Piper E 生物化学与生物物理进展 Progress in Biochemistry and Biophysics 2011, 38(1): 46~54

www.pibb.ac.cn

亚毒性剂量毒死蜱降低新西兰兔 ABCA1 表达 加重高脂诱导的动脉粥样硬化 *

周寿红^{1,2)} 杨旭红²⁾ 宋 涛²⁾ 吴树金^{2,3)} 黄宁江^{2,4)} 刘立英^{2)**} (¹⁾南华大学医学院生理学教研室,衡阳 421001; ³⁾中南大学药学院药理学教研室,长沙 410078; ³⁾长沙医学院药理教研室,长沙 4102194; ⁴⁾永州职业技术学院药理学教研室,永州 425000)

摘要为了探讨亚毒性剂量有机磷酸酯杀虫剂毒死蜱对高脂饮食诱导的动脉粥样硬化的影响及其机制,32只健康雄性新西兰兔随机分为对照组、毒死蜱组、高脂组、高脂+毒死蜱组.每天以20 mg/kg 亚毒性剂量的毒死蜱灌胃处理6个月.动物处死后检测血脂水平和血清胆碱酯酶活性.收集腹腔巨噬细胞,测定其胆固醇流出率.苏丹Ⅳ染色观察胸主动脉粥样硬化斑块,定量分析动脉粥样硬化斑块占血管内表面积的百分比.颈总动脉石蜡切片,观察动脉粥样硬化斑块.采用实时定量 PCR和蛋白质印迹检测,分别检测肝脏、血管和腹腔巨噬细胞中三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) mRNA 和蛋白质的表达.结果显示:与对照组相比,高脂饮食升高了血清总胆固醇和脂蛋白水平,主动脉和颈总动脉出现明显的动脉粥样硬化斑块,其肝脏、主动脉和腹腔巨噬细胞 ABCA1 的表达升高,腹腔巨噬细胞中胆固醇流出增加;与对照组相比,毒死蜱组血清胆碱酯酶活性降低,但没有出现明显的中毒症状和肝肾功能损伤,血清中高密度脂蛋白(HDL)水平降低,ABCA1 的表达降低,腹腔巨噬细胞中胆固醇流出减少;高脂+毒死蜱组与高脂组相比,血清胆碱酯酶活性降低,也没有出现明显的中毒症状和肝肾功能损伤,ABCA1 的表达降低,腹腔巨噬细胞中胆固醇流出减少,主动脉和颈总动脉粥样硬化斑块更加明显.结果提示长期暴露于亚毒性剂量的毒死蜱可加速高脂饮食的致动脉粥样硬化作用,其机制可能与毒死蜱降低体内 ABCA1 的表达和胆固醇流出有关.

关键词 毒死蜱,三磷酸腺苷结合盒转运体1,胆固醇流出,动脉粥样硬化
 学科分类号 R363
 DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00046

有机磷酸酯(organophosphorous ester, OP)杀虫 剂在全球广泛使用,除了用作农业杀虫剂外,也用 于灭虫、灭蚊等. OP 杀虫剂对我国环境的污染相 当普遍. OP 类杀虫剂抑制胆碱酯酶引起的急性中 毒已受到广泛研究和重视,但低剂量长期接触 OP 杀虫剂引起的危害在国内外很少报道.有文献报道 长期与 OP 杀虫剂接触与心血管疾病的发生密切相 关^[1-3].我们前期的动物实验发现,低剂量 OP 杀虫 剂在没有引起明显急性中毒的情况下可促进高脂饮 食诱导的动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发 生,其机制可能与 OP 杀虫剂降低体内对氧磷酶活 性而触发机体的氧化应激反应有关,但其详细机制 还不清楚^[4].前期研究也发现,对氧磷(OP 杀虫剂 的活性代谢产物)能降低巨噬细胞源性泡沫细胞中 三磷酸腺苷结合盒转运体 1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)的表达和胆固醇流出^[5]. 毒 死蜱(chlorpyrifos, CPF),是一种高效广谱、中等 毒性的有机磷酸酯农药.CPF的亚毒性剂量是指短 期(大多数实验期限为4天)内连续接触CPF后不引 起系统性明显毒性症状(包括胆碱能症状,如:抽 搐、流涎等以及体重减轻和死亡等)的剂量.

泡沫细胞的形成是 AS 重要的病理生理学基础,单核细胞来源的巨噬细胞以及平滑肌细胞在内膜下吞噬氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)而形成泡沫细胞^{16-7]}.逆向胆固

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30570754)和湖南省教育厅科学基金 资助项目(08C746).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 0731-82355077, E-mail: liyingliu737@yahoo.com.cn 收稿日期: 2010-07-25, 接受日期: 2010-11-08

醇转运(reverse cholesterol transport, RCT)异常是泡 沫细胞形成的重要原因,机体通过 RCT 将外周组 织过多的胆固醇转运到肝脏,肝脏将胆固醇分泌到 胆汁中排出体外而达到抗 AS 目的,而 ABCA1 在 RCT 中发挥着重要的作用^[8-10].因此,OP 杀虫剂是 否是通过 ABCA1 途径而影响泡沫细胞的形成从而 促进高脂诱导的 AS 发生?目前还未见文献报道. 本研究拟观察新西兰兔长期口服亚毒性剂量的 CPF 对高脂饮食诱导的 AS 形成和 ABCA1 表达的影响.

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

毒死蜱原药(美国陶氏益农公司);总 RNA 提 取试剂盒,MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒和 Hot Star Taq Master Mix 试剂盒(Invitrogen 公司); 引物(上海生工生物工程有限公司);羊抗兔 ABCA1 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记鼠抗羊二抗 (Santa Cruz 公司);苏丹IV试剂(Sigma 公司);BCA 蛋白定量试剂(Pierce 公司);ABI7500 荧光定量仪 及分析软件(美国 ABI 公司);图像分析系统(武汉 华海公司);凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司, GOS7500 型);垂直电泳仪与转膜系统(BioRad 公 司);胆碱酯酶活性、丙氨酸氨基转移酶活性、肌 酐和尿素氮测定试剂盒和血脂四项检测试剂盒(南 京建成生物工程公司).

1.2 毒死蜱成年新西兰兔亚毒性剂量的筛选

健康雄性成年新西兰兔 40 只, 体重(2.2±0.5) kg, 由中南大学湘雅医学院动物学部提供. 随机分为5 组,每组8只.a. 溶媒对照组:每天上午空腹灌 胃金龙鱼牌植物油(0.5 ml/kg), 普通饲料饲养. b. 不同剂量(5、10、20、40 mg/kg)的毒死蜱组: 将毒 死蜱溶解于金龙鱼牌植物油中,按 0.5 ml/kg 体重 每天上午空腹灌胃, 普通饲料饲养. 动物单笼饲 养,自由饮食水.毒死蜱处理一个星期,禁食 12h, 耳中央动脉取血 2 ml, 4℃冰箱静置 1 h, 常 温下 2 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 检测 血清中胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)和丙氨酸氨 基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)活性、肌 酐 (Creatinine, Cr) 和 尿 素 氮 (blood urea nitrogen, BUN). 密切观察兔 OP 农药急性中毒症状,如活 动情况、进食情况、呼吸、唾液分泌、瞳孔及有无 抽搐、肌肉震颤等,以确定不引起明显的急性中毒 症状的毒死蜱亚毒性剂量.

1.3 动物模型制备和分组

健康雄性新西兰兔 32 只,体重(2.2±0.5)kg, 由中南大学湘雅医学院动物学部提供.随机分为4 组,每组 8 只.a.溶媒对照组:每天上午空腹灌 胃金龙鱼牌植物油(0.5 ml/kg),普通饲料饲养;b. 毒死蜱组:将毒死蜱溶解于金龙鱼牌植物油中,按 每天以 20 mg/kg 亚中毒剂量灌胃,普通饲料饲养; c.高脂组:高脂饲料喂养,高脂饲料是在普通饲 料 中加入 1%胆固醇、4%蛋黄粉和 8%猪油;d. 高脂+毒死蜱组:高脂饲料喂养同时每天空腹灌胃 20 mg/kg 的毒死蜱.兔由专人饲养,单笼饲养,自 由进食水,每天补充新鲜蔬菜约 50 g/只.兔舍中 12 h 光照,温度在(22±3)℃,共喂养 6 个月.

1.4 血标本的采集及血清中脂质含量、CHE 和 ALT 活性以及 Cr 和 BUN 的测定

兔耳缘静脉注射 20%氨基甲酸乙脂(5 ml/kg) 麻醉,颈总动脉插管采血,4℃静置 24 h,常温下 2 000 r/min 离心 5 min,取上层血清,-80℃保存. 血清中甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的含量、CHE 和 ALT 活性、血 清 Cr 和 BUN 的测定按试剂盒说明进行操作.

1.5 腹腔巨噬细胞分离培养和腹腔巨噬细胞胆固 醇流出率测定

将 100 ml 4℃ 预冷的无菌 PBS 液注入新西兰兔 的腹腔,轻揉兔腹部,10 min 后,吸出腹腔内 PBS 液,收集于离心管中,重复3次.4℃、2000 r/min 离心 10 min. 弃上清液, 加入含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,轻轻吹打成细胞悬液,调整细 胞浓度至 4x10^{6~5x10⁶ 个 /ml, 接种于 75 ml 培养} 瓶,置 37℃、5% CO₂、95%湿度的培养箱内.贴 壁 2 h 后,更换培养液,用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 去除未贴壁的细胞, 贴壁者即为巨噬细胞. 细胞经 胰酶消化后,轻轻吹打成细胞悬液,将巨噬细胞 浓度调整为 3×10⁶ 个/ml, 接种于 6 孔细胞培养板, 在含有 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中加 0.74×10⁴ Bq/L[³H]标记胆固醇共培养 24 h 后, PBS 液洗 3 次. 无血清含 50 mg/L 载脂蛋白 A I (ApoA I)培养液中培育细胞 12 h,用液体闪烁计 数仪检测 培养液和细胞中的[³H]胆固醇含量. 胆固 醇流出 率用培养液中[³H]/总值[³H](培养液+细胞)× 100% 表示[11].

1.6 胸主动脉脂质条纹染色及分析

兔放血处死,取出整条胸主动脉(从主动脉弓 到膈肌处),清除周围脂肪和结缔组织,PBS清洗 干净后,放入10%甲醛中固定.固定24h后,将 胸主动脉纵向剪开,蒸馏水洗10min.擦干组织, 放入苏丹Ⅳ染液8min(250ml丙酮,250ml70% 乙醇,苏丹Ⅳ0.5克).用70%乙醇分化,AS斑块 呈红色,其他组织不着色为佳.水洗除去多余颜 色.拍照,病理图像分析系统测定斑块面积和斑块 占血管内表面积的百分比^[12].

1.7 颈总动脉病变的形态学检查

取各实验组兔颈总动脉,清除其周围的脂肪和 结缔组织,PBS 清洗干净后,放入 10%甲醛中固 定,石蜡包埋,切约 7 μm 厚的组织切片,HE 染 色.病理图像分析系统观察分析颈 AS 的斑块.

1.8 实时定量 PCR 检测 ABCA1 的 mRNA 表达 水平

按 Trizol 试剂盒说明提取腹主动脉、肝脏组织 和收集培养的腹腔巨噬细胞的总 RNA. 以提取的 总 RNA 为模板,按试剂盒说明进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存. 选取 cDNA 样品 进行 10 倍梯度稀释,分别进行实时定量 PCR 反 应,反应体系 25 µl,含 Hot Star Taq Master Mix (2x)12.5µl, PCR 上下游引物及探针(10 µmol/L)各 0.3 µl, cDNA 4 µl, 灭菌去离子水补足 25 µl. PCR 扩增程序为: 95℃ 10 min 激活 Hot Star Taq DNA 合成酶, 扩增循环 94℃ 40 s, 60℃ 70 s, 共 50 个 循环.实时定量 PCR 反应在 ABI7500 实时定量 PCR 系统上进行. 引物和探针序列由上海生物工 程有限公司合成. ABCA1 引物: 上游, 5' AGGAG-GTGATGTTTCGAC 3', 下游, 5' AGCTCCATG-GACTTGTTGA 3'; ABCA1 探针: 5'FAM-CTG-GCAGTGAGCTATACTCG-TAMRA 3'. B-actin 引 物:上游,5'CCATCATCTTGCAGGAGCG3',下 游, 5' CTGGCAGTGAGCTATACTCG 3'; β-actin 探针: 5' FAM-ACGTTCAACACGCCGGCCAT-TAMRA 3'^[13].

1.9 蛋白质印迹检测 ABCA1 蛋白质表达

提取腹主动脉、肝脏组织和收集培养的腹腔 巨噬细胞的总蛋白.BCA法进行蛋白质定量.取 50 μg蛋白质样本加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液中, 煮沸使蛋白质变性.用 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 进行电泳分离,60~100 mA1h将蛋白质用半干转 膜仪转移至 PVDF 膜上,丽春红染色观察转移效 果,并确定蛋白质分子质量标准位置.5%脱脂 牛奶室温封闭2h,加入1:150一抗,4℃过夜. TBST洗膜3次,每次5~10min.加入辣根过氧 化物酶标记的二抗,4℃4~8h,TBST洗膜3次. 蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于X光片,显影、 定影后凝胶图像分析系统对胶片扫描,以对照组的 面积灰度值为100%与实验组进行比较和半定量分 析^[12-13].

1.10 数据处理及统计学分析

实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用方 差分析及 t 检验,用 SPSS 14.0 统计软件完成, P < 0.05 认为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 不同剂量毒死蜱处理新西兰兔出现临床中毒的情况、CHE 活性和肝肾功能

为筛选出毒死蜱对成年新西兰兔的亚毒性剂 量, 毒死蜱(5、10、20、40 mg/kg·d)处理成年新西 兰兔一周,结果发现毒死蜱(5、10、20 mg/kg·d)均 没有引起明显临床中毒症状,属于亚毒性剂量;而 40 mg/kg·d 毒死蜱引起了轻微临床中毒症状,不属 于亚毒性剂量.进一步观察了毒死蜱对 CHE 活性 和肝肾功能的影响.结果显示:与对照组相比, 10、20 mg/kg·d(分别为 78.37 ± 8.97, 60.85 ± 6.21, 48.47 ± 5.07 (kU/L), 均 P < 0.05) 和 40 mg/kg·d (24.26 ± 3.59 (kU/L), P < 0.01) 毒死蜱均明显抑制 血清 CHE 活力; 各剂量组 ALT 活力随染毒剂量的 增加有增加的趋势,但只有 40 mg/kg·d 毒死蜱组 较对照组差异有统计学意义(分别为 115.74 ± 9.23, 70.15 ± 6.84(U/L), P<0.05); Cr 和 BUN 含量各剂 量组较对照组差异无统计学意义.因此选择血清中 CHE 活力抑制最明显,但没有引起明显临床中毒 症状和肝肾功能损伤的剂量(20 mg/kg•d)作为实验 剂量.

2.2 毒死蜱和高脂饮食对各实验组兔体重和血脂 水平的影响

实验前新西兰兔体重组间差异没有显著性. 毒 死蜱和高脂饮食处理兔6个月后,高脂组与对照组 相比体重明显增加(P<0.05);高脂+毒死蜱组与毒 死蜱组相比体重明显增加(P<0.05);毒死蜱组和对 照组体重差异无显著性. 与对照组相比,毒死蜱组 HDL 显著性降低,TC 虽然有降低趋势但差异没有 显著性,TG、LDL 水平两组间差异无显著性. 与 对照组相比,高脂组的TG、TC 和 LDL 均显著性 升高(均 *P* < 0.01), HDL 明显升高(*P* < 0.05). 与毒 死蜱组相比, 毒死蜱+高脂组的 TG、TC 和 LDL 均

显著性升高(均 P < 0.01), HDL 明显升高(P < 0.05) (表 1).

Table 1 Effect of chlorpyrifos and high fat diet on the body weight (BW), the levels of TC, TG, LDL and HDL in rabbits

Groups	BW/kg	$c(TC)/(mmol \cdot L^{-1})$	$c(TG)/(mmol \cdot L^{-1})$	$c(LDL)/(mmol \cdot L^{-1})$	$c(\text{HDL})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
С	2.96 ± 0.33	2.42 ± 0.42	1.63 ± 0.19	1.35 ± 0.12	0.98 ± 0.09
CPF	2.84 ± 0.26	2.31 ± 0.23	1.68 ± 0.37	1.41 ± 0.17	$0.69 \pm 0.07^{\blacktriangle}$
HF	3.68 ± 0.37▲	27.89 ± 4.33▲▲	4.90 ± 0.75 ^{▲▲}	22.91 ± 8.73▲▲	2.74 ± 0.11▲
CPF+HF	$3.53 \pm 0.32^*$	29.12 ± 7.08**	5.06 ± 0.87**	23.52 ± 4.61**	$2.85 \pm 0.69^{*}$

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. BW, CHE, TC, TG, LDL and HDL were measured respectively. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $^{\bullet}P < 0.05$, $^{\bullet\bullet}P < 0.01$ vs the control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs the CPF group.

2.3 毒死蜱和高脂饮食对各组兔血清中 CHE 活性和肝肾功能的影响

毒死蜱和高脂饮食处理新西兰兔6个月后,结果如表2所示:与对照组相比,毒死蜱组兔血清 CHE 活性显著性降低(*P*<0.01),而高脂+毒死蜱组 与高脂组相比血清 CHE 活性显著性降低(P<0.01). 虽然血清 CHE 活性明显降低,但毒死蜱处理兔均 未出现明显有机磷农药急性中毒的症状,如流涎、 瞳孔缩小、抽搐、肌肉震颤等.ALT、Cr 和 BUN 含量各剂量组较对照组差异无统计学意义.

 Table 2
 Effect of chlorpyrifos and high fat diet on the activities of CHE and ALT and the levels of blood Cr and BUN

Groups	CHE/(kU•L ⁻¹)	$ALT/(U \bullet L^{-1})$	$c(Cr)/(\mu mol \cdot L^{-1})$	$c(BUN)/(mmol \cdot L^{-1})$
С	92.27 ± 8.36	75.48 ± 6.36	35.66 ± 3.68	9.67 ± 1.14
CPF	42.84 ± 5.62▲▲	88.67 ± 9.41	38.41 ± 6.74	10.35 ± 1.20
HF	97.09 ± 9.45	82.91 ± 7.05	36.20 ± 5.54	9.04 ± 0.76
CPF+HF	45.19 ± 6.34**	87.39 ± 8.11	38.23 ± 5.11	10.43 ± 0.94

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. The activities of CHE and ALT and the levels of Cr and BUN in serum were measured. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $\triangleq P < 0.01 vs$ the control group; *P < 0.01 vs the high-fat diet group.

2.4 毒死蜱和高脂饮食对各组兔主动脉 AS 病变的影响

如图 la 所示:肉眼观测对照组和毒死蜱组兔 胸主动脉内膜完整光滑,没有形成明显斑块;高脂 组与对照组相比新西兰兔胸主动脉内表面形成明显 AS 斑块;高脂+毒死蜱组与高脂组相比 AS 斑块 面积更大.应用图像分析软件分析并计算 AS 病变 区域(染成红色区域)占血管内膜总面积的百分比. 如图 lb 所示:高脂组与对照组相比新西兰兔胸主 动脉 AS 病变区域占血管内膜总面积的百分比显著 性增加(P<0.01);高脂组+毒死蜱组与高脂组相比 胸主动脉 AS 病变区域占血管内膜总面积的百分比 显著性增加(P<0.01).



Fig. 1 Effect of CPF and high fat diet on the development of thoracic aorta atherosclerosis in rabbits

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. (a) Representative photographs of thoracic aorta in rabbits. (b) Quantification of plaque areas in thoracic aorta stained for lipid deposition with Sudan IV. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $^{\bullet \bullet}P < 0.01 vs$ the control group; "P < 0.01 vs the high-fat diet group.

2.5 毒死蜱和高脂饮食对各组兔总动脉 AS 病变的影响

如图2所示:对照组和毒死蜱组兔颈总动脉内 膜完整光滑;高脂组与对照组相比兔颈动脉管腔形 成明显AS斑块,斑块表面由致密的纤维组织组 成,表面比较光滑,内含泡沫细胞,大多数斑块内 没有明显的粥样坏死核,少数斑块内有较小的脂质 粥样坏死核,多数斑块为稳定性斑块;高脂+毒死 蜱组与高脂组相比AS斑块面积更大,厚度更厚, 泡沫细胞数目更多,形成明显纤维帽,斑块内可见 较大的脂质粥样坏死核,坏死核体积占斑块体积的 40%以上,斑块内可见明显的钙化灶,斑块表面的 纤维帽较薄且不平整,斑块肩部较薄易破裂,多数 斑块为不稳定性斑块.



Fig. 2 Effect of CPF and high fat diet on the development of common carotid artery atherosclerosis in rabbits

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. Representative photographs of common carotid artery in rabbits. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF +HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Original magnification: × 200.

2.6 毒死蜱和高脂饮食对各组兔肝脏 ABCA1mRNA 和蛋白质表达的影响

结果显示(图 3): 与对照组相比,高脂组肝脏 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的表达显著性升高 (*P* < 0.05),而毒死蜱组肝脏 ABCA1 的 mRNA 和蛋白 质的表达显著性降低(*P* < 0.05);与高脂组相比,高 脂+毒死蜱组肝脏 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的 表达显著性降低(*P* < 0.05).



Fig. 3 Effect of CPF and high fat diet on the expression of ABCA1 in livers of rabbits

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. (a) ABCA1 mRNA expression was measured by real-time quantitative PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of ABCA1 in livers of rabbits. (c) Histogram shows the level of ABCA1 protein expression in livers of rabbits determined by densitometric analysis. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos+ high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x}\pm s(n = 8)$. $^{+}P < 0.05 vs$ the control group; $^{*}P < 0.05 vs$ the high-fat diet group.

2.7 毒 死 蜱 和 高 脂 饮 食 对 各 组 兔 腹 主 动 脉 ABCA1mRNA 和蛋白质表达的影响

结果如图 4 所示:与对照组相比,高脂组兔腹 主动脉 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的表达显著性 升高(*P*<0.05),而毒死蜱组兔腹主动脉 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的表达显著性降低(*P*<0.05);与 高脂组相比,高脂+毒死蜱组兔腹主动脉 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质的表达显著性降低(*P*<0.05). 2011; 38 (1)



Fig. 4 Effect of chlorpyrifos and high fat diet on the expression of ABCA1 in abdominal aorta of rabbits

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. (a) ABCA1 mRNA expression was measured by Real-time quantitative PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of ABCA1 in abdominal aorta of rabbits. (c) Histogram shows the level of ABCA1 protein expression in abdominal aorta of rabbits determined by densitometric analysis. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $\triangle P < 0.05 vs$ the control group; $^*P < 0.05 vs$ the high-fat diet group.

2.8 毒死蜱和高脂饮食对各组兔腹腔巨噬细胞中 ABCA1 mRNA 和蛋白质表达的影响

与对照组相比,高脂组兔腹腔巨噬细胞 ABCA1的mRNA和蛋白质的表达显著性升高(P < 0.05),而毒死蜱组兔腹腔巨噬细胞 ABCA1的 mRNA和蛋白质的表达显著性降低(P < 0.05);与 高脂组相比,高脂+毒死蜱组兔腹腔巨噬细胞 ABCA1的mRNA和蛋白质的表达显著性降低(P < 0.05)(图 5).



Fig. 5 Effect of CPF and high fat diet on the expression of ABCA1 in peritoneal macrophages of rabbits

New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. (a) ABCA1 mRNA expression was measured by Real-time quantitative PCR. (b) Western blot shows changes in protein expression levels of ABCA1 in abdominal aorta of rabbits. (c) Histogram shows the level of ABCA1 protein expression in abdominal aorta of rabbits determined by densitometric analysis. C: Control; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $^{A}P < 0.05 vs$ the control group; $^{*}P < 0.05 vs$ the high-fat diet group.

2.9 毒死蜱和高脂饮食对各组兔腹腔巨噬细胞胆 固醇流出的影响

采用[³H]标记胆固醇测定各组新西兰兔腹腔巨 噬细胞胆固醇流出率,结果显示:与对照组相比, 高脂组兔腹腔巨噬细胞胆固醇流出率显著性增加 (*P* < 0.05),而毒死蜱组兔腹腔巨噬细胞胆固醇流 出率显著性降低(*P* < 0.05);与高脂组相比,高脂+ 毒死蜱组兔腹腔巨噬细胞胆固醇流出率显著性降低 (*P* < 0.05).





New Zealand rabbits were treated with high-fat diet and CPF for 6 months. The peritoneal macrophages were assembled. Cellular cholesterol efflux was analyzed as shown above. C: Control ; CPF: Chlorpyrifos; HF: High-fat diet; CPF + HF: Chlorpyrifos + high-fat diet. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$ (n = 8). $^{\bullet}P < 0.05 vs$ the control group; $^{*}P < 0.05 vs$ the high-fat diet group.

3 讨 论

AS 是一种多因素的疾病,它涉及到年龄、饮 食、感染以及环境等,其发病机理十分复杂,至今 尚未完全阐明¹⁴⁴.对于 AS 的防治除了进行药物治 疗外,更重要的是减少致 AS 的外在因素和保护抗 AS 的内源性因子.本研究显示亚毒性剂量的毒死 蜱下调了 ABCA1 的表达加速高脂饮食诱导的 AS 形成.

OP 杀虫剂进入体内后先经肝脏的细胞色素 P450系统代谢为有生物活性的翁类化合物——对 氧磷, 对氧磷在体内可通过对氧磷酶等内脂酶降解 为无毒的代谢产物^[15].同时对氧磷在体内可抑制 CHE, 使 CHE 失活,造成乙酰胆碱的堆积. 当大 量 OP 杀虫剂进入机体而超过了机体水解的限度 时, OP 杀虫剂则抑制 CHE 产生 OP 杀虫剂急性中 毒反应.我们以前的研究表明对氧磷能降低巨噬 细胞源性泡沫细胞中 ABCA1 的表达和胆固醇流 出¹⁵. 以前的实验也发现口服 OP 农药敌百虫在没 有引起明显中毒症状的情况下可加重高脂饮食的致 AS 作用^[4]. 本实验的结果表明, OP 杀虫剂毒死蜱 (20 mg/(kg·d))处理新西兰兔六个月,虽然明显降 低了兔血清中的 CHE 活性,但没有引起明显的急 性中毒反应和肝肾功能损伤,属于亚毒性剂量.高 脂饲料喂养新西兰兔使血清中 TC、TG 和 LDL 水 平显著性升高,主动脉和颈总动脉出现了 AS 斑块 病变.亚毒性剂量 CPF 和高脂饲料共同处理新西 兰兔与单独高脂饲料处理相比,增加了主动脉和颈 总动脉 AS 斑块病变的严重程度.这些结果提示环境污染中低剂量的 OP 杀虫剂长期缓慢地进入体内,虽然不会引起蓄积性的急性中毒,但却可能促进可致 AS 为基础的心血管疾病的发生.

巨噬细胞和平滑肌细胞在内膜下积聚过多的胆 固醇和磷脂形成泡沫细胞是 AS 发生的重要病理基 础. HDL 通过胆固醇的逆向转运具有抗 AS 的作 用,而 ABCA1 在 HDL 的形成和成熟以及胆固醇 逆向转运的过程中起关键作用,因此被称为胆固醇 逆向转运的"看门人"^[16]. ABCA1 是一种整合膜 蛋白,能结合ATP并利用它作为能源,跨膜转运许 多分子,如离子、糖类、磷脂和药物等.ABCA1 将细胞内 FC 和磷脂转运出细胞,与结合到细胞表 面的载脂蛋白 A- [形成 HDL^{117]}. Tangier 患者和家 族性 HDL 缺乏症存在各种 ABCA1 突变使胆固醇 逆向转运受损而容易形成 AS 的斑块[18]. 本实验发 现,CPF 可以显著地降低新西兰兔肝脏、主动脉和 腹腔巨噬细胞中 ABCA1 的表达,显著性减少了血 清中 HDL 水平和腹腔巨噬细胞胆固醇的流出.高 脂喂养的新西兰兔肝脏、主动脉和腹腔巨噬细胞中 ABCA1 的表达上调,腹腔巨噬细胞胆固醇的流出 增加,这是一种代偿性上调. 文献报道,高胆固醇 可以诱导 ABCA1 的表达,因此在 AS 的斑块中 ABCA1 的表达增加^[19]. 而 CPF 和高脂饲料共同处 理新西兰兔与单独高脂饲料处理相比, 肝脏和主动 脉中 ABCA1 的表达却下调,腹腔巨噬细胞胆固醇 的流出减少.因此毒死蜱促进了高脂饮食喂养的新 西兰兔 AS 的形成可能与毒死蜱能降低 ABCA1 的 表达,使胆固醇逆向转运功能受损,加速泡沫细胞 的形成有关. ABCA1 基因表达受到很多因素的调 节,如 cAMP、过氧化物酶体增殖子活化受体激动 剂、肝X受体/视黄醇X受体等[13,20-21]. 毒死蜱下 调 ABCA1 的表达具体通过哪条途径或者信号通路 实现的还有待于进一步的研究.

近年来环境和食物中 OP 农药残留对心血管疾病的影响备受人们的关注.有研究发现长期在温室 里喷洒农药的花工以及长期用农药浸泡羊毛的牧民 增加了患心血管疾病的风险^[2-23].参加过海湾战争 的士兵,因在战争期间长时间接触 OP 类杀虫剂, 出现了伴有心血管和神经系统损伤的海湾战争综合 征^[24-25].本研究显示,亚毒性 OP 杀虫剂毒死蜱下 调了 ABCA1 的表达加速高脂饮食致 AS 作用,该 结果提示长期暴露于亚毒性剂量的 OP 杀虫剂可能 增加 AS 的风险,为 AS 的病因学提供了新的线索.

参考文献

- Lim S L, Sim M K, Loke W K. Acetylcholinesterase-independent action of diisopropyl-flurophosphate in the rat aorta. Eur J Pharmacol, 2000, 404(3): 353–359
- [2] Costa L G, Cole T B, Furlong C E. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine. Acta Biomed, 2005, 76(2): 50–57
- [3] T M van Himbergen, L J van Tits, M Roest, *et al.* The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. Neth J Med, 2006, 64(2): 34–38
- [4] 熊小明,周寿红,胡 敏,等. 敌百虫加重高脂饮食致兔动脉粥样 硬化作用与降低对氧磷酶活性有关. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(3): 172-176
 Xiong X M, Zhou S H, Hu M, *et al.* Chin J Arteriosclerosis, 2009, 17(3): 172-176
- [5] 周寿红,杨旭红,吴树金,等. 对氧磷降低 RAW264.7 巨噬细胞源 性泡沫细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出. 生物化学与生物物理 进展, 2010, **37**(2): 190-199
 Zhou S H, Yang X H, Wu S J, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2010, **37**(2): 190-199
- [6] Doran A C, Meller N, McNamara C A. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(5): 812–819
- Schmitz G, Grandl M. Lipid homeostasis in macrophages-implications for atherosclerosis. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2008, 160(7): 93–125
- [8] Alexander E T, Weibel G L, Joshi M R, et al. Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(10): 1496–1501
- [9] Cutri B A, Hime N J, Nicholls S J. High-density lipoproteins: an emerging target in the prevention of cardiovascular disease. Cell Res, 2006, 16(10): 799–808
- [10] Aiello R J, Brees D, Francone O L. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23 (6): 972– 980
- [11] 唐朝克, 易光辉, 王 佐, 等. 干扰素 -γ 对 THP-1 巨噬细胞源性 泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响. 生物化学与生物 物理进展, 2004, 31(2): 127-133 Tang C K, Yi G H, Wang Z, et al. Prog Biochem Biophys, 2004,
- 31(2): 127-133
 [12] 唐朝克, 冯大明, 孙文清, 等. 动脉粥样硬化小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的变化. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(3): 221-227

Tang C K, Feng D M, Sun W Q, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31**(2): 127–133

- [13] Hao X R, Cao D L, Hu Y W, et al. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR-alpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. Atherosclerosis, 2009, 203(2): 417–428
- [14] Walter M. Interrelationships among HDL metabolism, aging, and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(9): 1244– 1250
- [15] Foxenberg R J, McGarrigle B P, Knaak J B, et al. Human hepatic cytochrome p450-specific metabolism of parathion and chlorpyrifos. Drug Metab Dispos, 2007, 35(2): 189–193
- [16] Tall A R, Costet P, Wang N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. J Clin Invest, 2002, 110 (7): 899– 904
- [17] Dean M, Hamon Y, Chimini G, et al. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res, 2001, 42(7): 1007–1017
- [18] Michael Walter, Nicholas R Forsyth, Woodring E. The establishment of telomerase-immortalized tangier disease cell lines indicates the existence of an apolipoprotein A-I-inducible but ABCA1-independent cholesterol efflux pathway. J Biol Chem, 2004, 279(20): 20866–20873
- [19] Albrecht C, Soumian S, Amey J S, et al. ABCA1 expression in carotid atherosclerotic plaques. Stroke, 2004, 35(12): 2801–2806
- [20] Santamarina-Fojo S, Remaley T, Neufeld B, et al. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA 1 transporter. J Lipid Res, 2001, 42(9): 1339–1345
- [21] 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流 出中的调控作用. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6): 940-944

Tang C K, He X S, Yi G H, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30**(6): 940–944

- [22] Hernandez A F, Mackness B, Rodrigo L, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. Hum Exp Toxicol, 2003, 22(11): 565–574
- [23] Mackness B, Durrington P, Povey A, et al. Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. Pharmacogenetics, 2003, 13(2): 81–88
- [24] Hotopf M, Mackness I, Nikolaou V. Paraoxonase in persian gulf war veterans. J Occup Environ Med, 2003, 45(7): 668–675
- [25] Mackness B, Durrington N, Mackness I. Low paraoxonase in persian gulf war veterans self-reporting gulf war syndrome. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 276(2): 729–733

Subtoxicdose of Chlorpyrifos Down Regulates ABCA1 Expression and Accelerates Formation of Atherosclerosis Induced by The High Fat Diet in New Zealand Rabbits^{*}

ZHOU Shou-Hong^{1, 2}), YANG Xu-Hong², SONG Tao²), WU Shu-Jin^{2, 3}), HUANG Ning-Jiang^{2, 4}), LIU Li-Ying^{2)**}

(¹⁾ Department of Physiology, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001;

²⁾ Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410078, China;
 ³⁾ Department of Pharmacology, Shangsha Medical University, Changsha 4102194;
 ⁴⁾ Department of Pharmacology, Yong Zhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000)

Abstract In order to explore the effect of exposure to subtoxic dose of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on the formation of atherosclerosis induced by the high fat diet in New Zealand rabbits and analyze the possible mechanisms, thirty two healthy male New Zealand rabbits were divided randomly into four groups: control, high-fat diet, chlorpyrifos and high-fat diet + chlorpyrifos group. Subtoxic dose of chlorpyrifos (20 mg/kg•d) was administered by lavage every day for six months. The levels of serum fat, activities of cholinesterase and alanine aminotransferase, serum creatinine and blood urea nitrogen were measured respectively. The peritoneal macrophages were assembled and cellular cholesterol efflux was analyzed. Area of atherosclerosis plaque of thoracic aorta was measured by Sudan IV. Common carotid artery was fixed in formalin, sliced and HE dyed and pathology analysis system was used. The expression of ABCA1 was detected by Real-time PCR and Western blot. Compared with control group, serum TC, LDL and TG were singificantly increased and expressions of ABCA1 in liver, aorta and peritoneal macrophages were markedly increased and cholesterol efflux of peritoneal macrophages was significantly increased in high-fat diet group. There was obvious atherosclerosis lesion in thoracic aorta and common carotid artery in high-fat diet group. Compared with control group, activity of cholinesterase was singificantly decreased, but there were no symptom of intoxation and injury of function of liver and kidney, and level of HDL, expression of ABCA1 and cholesterol efflux were markedly decreased in chlorpyrifos group. Compared with high-fat diet group, activity of cholinesterase was decreased, but there were no symptom of intoxation and injury of function of liver and kidney, and expression of ABCA1 and cholesterol efflux were singificantly decreased, the atherosclerosis lesion areas in thoracic aorta and common carotid artery were increased in high-fat diet + chlorpyrifos group. These results suggest that a long time exposure to subtoxic dose of chlorpyrifos may accelerate formation of atherosclerosis induced by high fat diet in New Zealand rabbits, which the mechanism may be related to the decrease of ABCA1 expression and cholesterol efflux induced by chlorpyrifos.

Keywords chlorpyrifos, ATP-binding cassette transporter A1, cholesterol efflux, atherosclerosis **DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2010.00046

^{*}This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570754) and the Fund of The Department of Education of Hunan Province (08C746).

^{**}Corresponding author.

Tel: 86-731-82355077, E-mail: liyingliu737@yahoo.com.cn

Received: July 25, 2010 Accepted: November 8, 2010