7、ZIP8的mRNA表达量降低($P < 0.05$);而锌转运蛋白(ZnT)基因中,ZnT4的mRNA表达量上调($P < 0.01$),ZnT1的mRNA表达量下调至($P < 0.05$)。与Chow组对比,HFD组和HFD-ZnD组小鼠低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)分别升高($P < 0.05$);HFD-ZnD组的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)显著升高。且HFD-ZnS组较HFD-ZnD组小鼠的LDL-C显著降低($P < 0.05$)。HFD组和HFD-ZnD组较Chow组小鼠主动脉SR-A表达有升高,HFD-ZnS可显著抑制此升高($P < 0.05$)。HFD-ZnD组与Chow组相比主动脉内壁斑块面积占总动脉管腔面积的比率显著升高($P < 0.01$),HFD-ZnS可显著抑制此升高($P < 0.01$)。【结论】缺锌加重了巨噬细胞脂质沉积,其机制可能是通过上调清道夫受体SR-A、CD36进行调控。锌离子转运体参与巨噬细胞泡沫化及动脉斑块的形成,缺锌可以增加LDL-C、促进高脂饮食诱导的动脉斑块的增加。

关键词:动脉粥样硬化;清道夫受体;巨噬细胞;锌;锌离子转运体

中图分类号:R972 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)03-0321-08

Zinc Ion Inhibits Macrophage Foaming during Atherosclerosis

TIAN Tian, ZHOU Fang-min, TANG Yong-bo

(Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: Tang Yong-bo; E-mail: tangyb@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the effects of zinc on the formation of atherosclerotic macrophage foaming and plaque formation and its mechanism.【Methods】The macrophage foaming model was established by stimulating THP-1 cells with oxLDL. The degree of foaming in different zinc concentrations of 0, 30 and 60 $\mu\text{mol/L}$ was detected by oil red O staining and the intake of lipid by foam cells was measured by DiI-oxLDL fluorescence. The relevant scavenger protein expression of CD36, SR-A was detected by immunoblotting. The relative expression level of zinc ion transporters was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. ApoE^{-/-} mice were randomly divided into 4 groups, the normal feed group (Chow group), the high-fat zinc-deficient group (HFD-ZnD), and the high-fat normal zinc group (HFD), high-fat and zinc-supplement group (HFD-ZnS), blood lipids and the protein of the mice aorta were detected in the 13 week.

收稿日期:2018-10-12

基金项目:国家自然科学基金(81503063, 81573419);广东省自然科学基金(2016A030310270, 2016A030313191)

作者简介:田甜,硕士研究生,研究方向:心血管药理学,E-mail: tiant36@mail2.sysu.edu.cn;汤勇波,通信作者,副教授,博士生导师,E-mail: tangyb@mail.sysu.edu.cn

【Results】 Compared with the normal zinc group, the oil red O density increased ($P < 0.05$), and add zinc ion decreased the intake of the DiI-oxLDL by foam cells ($P < 0.01$). In the 0 $\mu\text{mol/L}$ zinc group, the SR-A and CD36 protein expression in the foam cells increased ($P < 0.05$) and 15 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} treatment before stimulating with oxLDL reduced the contents of SR-A and CD36 proteins ($P < 0.05$). Compared the oxLDL-treated group with the control group, the mRNA expression levels of *ZIP10*, *ZIP12* and *ZIP14* increased, and the mRNA expression levels of *ZIP4*, *ZIP7* and *ZIP8* decreased ($P < 0.05$); while the mRNA expression of *ZnT4* was up-regulated ($P < 0.01$), and the mRNA expression of *ZnT1* was down-regulated ($P < 0.05$). Compared with Chow group, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were increased in HFD group and HFD-ZnD group, respectively ($P < 0.05$); HFD-ZnD group High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was significantly elevated. Moreover, the LDL-C of the HFD-ZnS group was significantly lower than that of the HFD-ZnD group ($P < 0.05$). The SR-A protein of the mice aorta of the HFD and HFD-ZnD group increased compared to the Chow group ($P < 0.01$), HFD-ZnS could restrain the increase ($P < 0.05$). Compared with the Chow group, the ratio of plaque area in the aorta to the total arterial lumen area was significantly increased in the HFD-ZnD group ($P < 0.01$), and HFD-ZnS significantly inhibited this increase ($P < 0.01$). 【Conclusions】 Extracellular zinc deficiency aggravates lipid deposition in macrophages, and the mechanism may be regulated by up-regulating the scavenger receptor CD36 and SR-A. Zinc ion transporters are involved in macrophage foaming and formation of arterial plaques. Zinc deficiency can increase LDL-C and promote the increase of arterial plaque induced by high-fat diet.

Key words: atherosclerosis; scavenger receptor; macrophage; zinc; zinc ion transporter

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3):321-328]

动脉粥样硬化是一种大动脉疾病,可以通过斑块破裂和血栓形成转变为急性临床事件,是导致心脏病和中风的主要原因^[1]。动脉粥样硬化不仅是种退行性疾病,还与炎症有密切的关系^[2],它的特征是大动脉中脂质和纤维元素的积累,早期病变包括巨噬细胞通过清道夫受体 CD36、SR-A 等吞噬以修饰后 LDL-C 为主的胆固醇并在内皮下积聚,称为“泡沫细胞化”^[3]。锌是人体重要的微量元素,可以结合人体内约 10% 的蛋白质^[4]。两个锌转运蛋白家族基因,锌转运蛋白 (Zn transporters, *ZnT*) 和 *Zrt*-, *Irt*- 相关蛋白 (Zin-regulated, Iron-regulated-like proteins, *ZIP*) 基因共同调控锌在细胞内外及基质内的稳态,锌转运蛋白功能障碍可破坏细胞的锌稳态,从而引起糖尿病、心血管疾病和癌症等各种疾病的发生和发展^[5]。饮食锌摄入不佳促进血管炎症和动脉粥样硬化形成,且越多研究发现锌有抗氧化和抗炎作用^[6-7]。因此,本研究将从动脉粥样硬化发生最初的巨噬细胞脂质吞噬出发,研究锌离子在动脉粥样硬化中的作用并初步探究其机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人单核细胞 THP-1 (中国科学院典型培养

物保藏委员会细胞库)。胎牛血清 (Foetal Bovine Serum, FBS, BI 公司), RPMI1640、DMEM 培养基 (Gibco 公司), 丙二醇甲醚醋酸酯 (Propylene glycol methyl ether acetate, PMA)、氯化锌 (Zinc chloride, ZnCl_2)、N, N, N', N'-四(2-吡啶甲基)乙二胺 (N, N, N, N'-tetrakis (2-pyridinylmethyl) - 1, 2-ethanediamine, TPEN, Sigma 公司)。油红 O、氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL)、1, 1-二十二烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吲哚菁 (DiI) 标记的 oxLDL (DiI-oxLDL, 奕源公司)、CD36 一抗体 (R&D 公司), SR-A 一抗 (Abcam 公司), 多克隆二抗 (SantaCruz 公司, 博士德公司, CST 公司), 小鼠 β -actin 一抗, ZIP7 一抗 (SantaCruz 公司), ZIP8 一抗 (protein-tech 公司), ZIP12 一抗 (Pro-sci 公司), ZIP14 一抗 (Abcam 公司)。Trizol (Invitrogen 公司), 引物序列 (Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒、SYBR 荧光探针 (Roche 公司)。ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠 (c57bcl/6), SPF 级, 许可证号 SCXK (京) 2016-0011 (维通利华公司)。动物饲料定制 (派克公司)。本动物实验经中山大学实验动物伦理委员会批准 (No.1027-156), 寄养于中山大学 (北校区动物实验中心), 并根据中山大学动物实验中心的实验动物操作标准进行实验。

1.2 细胞培养及分组

THP-1 细胞培养于含体积分数 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱内 37 °C 培养。1×10⁶/皿接种于 30 mm 培养皿中,培养基中加入分化诱导剂 PMA 使终浓度为 0.1 mg/L,培养 48 h 后细胞分化为巨噬细胞。去 PMA 换新鲜全培养基,加入 oxLDL 继续培养 24 h 或 48 h;或分化后采用不同浓度 0、30 和 60 μmol/L 的 Zn²⁺ 或 0.4、0.8 μmol/L 的 TPEN 预孵育 6 h 后,再用 oxLDL 处理 24 h,观察巨噬细胞脂滴沉积情况及检测细胞内相关 mRNA 水平和蛋白的表达情况。

将 ApoE^{-/-} 小鼠随机分 4 组,正常饲料组(锌含量 30 mg/kg, Chow group)、高脂正常锌组(锌含量 30 mg/kg, HFD)、高脂缺锌组(锌含量 0 mg/kg, HFD-ZnD)、高脂高锌组(锌含量 150 mg/kg, HFD-ZnS)。

1.3 油红 O 染色

去掉培养基的细胞或新鲜分离的小鼠主动脉条,用 4 °C PBS 洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛中固定 10 min。再用 4 °C PBS 洗 3 次,染色前用体积分数 60% 异丙醇润洗细胞,然后在 37 °C 下,用质量分数 0.3% 油红 O 染色 5 min,染色后用异丙醇润洗一次,再用 4 °C PBS 漂洗 3 次,最后置于倒置显微镜下观察细胞内脂滴形成情况或拍照,用 image J 计算泡沫化面积。

1.4 巨噬细胞对 Dil-oxLDL 摄取能力测定

将 THP-1 细胞接种于共聚焦(confocal)显微镜专用皿中,0.1 mg/L PMA 处理 48 h 使之分化成巨噬细胞。将 confocal 皿中的培养液吸去,换成 2 mL 不含血清及抗生素的培养基,加入 0.4 μmol/L TPEN 或 60 μmol/L Zn²⁺ 6 h 后,再加入 100 mg/L oxLDL 培养 24 h,加入 20 ng/L 的 DiI-oxLDL,在避光条件下分别在 37 °C 孵育 4 h,之后用 4 °C PBS 洗,40 g/L 多聚甲醛固定 10 min,吸去固定液,4 °C PBS 洗 3 次,加入细胞核染料 DAPI 染色 5 min,去染色液 PBS 洗涤。最后用荧光显微镜观察巨噬细胞对其摄取情况。其激发波和发射波波长分别设置为 520 nm 和 580 nm,每个皿取 6 个视野,运用 fluorescence View 软件测定每个皿 6 个视野内所有细胞的平均荧光强度。

1.5 Western Blotting

Western blot 用于检测 SR-A、CD36 等蛋白的表达。将处理后的细胞用 4 °C PBS 冲洗细胞 3 次,

预先将蛋白酶抑制剂(cock tail)按 1:100 加入细胞裂解液 RIPA 中混匀。加入适量裂解液(RIPA)冰上裂解细胞 30 min。用细胞刮到将裂解产物刮下或组织破碎后收集于 1.5 mL EP 管,12 000 r/min ($r=11$ cm) 4 °C 离心 15 min,吸取上清液,-20 °C 保存。取 2 μL 用 BCA 法测定蛋白浓度,取 40~80 μg 蛋白在 8% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。电泳结束后,200 mA 恒流电转 90 min,使蛋白质转移至 PVDF 膜上。含蛋白样品的 PVDF 膜在体积分数 5% 牛奶的 TBST 缓冲液中室温封闭 1~2 h。室温孵育相应抗体 2 h 或 4 °C 过夜。TBST 洗膜 3 次,5 min/次,室温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次。ECL 发光底物曝光显影,用 ImageJ 分析目的条带的光密度值。比较不同条件下各蛋白表达的变化情况。

1.6 实时荧光定量 PCR

THP-1 细胞接种于 30 mm 培养皿中,细胞经相应处理后,除去培养液,用 4 °C PBS 洗 3 次,加入 1 mL Trizol 试剂,冰上放置 30 min,收集后,每 1 mL Trizol 加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡混匀,室温静置 5 min,再 4 °C,12 000 r/min ($r=11$ cm) 离心 15 min。小心吸取上清转移至无 RNA 酶的 EP 管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温下静置 10 min,再 12 000 r/min ($r=11$ cm) 4 °C 离心 10 min。吸去上清,用 75% 乙醇漂洗 RNA 沉淀,5 000 r/min ($r=11$ cm) 4 °C 离心 5 min。倒去乙醇,室温空气中干燥约 10 min,随后加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA,用核酸蛋白分析仪进行核酸定量。再根据试剂盒条件取 1 μg RNA 进行逆转录。引物设计使用 NCBI 软件 primer-BLAST 进行设计,RT-PCR,20 μL 体系,反应条件:CFX96(Bio-Rad)qPCR 仪,95.0 °C 10 min、95.0 °C 15 s、60.0 °C 1 min,39 个循环;95.0 °C 10 s、60.0 °C 15 s。运用 CFXmanager 的 2^{-ΔΔCt} 法进行相对表达量计算(表 1)。

1.7 血脂检测

将获得的小鼠血液室温静置 30 min,3 000 r/min ($r=11$ cm) 离心 10 min,小心吸取上清,收集得到血清。血清用于血脂四项,交由广州达安基因公司进行检测,采用的检测方法是酶法。

1.8 统计分析

采用 GraphPad Prism5.0 制作统计图。连续性资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述,绘制柱状图或点图。偏态分布资料 $P_{50}(P_{25}, P_{75})$ 描述,绘制箱式图。数据呈

表1 引物序列
Table 1 Primers

Target	primer sequences(5'-3')	Target	primer sequences(5'-3')
<i>H-ZnT1-F</i>	TGTGGGACACTACCACAAGC	<i>H-ZIP3-R</i>	GCTCTCATACTCCGAGTCGC
<i>H-ZnT1-R</i>	CAGCTTTAGTCTCCTGGGC	<i>H-ZIP4-F</i>	CACAGTCCCTCTTCTCCCA
<i>H-ZnT2-F</i>	CCAGCGCCAGCTGTATGTAG	<i>H-ZIP4-R</i>	CTGCTTCCCAACTACAGGG
<i>H-ZnT2-R</i>	CTGATGAGCATGCTGGCAA	<i>H-ZIP5-F</i>	TGTCTCCTGCTATCAGGGCT
<i>H-ZnT3-F</i>	CAGTTCGCTCCACTCTGGTG	<i>H-ZIP5-R</i>	GGTCCCCTATTAGGCCTTGC
<i>H-ZnT3-R</i>	CTGGAGAGGGCTCCATGTTT	<i>H-ZIP6-F</i>	AATGAAACCACCGCTGTTC
<i>H-ZnT4-F</i>	GAACCTGTCAGACCTGGGA	<i>H-ZIP6-R</i>	CATTGCGCCTTCGTCTCCG
<i>H-ZnT4-R</i>	CAACTCATCTCCCCGCC	<i>H-ZIP7-F</i>	GGGATCTAAAGGCGGGACTG
<i>H-ZnT5-F</i>	TTGACATTCCAAGCTGCTTATC	<i>H-ZIP7-R</i>	GCCCTCGTCTTACGACTCA
<i>H-ZnT5-R</i>	TGAAAGCTTACCCTGCTTGG	<i>H-ZIP8-F</i>	CCGGGAGGAGCATATGTACG
<i>H-ZnT6-F</i>	GGAAAACCTCGAGCACCCAGA	<i>H-ZIP8-R</i>	GAGATAAAGGCCACCAGGGC
<i>H-ZnT6-R</i>	CCTTCGGTCAGCTGCTACAA	<i>H-ZIP9-F</i>	ATGGCAGCTGTAGTATCGGC
<i>H-ZnT7-F</i>	TAGACGGGTAGAGTCAGCC	<i>H-ZIP9-R</i>	CCTAGGGGTTTACAGCAAAA
<i>H-ZnT7-R</i>	CCCTTAGCTGTGAACTCCCC	<i>H-ZIP10-F</i>	GACGTTGAAAGCCAGGAGA
<i>H-ZnT8-F</i>	CTGGCCGTCATGGAGTTTCT	<i>H-ZIP10-R</i>	CAAGTCTACGCAAACTGCGG
<i>H-ZnT8-R</i>	TGTTGGAGTTCCACACTTTCT	<i>H-ZIP11-F</i>	GGAGGGAAGCAGGAAGTGAC
<i>H-ZnT9-F</i>	GTGGGGACCTTGAAACAAGT	<i>H-ZIP11-R</i>	GCTGGATACAGTAGGGTGCC
<i>H-ZnT9-R</i>	CTGTGTCCTGCTGAGTTGCT	<i>H-ZIP12-F</i>	TCTCAGTATCTGGGTGCCA
<i>H-ZnT10-F</i>	CGCCACTCCTTTAGACTCTGG	<i>H-ZIP12-R</i>	GGTCACCAGCAGAGAGAACC
<i>H-ZnT10-R</i>	CCTCCCAGATTGTCTCGCC	<i>H-ZIP13-F</i>	CCCAAGGGAGTAGTTGGGTG
<i>H-ZIP1-F</i>	GCGCCAGAATATGAATCGCC	<i>H-ZIP13-R</i>	AGGCGATGTAGAGAAAGCCG
<i>H-ZIP1-R</i>	CCGGGAGTGACGTCAGTTAG	<i>H-ZIP14-F</i>	GAATGAGCAGACGGAGGAGG
<i>H-ZIP2-F</i>	TCATCACCGGCTAGTCCTCA	<i>H-ZIP14-R</i>	AGAGGGAGATGACGGTCACA
<i>H-ZIP2-R</i>	TTGCTGATCTGTTCTGCACCA	<i>H-GAPDH F</i>	CCTCCCCTTCGCTCTCT
<i>H-ZIP3-F</i>	CTGGGCTTCTTCATGACCGT	<i>H-GAPDH R</i>	GGCGACGCAAAAGAAGATG

正态分布且方差齐性时,两组比较采用独立样本 t 检验进行统计分析;多组比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析。方差分析结果有统计学意义时,多重比较采用 Bonferroni 法分析组间差异。数据非正态分布或方差不齐时,多组比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, H 检验分析结果有统计学意义时,多重比较采用 Nemenyi 法,此步骤运用 SPSS 19.0 平均秩多重比较的功能实现。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

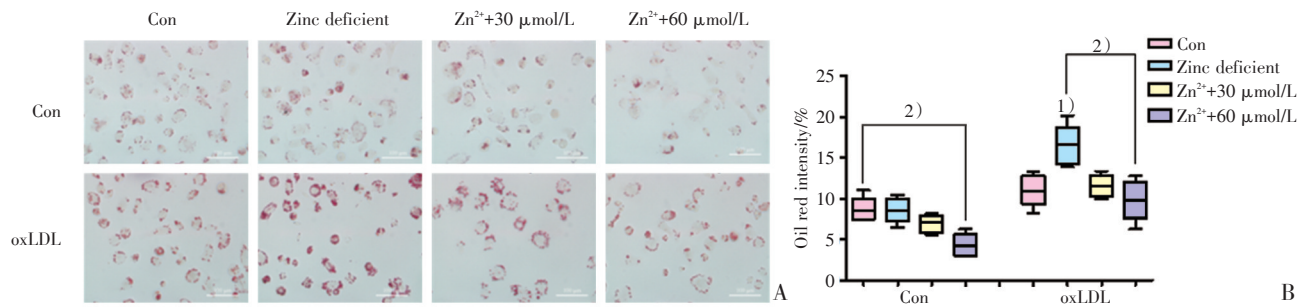
2.1 锌离子对巨噬细胞泡沫化过程的影响

100 mg/L oxLDL 处理细胞 48 h 使细胞发生泡沫化后,可见细胞内积聚大量脂质,预处理 TPEN

络合胞外锌离子后可以加重巨噬细胞脂质积聚,缺锌组油红 O 密度比对照组显著增加($P < 0.05$);而预孵育 60 $\mu\text{mol/L}$ 的 Zn^{2+} 则在此基础上有所下降($P < 0.01$),一定程度上减缓了脂质的堆积。100 mg/L oxLDL 处理细胞 48 h 后使发生巨噬细胞泡沫化后,与对照组相比,缺锌组泡沫细胞对 DiI-oxLDL 的摄取含量无显著增加;但补充锌离子后,细胞内 DiI-oxLDL 的摄取量降低($P < 0.01$;图 1,2)。

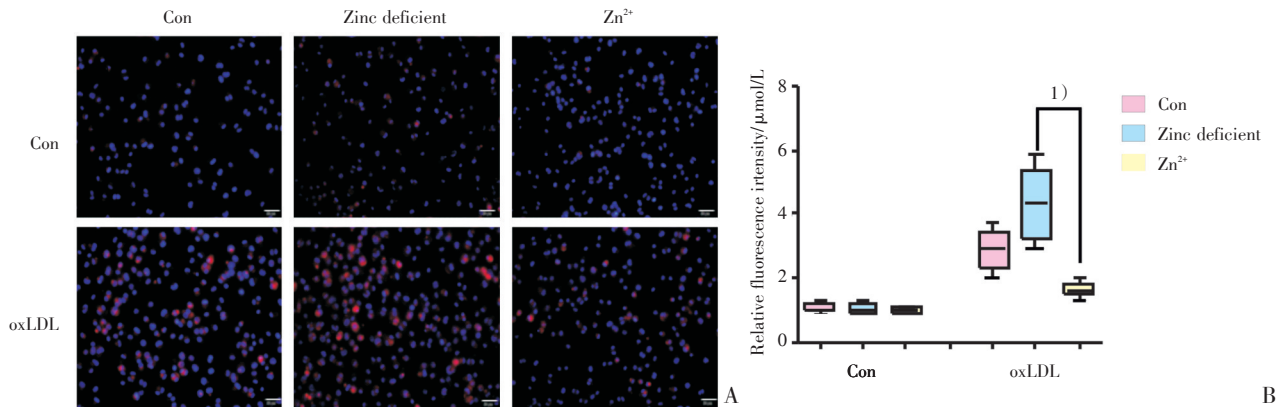
2.2 不同锌离子浓度对清道夫受体 CD36、SR-A 表达的影响

在正常培养条件下,巨噬细胞对 SR-A 蛋白表达较低。用 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 TPEN 预处理细胞,再用 oxLDL 处理细胞 48 h 后,泡沫细胞 SR-A 和 CD36 蛋白表达量比对照组显著增加。15 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} 预



A: THP-1 were induced to differentiate into macrophages, cells were pretreated with TPEN (0.4 $\mu\text{mol/L}$), Zn^{2+} for 6 h, and then were treated with oxLDL (100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, then stained with Oil-Red O to analyze foam cell formation, and observed with phase contrast microscope. Bar = 100 μm . B: Con group ($H = 15.49$, $P = 0.0014$), oxLDL group. 1) $P < 0.05$, vs. Con; $H = 14.22$, 2) $P < 0.01$; $n = 4$.

图1 缺锌增加巨噬细胞泡沫化
Fig.1 Zinc deficiency upregulated the formation of foam cells



A: THP-1 were induced to differentiate into macrophages, cells were pretreated with or without TPEN (0.4 $\mu\text{mol/L}$), Zn^{2+} for 6 h, and then were treated with oxLDL (100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, then incubated with DiI-labeled ox-LDL (20 $\mu\text{g/mL}$) for 4 at 37 $^{\circ}\text{C}$. Lipoprotein-uptake was measured with fluorescence microscope. Bar = 50 μm . B: $H = 11.18$, $P = 0.0037$, 1) $P < 0.01$, $n = 5$.

图2 缺锌增加巨噬细胞摄取 DiI-oxLDL
Fig.2 Zinc deficiency upregulated the DiI-oxLDL uptake by macrophage

处理巨噬细胞与 oxLDL 组比 ($P < 0.05$), SR-A 蛋白和 CD36 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.3 巨噬细胞泡沫化过程中 ZIP、ZnT 的 mRNA 表达变化

实时荧光定量 PCR 检测锌转运体基因 ZIP、ZnT 的 mRNA 表达变化。ZIP14 (1.98±0.16)、ZIP12 (2.50±0.40)、ZIP10 (1.78±0.12) 的 mRNA 表达量均有所升高,其中又以 ZIP12 和 ZIP14 变化最为显著 ($P < 0.05$)。ZIP4 (0.33±0.09)、ZIP7 (0.32±0.08)、ZIP8 (0.31±0.08) 的 mRNA 表达量均降低。而 ZnT4 的 mRNA 表达量上调 (2.86±0.23), ZnT1 的 mRNA 表达量下调 (0.25±0.004; $P < 0.05$; 图 4)。

2.4 不同锌饮食对小鼠血脂的影响

用酶法检测了血脂四项,结果显示,高脂喂养 13 周之后,与 Chow 组对比,HFD 和 HFD-ZnD 组

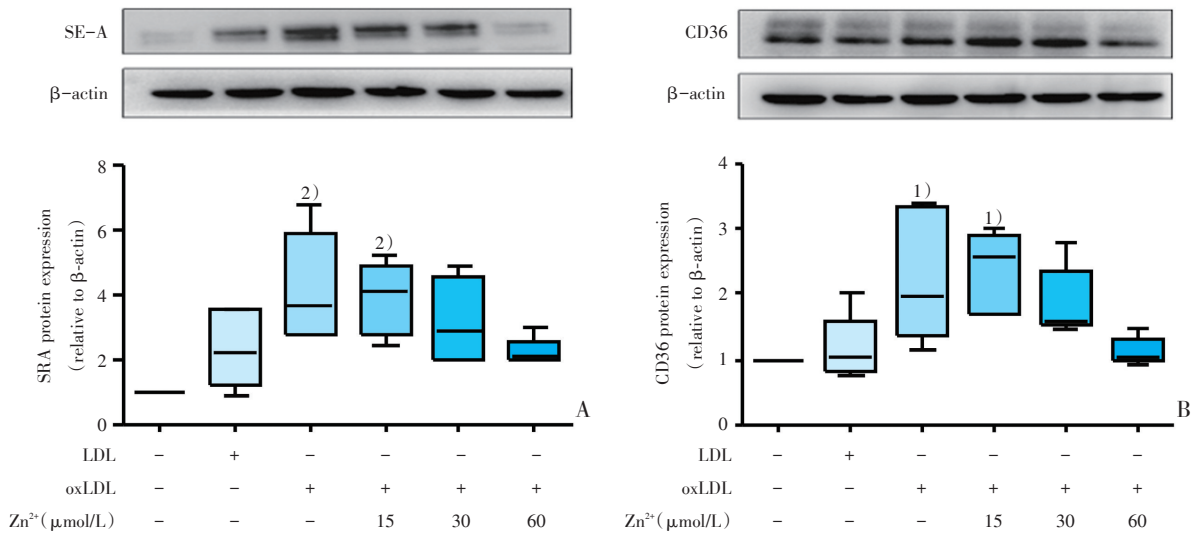
小鼠的血脂多项指标均显著升高 ($P < 0.05$; 表 2), HFD-ZnS 组小鼠的 LDL-C 含量较 HFD-ZnD 组小鼠的 LDL-C 则有明显下降 ($P < 0.05$; 表 2)。

2.5 不同锌饮食对小鼠动脉 SR-A 蛋白表达的影响

利用 ApoE^{-/-} 小鼠进行高脂饮食饲养,建立动脉粥样硬化模型 13 周后,HFD 组和 HFD-ZnD 组与 Chow 组相比,SR-A 蛋白表达均有明显升高 ($P < 0.01$)。而 HFD-ZnS 组的蛋白表达则在 HFD 组基础上显著降低 ($P < 0.01$; 图 5)。

2.6 不同锌饮食对小鼠动脉斑块形成的影响

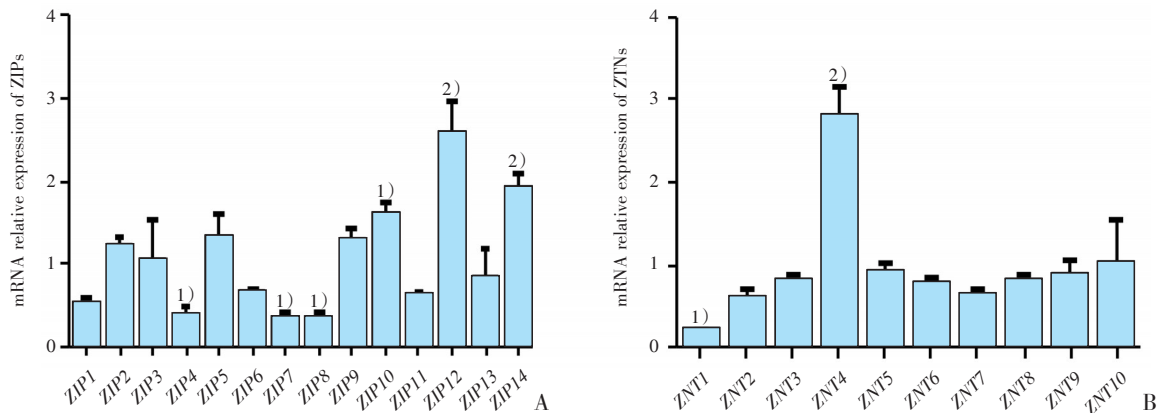
建立动脉粥样硬化模型 13 周后,油红 O 染色显示,与常 Chow 相比,HFD-ZnD 组主动脉粥样斑块明显加重 ($P < 0.01$)。HFD-ZnS 组则在此基础上有所减缓 ($P < 0.01$; 图 6)。



THP-1 cells were induced to differentiate into macrophages by pretreated with 0.1 μg/mL PMA for 48 h, macrophages were pretreated with Zn²⁺ for 6 h and then were treated with LDL or oxLDL (100 μg/mL) for another 24 h. SR-A (A) and CD36 (B) protein expression levels were determined with western blot. A: $H = 20.01$, $P = 0.001$ 2; 2) $P < 0.01$ vs. control. B: $H = 19.45$, $P = 0.001$ 6; 1) $P < 0.05$ vs. control; $n = 5$.

图3 不同锌离子浓度对清道夫受体SR-A、CD36蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of Zn²⁺ on SR-A and CD36 protein expression in macrophages foam cell formation



THP-1 were induced to differentiate into macrophages by pretreated with PMA for 48 h, and 100 μg/mL ox-LDL or not for 24 h. The mRNA expression levels of ZIP(A) and ZnT(B) family were determined with q-RT-PCR. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs control; t -test was used; $n=3$

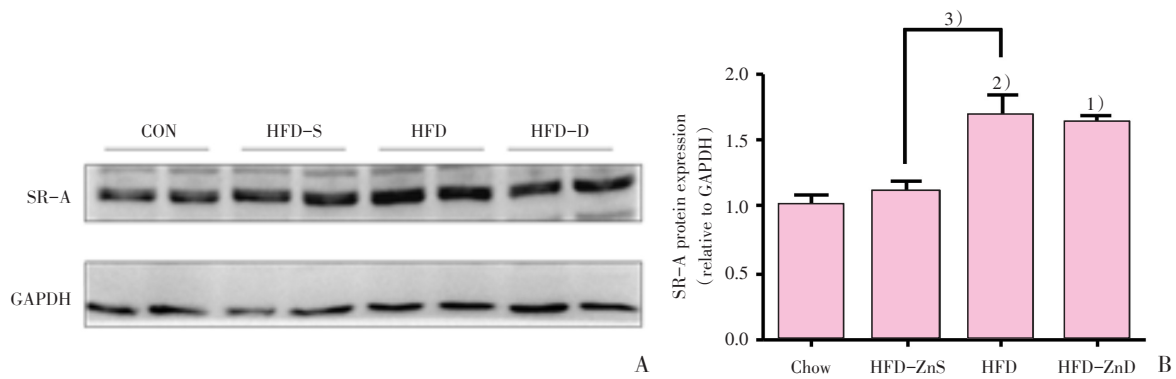
图4 oxLDL影响锌转运体家族mRNA的表达

Fig.4 Effect of ox-LDL on the mRNA expression of ZIP and ZnT family

表2 小鼠血清脂质含量
Table 2 Serum lipid, lipoprotein

Groups	TC/(mg/L)	TG/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
Chow	12.89±4.06	0.76±0.24	3.19±0.66	1.39±0.35
HFD-ZnD	18.50±3.28 ¹⁾	1.32±0.33 ²⁾	6.55±1.02 ³⁾	3.15±1.16 ⁵⁾
HFD	18.55±4.55 ¹⁾	1.28±0.40 ²⁾	5.42±1.10 ³⁾	2.22±0.84
HFD-ZnS	19.11±4.05	1.21±0.33	4.56±0.86 ⁴⁾	2.51±0.76
<i>F</i>	3.976	3.986	13.92	5.147
<i>P</i>	0.0173	0.0195	<0.001	0.0058

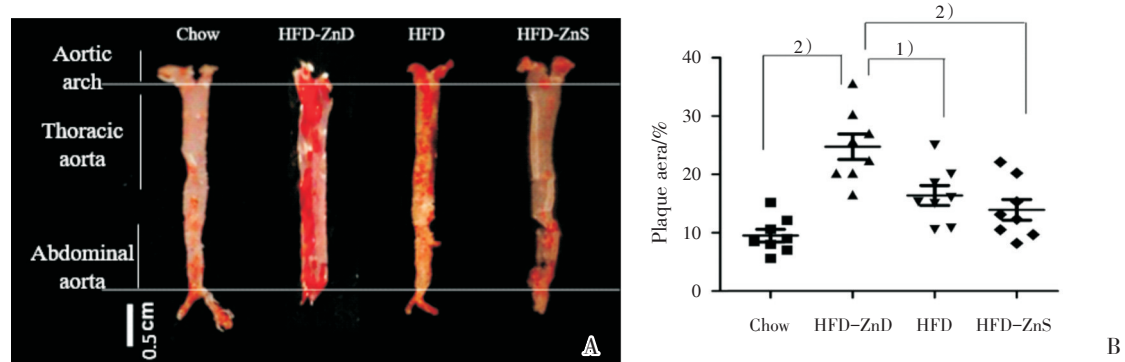
HFD: high fat diet; ZnD: zinc deficiency; ZnS: zinc supplement. Bonferroni test after ANOVA, 1) compared with Chow, $P < 0.05$; 2) compared with Chow, $P < 0.05$; 3) compared with Chow, $P < 0.001$; 4) compared with HFD-ZnD, $P < 0.01$; 5) compared with Chow, $P < 0.01$; $n = 9$.



A: ApoE^{-/-} mice fed with different diet for 13 weeks, then the SR-A protein of aortic roots were performed by western blot. B: $F = 12.05$, $P < 0.0001$; 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.001$ vs. Chow; 3) $P < 0.01$ vs. HFD. $n = 6$. HFD: high fat diet; ZnD: zinc deficiency; ZnS: zinc supplement

图5 不同锌饮食小鼠血管SR-A蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of different diet on SR-A protein expression in the aorta of mice



A: ApoE^{-/-} mice were fed with different diet for 13 weeks, then the quantification of atherosclerotic plaque burden using Oil Red O-stained aortic root sections with representative roots. B: $F = 13.33$, $P < 0.0001$. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; $n = 8$. HFD: high fat diet; ZnD: zinc deficiency; ZnS: zinc supplement.

图6 不同锌饮食对小鼠主动脉斑块形成的影响

Fig.6 The effect of zinc on atherosclerosis plaque formation in aorta of mice

3 讨论

本实验探讨了锌离子在动脉粥样硬化巨噬细胞泡沫化及斑块形成过程中的影响及其机制,以往关于锌与动脉粥样硬化的研究并不是特别多^[8]。本实验通过体外实验结果,缺锌导致巨噬细胞内脂质沉积增加,清道夫受体SR-A和CD36增加,可推测锌离子参与细胞泡沫化过程,其参与机制可能是通过调控清道夫受体SR-A和CD36的表达,小鼠体内实验结果也证实了这一点。我们知道清道夫受体SR-A和CD36是参与动脉斑块形成的关键蛋白,降低它有抑制斑块形成^[9]。巨噬细胞吞噬oxLDL的过程中,锌离子转运体ZnT和ZIP家族的mRNA水平均有显著性改变,证实锌离子参与调控清道夫受体SR-A和CD36蛋白,并且可能是通过改变巨噬细胞表面的膜转运体影响

细胞内外锌环境从而影响该过程。首次关注了影响胞内锌离子浓度的锌转运体,这可能为研究提供一个新的方向^[10]。但在变化较为明显的锌离子转运体中,又是哪些起到了关键性的作用其分子机制又是什么,还需要进一步探讨。

为了证实缺锌及补充锌对动脉粥样硬化有无直接的影响,我们建立了小鼠动脉粥样硬化模型。通过体内实验结果发现,缺锌高脂饮食不但明显促进了ApoE^{-/-}小鼠血清中LDL-C水平升高,还加重高脂饮食诱导的ApoE^{-/-}小鼠动脉斑块的形成,证实缺锌会促进巨噬细胞泡沫化进而促进动脉粥样硬化的发展。锌补充饮食则抑制高脂饮食的小鼠LDL-C水平升高和轻高脂诱导的动脉斑块增加,说明对高血脂者给予适当的锌补充或许可以有效减少血脂沉积和动脉斑块的形成,锌在降低动脉粥样硬化这样的血管疾病能获益^[8, 11-12]。同样地,关于不同饮食会否对锌离子通道产生影响也还需要实

验来说明。此外,基于锌对血管的保护作用,而它除了作用于巨噬细胞,对血管的内皮细胞和平滑肌细胞又有无仅有的积极调节作用也值得思考^[13-14]。

综上所述,锌离子对动脉粥样硬化过程能起到明显的减缓作用。先前的研究,不管是通过低密度脂蛋白受体敲除(LDL-R^{-/-})小鼠和 ApoE^{-/-}小鼠上证实了缺锌会促进长期高饱和脂肪和高胆固醇

饮食导致的动脉粥样硬化和斑块钙化^[15],还是摄入锌可能对降低动脉粥样硬化风险有益^[16],都与本实验结果有一致性。关于锌在心血管疾病中的作用,还需要了解细胞内锌信号是如何发生的以及这些锌转移信号是怎样影响细胞的状态和功能。只有了解了这些机制才能确立锌在动脉粥样硬化等心血管疾病中的预防和治疗作用^[8,17]。

参考文献

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. Nature, 2000, 407 (6801):233-241.
- [2] 刘哲,方豫东.巨噬细胞在下肢动脉硬化闭塞症病理机制中的研究进展[J].新医学,2018,49(6):382-385.
Liu Z, Fang YD. Research progress on macrophages in the pathogenesis of lower extremity arteriosclerosis obliterans[J].J New Med, 2018,49(6):382-385.
- [3] Sukhorukov VN, Karagodin VP, Orekhov AN. Atherogenic modification of low-density lipoproteins [J]. Biomed Khim, 2016, 62(4):391-402.
- [4] Hara T, Takeda TA, Takagishi T, et al. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis [J]. J Physiol Sci, 2017, 67(2):283-301.
- [5] Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, et al. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism [J]. Physiol Rev, 2015, 95(3):749-784.
- [6] Prasad AS. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health [J]. Front Nutr, 2014, 1:14.
- [7] Prasad AS, Bao B, Beck FW, et al. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor- κ B [J]. Nutrition, 2011, 27(7-8):816-823.
- [8] Beattie JH, Gordon MJ, Duthie SJ, et al. Suboptimal dietary zinc intake promotes vascular inflammation and atherogenesis in a mouse model of atherosclerosis [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(7):1097-1105.
- [9] Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice [J]. J Clin Invest, 2000, 105(8):1049-1056.
- [10] Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(17):3281-3295.
- [11] Reiterer G, Macdonald R, Browning JD, et al. Zinc deficiency increases plasma lipids and atherosclerotic markers in LDL-receptor-deficient mice [J]. J Nutr, 2005, 135(9):2114-2118.
- [12] 蒋金金.硫酸锌对高脂喂养 ApoE 基因敲除小鼠保护作用研究[D].山西:山西医科大学,2012.
Jiang JJ. The protein of sulfate zinc on ApoE-knock-out mouse fed with high-fat diet [D]. Shanxi Medical University, 2012.
- [13] Cho YE, Choi JE, Alam MJ, et al. Zinc deficiency decreased cell viability both in endothelial EA.hy926 cells and mouse aortic culture ex vivo and its implication for anti-atherosclerosis [J]. Nutr Res Pract, 2008, 2(2):74-79.
- [14] Voelkl J, Tuffaha R, Luong T, et al. Zinc Inhibits Phosphate-Induced Vascular Calcification through TNFAIP3-Mediated Suppression of NF- κ B [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(6):1636-1648.
- [15] Beattie JH, Gordon MJ, Duthie SJ, et al. Suboptimal dietary zinc intake promotes vascular inflammation and atherogenesis in a mouse model of atherosclerosis [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(7):1097-1105.
- [16] Yang YJ, Choi BY, Chun BY, et al. Dietary zinc intake is inversely related to subclinical atherosclerosis measured by carotid intima-media thickness [J]. Br J Nutr, 2010, 104(8):1202-1211.
- [17] Little PJ, Bhattacharya R, Moreyra AE, et al. Zinc and cardiovascular disease [J]. Nutrition, 2010, 26(11-12):1050-1057.

(编辑 余菁)