

分类号: R541.4
单位代码: 10760

密级: 公开
学号: 107601180007



新疆医科大学

XinJiang Medical University

博士学位论文

THESIS OF DOCTOR DEGREE

学术学位 (学历教育)

论文题目: 雌激素上调 ABCA1 促进巨噬细胞胆固醇外流延缓动脉粥样硬化的机制研究

研 究 生 包 针

指 导 教 师 木胡牙提 教授

学 科 专 业 名 称 内科学 (心血管病学)

研 究 方 向 心血管疾病的基础与临床研究

研 究 起 止 时 间 2018年9月-2020年12月

所 在 学 院 第一临床医学院

2021年3月

雌激素上调 ABCA1 促进巨噬细胞胆固醇 外流延缓动脉粥样硬化的机制研究

研 究 生 包 针

指 导 教 师 木胡牙提 教授

学 科 专 业 名 称 内科学（心血管病学）

研 究 方 向 心血管疾病的基础与临床研究

2021 年 3 月

**Research on the mechanism of estrogen up-regulating
ABCA1 to promote macrophages cholesterol efflux and
delay atherosclerosis**

**A Dissertation Submitted to
Xinjiang Medical University
In Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of
Doctor of Medicine**

By

Bao Zhen

Internal Medicine (Cardiology)

Dissertation Supervisor: (Prof. Muhati)

March, 2021

中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全名	中文译名
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1	ATP 结合盒转运体 A1
ABGA1	ATP-binding cassette transporter G1	ATP 结合盒转运体 G1
AMI	Acute myocardial infarction	急性心肌梗死
ApoA1	Apolipoprotein A1	载脂蛋白 A1
As	Atherosclerosis	动脉粥样硬化
ASCVD	Arteriosclerotic cardiovascular disease	动脉粥样硬化性 心血管疾病
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CHD	Coronary heart disease	冠状动脉粥样硬化性心 脏病
CVD	Cardiovascular disease	心血管疾病
CEC	Cholesterol efflux capacity	胆固醇外流能力
E2	17 β -Estradiol	17 β 雌二醇
ER α	Estrogen Receptor α	雌激素受体 α
ESR1	Estrogen Receptor 1	雌激素受体 1

英文缩写	英文全名	中文译名
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FC	Free cholesterol	游离胆固醇
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HDL-c	High density lipoprotein cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇
LDL-c	Low density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
LDLR	Low density lipoprotein receptor	低密度脂蛋白受体
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
LXR α	liver X receptors	肝 X 受体 α
ox-LDL	Oxidized low density lipoprotein cholesterol	氧化低密度脂蛋白
RCT	Reverse cholesterol transport	胆固醇逆向转运
RT-qPCR	Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction	实时荧光定量 PCR
TC	Total cholesterol	总胆固醇
TG	Triglyceride	甘油三酯

目 录

前言.....	8
第一部分 年轻女性冠心病的临床特点及胆固醇外流能力分析.....	14
1 研究内容与方法.....	14
1.1 研究对象.....	14
1.2 内容与方法.....	15
1.3 质量控制.....	20
1.4 统计方法.....	20
2 结果.....	21
3 讨论.....	27
4 小结.....	36
第二部分 雌二醇通过雌激素受体 α 上调 ABCA1 促进巨噬细胞胆固醇外流.....	37
1 研究内容与方法.....	37
1.1 研究对象.....	37
1.2 内容与方法.....	39
1.3 质量控制.....	46
1.4 统计方法.....	47
2 结果.....	47
3 讨论.....	52
4 小结.....	60
第三部分 雌激素调节巨噬细胞 ABCA1 表达延缓动脉粥样硬化小鼠模型的研究.....	61
1 研究内容与方法.....	61
1.1 研究对象.....	61
1.2 内容与方法.....	62
1.3 质量控制.....	66
1.4 统计方法.....	66
2 结果.....	66
3 讨论.....	69
4 小结.....	76
结论.....	77
参考文献.....	78
综述 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的作用及机制研究进展.....	102
参考文献.....	108

雌激素上调 ABCA1 促进巨噬细胞胆固醇外流延缓动脉粥样硬化的机制研究

研究生：包针 导师：木胡牙提 教授/主任医师

摘要

目的：动脉粥样硬化是发生心血管疾病最重要的病理生理基础，目前研究表明，胆固醇的逆向转运是有效的预防甚至逆转动脉粥样硬化斑块的体内机制，其中斑块内的巨噬细胞胆固醇外流是胆固醇逆向转运的起始步骤。本研究聚焦于雌激素对动脉粥样硬化的保护机制，以巨噬细胞胆固醇外流为研究内容，通过对年轻女性冠心病患者胆固醇外流相关指标的分析，探讨年轻女性冠心病的临床特点；在体外研究中探究雌二醇对巨噬细胞胆固醇外流的作用靶点，并在小鼠体内进行验证。为雌激素在心血管保护作用提供新的理论依据。**方法：**1) 以行冠状动脉造影明确冠心病的年轻女性为病例组，以同年龄段冠状动脉造影阴性的女性为对照组，比较两组的临床基线资料，以及雌激素水平、血浆的胆固醇外流能力、外周血中 ABCA1、ABCG1、ER α mRNA 的表达差异。2) 将 J774A.1 细胞分为对照组、雌二醇、氟维司群+雌二醇三组，通过胆固醇外流率实验、泡沫细胞诱导实验观察三组间的表型差异，在 mRNA 和蛋白水平检测巨噬细胞胆固醇外流基因的表达是否受雌二醇的影响。根据实际情况构建靶基因的小干扰 RNA，进一步验证其中的调控关系。3) 以 apoE 基因敲除的雌性小鼠作为研究对象，分为假手术组 (sham)、卵巢切除组 (OVX)、卵巢切除组+雌二醇灌胃组 (OVX+E2)，三组小鼠均用高脂饮食喂养 8 周构建动脉粥样硬化模型，检测组间主动脉根部斑块形成以及冠状动脉 ABCA1 表达的差异；分离腹腔巨噬细胞，检测其 ABCA1、ABCG1、雌激素受体 α 的表达情况。**结果：**1) 以 55 岁为分界点，不同年龄段下冠心病组和对照组间的基线资料显示，年龄 \leq 55 岁的女性冠心病组 BMI 高于其余三组，HDL-c 低于其余三组；差异均具有统计学意义；年龄 \leq 55 岁的对照组 TG 低于冠心病组；高血压、糖尿病在冠心病组的比例高于同年龄段的对照组。年龄 \leq 55 岁的女性研究对象以是否绝经进行分组，不同分组下冠心病组和对照组的基线资料显示，无论绝经与否，冠心病组的 BMI、高血压和糖尿病的比例、TC 均大于对照组；HDL-c、apoA-1 在冠心病组的水平低于同绝经状态下的对照组。抽提年龄 \leq 55 岁的女性研究对象外周血中总 RNA，用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的 mRNA 表达水平，结果显示冠心病组 ABCA1、ESR1 mRNA 的表达水平低于对照组。通过 GEPIA 在线数据库分析发现，健康人外周血中 ESR1、ABCA1 的

mRNA 具有较强相关性, 相关系数 $R=0.75$, $P=0$ 。针对年龄 ≤ 55 岁的女性冠心病的 Logistic 多因素分析显示, 不纳入 ABCA1 mRNA 模型 1 中, 患有高血压的年轻女性患冠心病的风险是非高血压的 2.11 倍, 患有糖尿病的年轻女性患冠心病的风险是非糖尿病的 3.91 倍; TC 每增加 1 个单位, 年轻女性发生冠心病的风险增加 61%。纳入 ABCA1 mRNA 模型 2 中, 对于年轻女性年龄每增长 1 岁, 患冠心病的风险增加 27%, BMI 每增加 1 个单位, 冠心病的风险增加 40%; TC 每增加 1 个单位, 患冠心病的风险增加 383%。2) 在体外研究中, 分别用雌二醇、雌二醇+氟维司群孵育小鼠单核巨噬细胞 J774A.1, 用 NBD 荧光标记的胆固醇检测胆固醇外流率, 无论是 HDL 还是特殊处理的标准血清作为胆固醇外流诱导液, 雌二醇孵育组的 J774A.1 细胞的胆固醇外流率高于对照组, 雌二醇+氟维司群孵育组可以逆转雌二醇促进胆固醇外流的作用, 并且低于对照组的胆固醇外流率。以 ox-LDL 诱导 J774A.1 的泡沫细胞中, 雌二醇孵育组细胞内脂滴含量低于对照组, 雌二醇+氟维司群孵育组的脂滴含量高于对照组和雌二醇组。在雌二醇孵育的细胞中, ABCA1 mRNA 在浓度为 100nM 和 1000nM 雌二醇处理组的上调倍数相对于对照组有统计学差异, ABCA1 mRNA 水平在雌二醇+氟维司群组中均降低。在蛋白水平上, 雌二醇处理组的 ABCA1 总蛋白以及膜蛋白水平平均高于对照组, 而雌二醇+氟维司群共孵育组 ABCA1 蛋白低于雌二醇处理组。用 siRNA 敲低 ESR1 后, ABCA1 mRNA 和蛋白的表达降低, 同时加用雌二醇后 ABCA1 的表达并没有增加; 用 siRNA 敲低 si-LXR α 后, ABCA1 mRNA 和蛋白的表达降低了, 在敲减 LXR α 的基础上加入雌二醇后, ABCA1 的表达相对于单独的 LXR α 敲减组增加。3) 在动物实验中, OVX 组小鼠体重高于 sham 组, OVX+E2 组小鼠体重也高于 sham 组, OVX 组和 OVX+E2 组间无差异; OVX 组主动脉斑块面积及斑块中脂质含量大于 sham 组和 OVX+E2 组, OVX+E2 组主动脉斑块面积及斑块中脂质含量大于 sham 组。提取腹腔巨噬细胞的蛋白印迹结果可见, ABCA1、ABCG1、ER α 蛋白在 OVX 组最低, 且与 sham 组和 OVX+E2 组比较均有统计学差异, OVX+E2 组 ABCA1、ABCG1、ER α 蛋白表达高于 OVX 组, 同时低于 sham 组。在冠状动脉免疫组化中显示冠状动脉有 ABCA1 的表达, 其中 OVX 组 ABCA1 表达低于 sham 组和 OVX+E2 组, OVX+E2 组中 ABCA1 的表达低于 sham 组。**结论:** 1) 年轻女性冠心病患者表现出高 BMI、高血压和糖尿病合并率, 以及高 TG, 低 HDL-c, 这在未绝经的年轻女性中更为明显。ESR1 和 ABCA1 mRNA 具有良好的相关性, 且在年轻女性冠心病患者中两者表达均低于对照组。不纳入 ABCA1 mRNA 模型 1 中高血压、糖尿病、TC 是年轻女性 CHD 的独立危险因素; 纳入 ABCA1 mRNA 模型 2 中, 年龄、BMI、TC 是年轻女性 CHD 的独立危险因素。2) 雌二醇能促进小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 胆固醇外流, 减少巨噬细胞源泡沫细胞内脂滴的形成; 这是通过雌二醇与 ER α 结合后对 ABCA1 的正向调控实现的, 且独立于 LXR α 对 ABCA1 的正调控作用。3) 内源性

摘 要

雌激素缺失会导致雌性小鼠体重增加，主动脉粥样硬化斑块面积增加，冠状动脉内 ABCA1 下调；补充雌二醇可以在一定程度上延缓小鼠因内源性雌激素缺失引起的动脉粥样硬化，这部分原因是通过上调 ABCA1 实现的；内源性雌激素缺失的雌性小鼠腹腔巨噬细胞内 ABCA1、ABCG1、ER α 表达下降，补充雌二醇可以改善这种作用，但不能完全矫正。

关键词：雌激素，雌激素受体，ATP-结合盒转运蛋白 A1，
胆固醇外流，动脉粥样硬化

Research on the mechanism of estrogen up-regulating ABCA1 to promote macrophages cholesterol efflux and delay atherosclerosis

Postgraduate: BaoZhen Supervisor: Prof. Muhuyati

Abstract

Objective: Atherosclerosis is the most important pathophysiological basis for cardiovascular disease. Current studies have shown that reverse cholesterol transport is an effective mechanism for preventing or even reversing atherosclerotic plaques. Cholesterol efflux from macrophages in plaques is the initial step of cholesterol reverse transport. This study focuses on the protective mechanism of estrogen on atherosclerosis, and uses macrophage cholesterol efflux as the research content. Through the analysis of cholesterol efflux related indicators in young women with coronary heart disease, the clinical characteristics of young women with coronary heart disease are explored; in vitro studies are conducted to explore the target of estradiol on cholesterol efflux from macrophages and validated in mice. Provide a new theoretical basis for estrogen in cardiovascular protection. **Methods:** 1) The young women who had confirmed coronary artery disease by coronary angiography were used as the case group, and the women with negative coronary angiography in the same age group were used as the control group. The clinical data of the two groups were compared, as well as estrogen levels, plasma cholesterol efflux capacity, and the expression of ABCA1, ABCG1, ESR1 mRNA in peripheral blood is different. 2) Divide J774A.1 cells into three groups: control group, estradiol group, fulvestrant + estradiol group, and observe the phenotypic differences between the three groups through cholesterol efflux experiment and foam cell induction experiment. Detection of macrophage cholesterol efflux gene expression is affected by estradiol. Construct the small interfering RNA of the target gene according to the actual situation to further verify the regulatory relationship. 3) Take the C57BL/6 female mice with apoE knockout as the research object, they are divided into sham operation group (sham), ovariectomized group (OVX), ovariectomized group + estradiol group (OVX+E2), The atherosclerosis model was constructed with high-fat diet for 8 weeks. The differences in the formation of aortic

root plaque and the expression of ABCA1 in coronary arteries were detected between the groups; the peritoneal macrophages were isolated and the expressions of ABCA1, ABCG1 and ER α were detected. **Results:** 1) Taking 55 years as the demarcation point, the baseline data between the coronary heart disease group and the control group of different age groups show that the BMI of the coronary heart disease group of women ≤ 55 years old is higher than the other three groups, and the HDL-c is lower than the other three groups, the differences were statistically significant; the TG of the control group ≤ 55 years old was lower than that of the coronary heart disease group; the proportion of hypertension and diabetes in the coronary heart disease group was higher than that of the control group of the same age. Women subjects ≤ 55 years of age were divided into groups according to whether they were menopausal or not. The baseline data of the coronary heart disease group and the control group showed that regardless of menopause, the BMI, proportions of hypertension and diabetes, TC in the coronary heart disease group were greater than those of the control group; The levels of HDL-c and apoA-1 in the coronary heart disease group are lower than those of the control group in the same menopausal state. The total RNA in the peripheral blood of female subjects ≤ 55 years of age was extracted, and the mRNA expression level of the target gene was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that the expression levels of ABCA1 and ESR1 mRNA in the coronary heart disease group were lower than those in the control group. Through the analysis of the GEPIA online database, it is found that the mRNAs of ESR1 and ABCA1 in the peripheral blood of healthy people have a strong correlation, with the correlation coefficient $R=0.75$ and $P=0$. The Logistic multivariate analysis of coronary heart disease in women aged ≤ 55 years showed that without ABCA1 mRNA model, the risk of coronary heart disease in young women with hypertension is 2.11 times that of non-hypertension. Young women with diabetes suffer from coronary heart disease risk of coronary heart disease is 3.91 times that of non-diabetic patients; for every 1 unit increase in TC, the risk of coronary heart disease in young women increases by 61%. Included in ABCA1 mRNA model, young women increase their risk of coronary heart disease by 27% for every 1 year old; and the risk of coronary heart disease increases by 40% for every 1 unit increase in BMI; and for every 1 unit increase in TC, the risk of coronary heart disease increases by 383%. 2) In in vitro studies, mouse mononuclear macrophages J774A.1 were incubated with estradiol, estradiol + fulvestrant, and NBD fluorescently labeled cholesterol was used to detect the cholesterol outflow rate, whether it was HDL or special treatment standard serum was used as cholesterol efflux induction solution, the

cholesterol efflux rate of J774A.1 cells in the estradiol incubation group was higher than that of the control group. The estradiol + fulvestrant incubation group could reverse the effect of estradiol in promoting cholesterol efflux, and Lower than the cholesterol outflow rate of the control group. In the foam cells induced by ox-LDL in J774A.1, the lipid droplet content in the estradiol incubation group was lower than that in the control group, and the lipid droplet content in the estradiol + fulvestrant incubation group was higher than that in the control group and estradiol group. In estradiol-incubated cells, ABCA1 mRNA was significantly different in the upregulation folds of the 100nM and 1000nM estradiol treatment groups compared to the control group, and ABCA1 mRNA levels were reduced in the estradiol+fulvestrant group. At the protein level, the total ABCA1 protein and membrane protein levels of the estradiol treatment group were higher than those of the control group, while the ABCA1 protein of the estradiol + fulvestrant co-incubation group was lower than that of the estradiol treatment group. After knocking down ESR1 with siRNA, the expression of ABCA1 mRNA and protein decreased, the expression of ABCA1 did not increase after adding estradiol; after knocking down si-LXR α with siRNA, the expression of ABCA1 mRNA and protein decreased. After adding estradiol on the basis of LXR α , the expression of ABCA1 increased relative to the LXR α knockdown group alone. 3) In animal experiments, the weight of mice in the OVX group was higher than that of the sham group, and the weight of the mice in the OVX+E2 group was also higher than that of the sham group. There was no difference between the OVX group and the OVX+E2 group; the aortic plaque area and plaque in the OVX group The lipid content in the block was greater than that in the sham group and the OVX+E2 group. The aortic plaque area and the lipid content of the plaque in the OVX+E2 group were greater than that in the sham group. The Western blot results of peritoneal macrophages showed that ABCA1, ABCG1 and ER α protein were the lowest in the OVX group, and were statistically different from the sham group and the OVX+E2 group. The ABCA1, ABCG1, ER α protein expression in the OVX+E2 group was high In the OVX group, it is also lower than the sham group. Coronary artery immunohistochemistry showed that the coronary arteries had ABCA1 expression. The expression of ABCA1 in the OVX group was lower than that of the sham group and OVX+E2 group, and the expression of ABCA1 in the OVX+E2 group was lower than that of the sham group. **Conclusion:** 1) Young women with coronary heart disease show high BMI, high blood pressure and diabetes combined rate, as well as high TG, low HDL-c, which is more obvious in young women who are not menopausal. ESR1 and ABCA1 mRNA have a good correlation, and their expressions in

Abstract

young women with coronary heart disease are lower than those in the control group. In without ABCA1 mRNA model, hypertension, diabetes, and TC are independent risk factors for CHD in young women; in contained ABCA1 mRNA model, age, BMI, and TC are independent risk factors for CHD in young women. 2) Estradiol can promote cholesterol efflux from mouse mononuclear macrophages J774A.1 and reduce the formation of lipid droplets in macrophage-derived foam cells; this is achieved through the positive regulation of ABCA1 after estradiol and ER α are combined It is independent of the positive regulation of LXR α on ABCA1. 3) The lack of endogenous estrogen can cause female mice to gain weight, increase the area of aortic atherosclerotic plaques, and down-regulate ABCA1 in the coronary arteries; supplementation of estradiol can delay mice due to endogenous estrogen to a certain extent Atherosclerosis caused by deletion is partly caused by the up-regulation of ABCA1; the expression of ABCA1, ABCG1 and ER α in the peritoneal macrophages of female mice lacking endogenous estrogen decreases, and supplementation of estradiol can improve this effect, But it cannot be completely corrected.

Key words: Estrogen; Estrogen receptor; ATP binding cassette transporter A1;
Cholesterol efflux; Atherosclerosis

前 言

1 心血管疾病的流行现状

目前心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) 是造成全球死亡人数的主要病因, 危害着 18 岁以上各年龄层人群的健康, 主要包括冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病, coronary heart disease, CHD) 和脑卒中^[1]。1990 年-2019 年期间, 由 204 个国家和地区数据的估算值看, CVD 总流行情况从 1990 年的 2.71 亿人增长至 2019 年的 5.23 亿人, 且由 CVD 导致的死亡数量在 1990 年时为 1210 万, 到 2019 年已经达到 1860 万^[2], 预计到 2040 年仍为导致全球死亡人数最多的首位原因^[3]。可见 CVD 在全球范围内呈现持续增长态势。这让临床医生以及研究者们不得不重视 CVD 的危险因素管理, 以期能控制其导致的疾病负担。

全球疾病负担研究提示, 1990-2017 年期间, 全球范围内增加的冠心病死亡报告中, 中国约占 38.2%^[4]。由于国内社会经济体不断迅速发展, 伴随着人口结构的改变, 我国人口的疾病谱逐渐表现出显著的变化。特别是基于我国老龄化加剧和城镇化格局的转变, 加之国人对 CVD 相关的危险因素认识度和重视度不足, 最终致使 CVD 流行趋势日益扩大。据 2019 年《中国心血管健康与疾病报告》^[5]估算, 当前我国 CVD 患病总数已达到 3.30 亿人, 其中 1100 万人患有 CHD, 2.45 亿人患有高血压。因 CVD 导致的死亡人数是包括城镇和乡村在内的总死亡原因的第一位, 其中在农村占比 45.91%, 在城市占比 43.56%。我国以及全球范围内 CVD 导致的医疗经济负担逐渐加重, CVD 的防治任务迫在眉睫。2007-2012 年期间, 北京市急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 住院率增长了 49.5%, ST 段抬高性心肌梗死人数与非 ST 段抬高性心肌梗死人数比例从 6.5:1 降为 1.3:1。而女性非 ST 段抬高性心肌梗死的占比超过了 ST 段抬高性心肌梗死患者^[6]。可见在全球范围内 CVD 造成了严重的疾病负担, 针对 CVD 的防治措施是势在必行的。

2 胆固醇代谢对心血管疾病的作用机制

CVD 主要是由动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 引起的, 其中 As 斑块的形成是由胆固醇在血管内皮下沉积后, 循环中巨噬细胞向受损的内皮细胞聚集, 并吞噬局部沉积的胆固醇后转化为荷脂的泡沫细胞, 不断增加的泡沫细胞逐渐形成 As 斑块。胆固醇在 As 病变全程发挥关键作用, 因此胆固醇代谢途径是治疗动脉粥样硬化性心血管疾病 (Atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 的重要靶点。其中 As 病变中巨噬细胞内胆固醇稳态影响着病变的进展及稳定性。

2.1 胆固醇对心血管疾病风险的影响

循环中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 作为与 ASCVD 有明确因果关系的首位影响因素, 血清中的低密度脂蛋白胆固醇 (Low density lipoprotein cholesterol, LDL-c) 水平可预测 CHD 发病风险^[7,8]。2017 年数据显示, 导致 CVD 死亡的前三位原因分别是高血压、高钠饮食和高 LDL-c^[9]。一项纳入 20954 人的队列研究在随访 20 年的结果证实^[10], LDL-c 是 ASCVD 的独立危险因素, 且 LDL-c 越低, 20 年内患 ASCVD 的风险就越低, 反之则越高。基于 CHNS 研究数据同样支持这一结论, 控制血脂的治疗可以减少 970 万例 AMI 和 780 万例脑卒中事件, 减少 340 万例的心血管病死亡^[5]。最新调查研究显示, 我国高胆固醇血症患者较 2010 年人数增长了 2-4 倍, 其中高 TC 和高 LDL-c 的患病率分别是 28.5% 和 26.3%, 高于其他两种类型: 低高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-c) 和高甘油三酯 (Triglyceride, TG), 表明我国人群中脂代谢紊乱正在向高胆固醇血症类型发展^[11]。

2.2 As 病变中巨噬细胞的胆固醇摄取

在正常情况下, 外周组织通过低密度脂蛋白受体 (Low-Density Lipoprotein Receptor, LDLR) 摄取 LDL (富含 ApoB)。然而, 在 As 病变中巨噬细胞摄取胆固醇主要是依赖于清道夫受体 (Scavenger receptors, SRs)。这与 LDLR 的功能相关: 一方面, 当细胞中存在过多的胆固醇, LDLR 受 SCAP-SREBP-2-PCSK9 途径负反馈调节作用, 减少其摄取 LDL 作用^[12]。另一方面, 泡沫细胞的形成主要是由于修饰的 LDL (主要是 ox-LDL) 过度积累的结果, 而 LDLR 主要摄取天然的 LDL。修饰后的 LDL 可以通过质膜 SRs 被巨噬细胞吸收, 其中 SR-A、CD36 (SR-B) 起主要作用, 在 As 中可清除 75-90% 的修饰后 LDL^[13]。在 As 病变中, 巨噬细胞主要负责摄取修饰的 LDL, 清除局部沉积的 LDL, 进而避免修饰后 LDL 造成的损伤、炎症等。与 LDLR 不同, SRs 在吸收 ox-LDL 的过程是不存在负反馈调节的。因此 As 斑块中胆固醇平衡被打破, 使得巨噬细胞不能完全消化摄入的 ox-LDL, 最终胆固醇过度沉积、巨噬细胞转化为泡沫细胞。最近一项研究发现, JAK-STAT 可以调控巨噬细胞 SRs 介导的修饰后 LDL 摄取, 阻断 JAK-STAT 通路可以抑制修饰后 LDL 的摄取以及 LPS 激活的巨噬细胞中 CD36、SR-A 的表达^[14]。CD36 是一种 B 类 SR 膜糖蛋白, 可被不同转录因子在转录水平上调控。PPAR γ 可与 CD36 启动子内特定序列结合参与其正向调控, 增加巨噬细胞摄取 ox-LDL; 而进入胞内的 ox-LDL 又可以持续激活巨噬细胞中 PPAR γ , 从而诱导 CD36 的表达使巨噬细胞摄取更多 ox-LDL, 形成胆固醇摄取的恶性循环^[15]。然而体内研究表明, SR-A 和 CD36 的缺失并不影响 As 病变的大小, 而是导致斑块内核心坏死、巨噬细胞凋亡以及炎症反应减少^[16]。这可能和 As 病变早期和进展期斑块内的巨噬细胞发挥不同功能相关。

2.3 细胞内胆固醇的酯化

ox-LDL 被摄取进入细胞后, 在溶酶体内可被特殊的酶水解为游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 和游离脂肪酸 (free fatty acids, FA)。FC 转移至内质网后, 在酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 (Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferases, ACATs) 的作用下酯化为胆固醇酯, 最终成为泡沫细胞的“泡沫”。FC 具有细胞毒性, ACATs 诱导的酯化是防止 FC 在细胞内聚集产生细胞毒性的重要途径。胞内胆固醇酯化仅存在 ACATs 家族一种酶, 包括两个成员 ACAT1、ACAT2。ACAT1 广泛分布在外周细胞中, 在 As 斑块中形成泡沫细胞的巨噬细胞中高度表达^[17], 是巨噬细胞中胆固醇酯化的主要酶。ACAT2 在小肠和肝脏细胞中高表达, ACAT2 酯化作用可增加肠上皮细胞的胆固醇吸收, 阻断 ACAT2 的作用可降低饮食引起的高胆固醇血症^[18]。与许多其他参加细胞胆固醇代谢的酶或蛋白质不同, ACATs 的表达不受转录因子 SREBP 的转录水平调控。在转录水平的研究表明, 干扰素- γ (IFN- γ) 在人血单核细胞源性巨噬细胞中引起 ACAT-1 mRNA 上调^[19]。抑制 ACAT1 后引起的胞内 FC 增多, 引起细胞毒性作用, 这也是脂代谢基础研究向临床应用转化的难点。

2.4 细胞内胆固醇的外流

胆固醇过量富集具有细胞毒性, 机体也存在平衡胆固醇的调节机制。储存在胞质中的脂滴转移至溶酶体后, 在酸性脂肪酶的催化下胆固醇酯可以再次水解为 FC。细胞内的 FC 在特殊蛋白的作用下转运至细胞外, 并与 ApoA1 和 (或) HDL 结合最终形成 HDL-c, HDL-c 随血液至肝脏后最终以胆汁酸的形式离开体内, 这被称为胆固醇逆向转运 (Reverse cholesterol transport, RCT)^[20]。RCT 可以促进 As 斑块消退, 减少斑块不稳定性^[21]。巨噬细胞特异性的胆固醇外流是 RCT 的关键起始步骤, 是 As 斑块稳态及进展的有效保护机制。巨噬细胞的胆固醇外流能力 (Cholesterol efflux capacity, CEC) 可以用来评估 FC 由细胞内转运至细胞外的效率, 越来越多的研究显示, CEC 与 CVD 风险呈负相关, 是 CVD 的有效保护因素^[22]。CEC 除了与循环中 HDL 颗粒浓度及大小相关, 还与参与 FC 跨膜转运蛋白相关。外周组织的细胞中存在参与胞内胆固醇外流的转运蛋白, 即参与细胞内 FC 向细胞外运输的细胞膜蛋白, 主要为 ATP 结合盒转运蛋白 A1/G1 (ATP binding cassette transporter A1/G1, ABCA1/G1)。ABCA1、ABCG1 均为多重跨膜蛋白, 分别将胞内多余的 FC 转运至胞外的贫脂的 apo-A1 和 HDL, 以达到细胞内的胆固醇稳态。目前 FC 通过 ABCA1、ABCG1 转运至胞外脂蛋白的具体方式仍是存在争议的。肝 X 受体 (liver X receptors, LXRs) 作为核受体转录因子参与 ABCA1、ABCG1 的正向调节, 此外, 最新研究显示, 转运驱动蛋白结合 2 (Trafficking Kinesin Protein 2, TRAK2)、lncRNA MeXis 可参与 LXRs 介导的 ABCA1 转录, 调节巨噬细胞胆固醇流出^[23,24]。这为针对 RCT 的抗 As 治疗提供了新的方向。

3 女性冠心病的临床特点

公众普遍认为冠心病患者中男性偏多,国家健康和营养检查调查(NHANES)的数据对 1988-1994 年和 1999-2004 年期间,年龄在 35-54 之间的人群心肌梗死患病率进行了性别比较发现,男性心肌梗死患病率高于女性,然而随着时间推移,这种现象发生反转^[25]。总的来说,在 CHD 患者中男性的患病和死亡风险均大于女性^[26]。这种性别差异性表现似乎不能简单的用生活方式和危险因素来解释,在 50 岁以前,女性患心血管疾病的风险比男性低得多,但绝经后这种保护现象消失了^[27]。这可能得益于激素作用下的脂质代谢的特点,因为有激素紊乱的妇女(如多囊卵巢综合征,一种低雌激素水平),比健康妇女更早发生 As 和心肌梗死^[28,29]。曾经普遍认为更年期过渡导致的内源性雌激素水平较低和内源性雄激素水平较高可能介导绝经后女性日后心血管疾病风险的增加^[27,30]。但基于此理论的绝经后激素替代治疗(Hormone replacement therapy, HRT)并未在临床 CVD 的预防及治疗中推荐应用。

对于 CHD 的发病风险,男性和女性都有相同的 CVD 危险因素,与女性相比,男性往往有更多的不利的危险因素。在爱丁堡心脏研究^[31]中的男性在吸烟、膳食纤维、血液粘度、尿酸、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯方面的危险因素中明显多于女性。而男性仅有三种有利因素:更多的体力活动、更多的酒精摄入,和较低的纤维蛋白原水平。这种差异持续存在于经危险因素差异调整的研究和按危险因素水平分层的研究^[32]。男性的脂质沉积模式导致冠状动脉阻塞性病变,而女性的脂质沉积模式是弥漫性的,表现为非阻塞性缺血性疾病,即缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)^[33]。IHD 可由病理性血管反应性,如痉挛和内皮功能障碍、微血管功能障碍引起,在女性更常见^[34, 35]。非梗阻性冠心病但有微血管功能障碍的复发性胸痛综合征的妇女在未来的 5-8 年内发生冠心病事件的风险增加了 2 倍,急性事件后再住院和再行血管造影的风险比无这些症状的妇女高 4 倍^[36, 37]。非梗阻性 CHD 的病理生理机制目前还不完全清楚。

虽然女性非梗阻性 CHD 多见,但即便是梗阻性 CHD,女性也表现出异于男性的临床特点。在梗阻性 CHD 患者中,女性冠状动脉出现侧支循环的可能性比男性低^[38]。此外,在 AMI 后第一天,即使是在控制年龄的情况下,女性的死亡率也更高,其中死于心律失常的几率较低,更多的是死于心脏破裂,这与是否使用溶栓治疗无关^[39-43]。相反,缺血性后恶性心律失常引起的猝死在男性更常见,女性心梗后心力衰竭的风险高于男性,也有更多的心梗后再住院治疗率^[44, 45]。在部分研究中,调整年龄和并发症的差异后,女性心肌梗死后的住院总死亡率仍高于男性^[46]。与男性的解剖结构相比,女性有较高的冠状动脉血流量,但心外膜冠状动脉较小,这可能是导致临床上显著的高水平切应力状态,是 CHD 易感性性别差异的原因之一;此外,女

性在整个生命周期内切变应力和炎症介质的差异，可能使易感患者的冠心病发展为弥漫型，且冠状动脉运动功能障碍的比例大于男性^[47, 48]。

一项急诊胸痛的研究发现，因非创伤性胸痛就诊于急救中心的女性，划归于“立即就诊”或“十分钟内就诊”的概率比男性小 18%，接受肌钙蛋白检测的概率小 20%，被转至特殊照顾病房的比例会小 36%；说明有胸痛症状的女性会因早期干预治疗不足面临更糟糕的预后^[49]。此外，女性在更年期状态下症状不易与不典型心绞痛区别，导致了女性缺血性心脏病的忽视。这些流行病学调查显示，女性在冠心病的诊疗中并未得到充分的重视，这可能是造成女性冠心病不良预后的因素之一。

4 雌激素在脂代谢中的作用

相对于男性，女性更年期前可以免于因肥胖导致的ASCVD风险，这考虑与性激素的潜在作用机制相关。一项对约20,000名受试者样本中进行的影响脂质代谢位点的全基因组分析中^[50]，有三个位点显示性别特异性效应：①3-羟丙基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶（HMG-CoA），作为胆固醇合成的限速步骤，是调节血脂治疗的靶点，对女性的影响更大；②硫酸软骨素蛋白多糖（NCAN）基因，参与细胞粘附和迁移，对男性的影响更大，这两个位点都与TC有关；③脂蛋白脂酶（LPL）与男性HDL的相关性大于女性。但性激素与以上三种基因的关系并不明确。男性的内脏脂肪几乎是绝经前女性的2倍，女性的皮下脂肪堆积也比男性高^[51]。内脏脂肪和皮下脂肪都有助于体重增加，但内脏脂肪的增加更为明显，心血管疾病的危害也更大^[52]。因此，雌激素在胆固醇代谢以及肥胖相关的心血管病风险中存在特异性，这也可能是导致性别差异的心血管病风险的潜在机制。

研究者在HMG-CoA还原酶基因内发现了一个功能性雌激素反应元件，在随后的研究中发现雌二醇治疗可以降低肝细胞中的FC含量^[53]。动物研究表明，雌性或雌二醇处理的雄性大鼠的HMG-CoA还原酶蛋白低于未处理的成年雄性大鼠，这是通过对核胆固醇调节元件结合蛋白2（SREBP2）的活性调控实现的^[54]。雌激素受体 α （estrogen receptors, ER α ）激动剂可以抑制HMG-CoA还原酶表达和肝胆固醇含量，并伴有SREBP2的下调^[55]。此外，雌二醇增加了人肝癌细胞表面LDLR活性，但并不增加人成纤维细胞的细胞表面LDLR活性^[56]。这与雌激素具有靶器官特异性功能活性作用相关。在大鼠研究中，药物剂量雌激素可以刺激肝细胞LDLR表达升高，同时伴随着血浆LDL-c清除率显著上升，同时血浆胆固醇降低^[57,58]。在人肝HuH7细胞中，LDLR蛋白水平通过雌二醇呈剂量依赖性增加，然而，除非是高剂量雌二醇，否则LDLR mRNA不会增加，这表明雌激素对LDLR的翻译后调节作用。此外，雌激素也可能通过改变PCSK9的活性促进LDL介导的胆固醇摄取，因为雌二醇治疗不能增加PCSK9敲除HuH7细胞中LDLR^[59]。雌激素对LDLR的调节可能是通过PCSK9发挥的作用，但在这

些实验中，雌激素均为药物剂量，生理浓度下不同浓度雌激素对LDLR是否同样存在调节作用需进一步实验证实。雌激素还可以通过膜受体GPER发出信号，该受体在包括肝脏在内的多个组织中表达^[60,61]。在喂养致As饮食的小鼠中，GPER的全身缺失会加速As并增加LDL-c水平，但具体的机制目前尚不清楚^[62]。这些研究结果说明肝脏作为雌激素的一个重要靶器官，参与肝脏的胆固醇代谢。在未绝经的女性人群，雌激素浓度与CEC无关^[63]。但多囊卵巢综合征（低雌激素）患者CEC是降低的^[64]。在绝经后妇女中，HRT有效地提高巨噬细胞CEC^[65]。有几个研究组发现，雌激素上调了高密度脂蛋白受体SR-BI的mRNA表达，促进了外周组织HDL-c的摄取^[66,67]。因此，雌激素对肝脏HDL摄取调节可能与CVD风险的性别差异相关，刺激这一途径可能是防治CVD的治疗目标。

综上所述，女性心血管病患者在临床表现以及胆固醇代谢中具有激素水平相关的特点，这让研究者关注于性激素在冠心病中的作用，以期能通过其中的保护或损伤机制降低人群的发病率。本研究聚焦于雌激素对As的保护机制，以RCT的起始限速步骤巨噬细胞胆固醇外流为研究内容。通过对年轻女性CHD患者胆固醇外流相关指标的分析，探讨年轻女性CHD的潜在危险因素。在体外研究中探究雌二醇对巨噬细胞胆固醇外流的作用靶点，最后在小鼠体内进行验证。通过本研究为雌激素在心血管保护作用提供新的理论依据。

第一部分 年轻女性冠心病的临床特点 及胆固醇外流能力分析

女性性别特征对 CHD 风险的影响一直是女性 As 的研究方向及热点。未绝经女性 CHD 的低风险在绝经后逐渐消失,并表现为与年龄相关的正增长。虽然心血管事件的急救措施在不断完善,但在年轻女性(年龄 <55 岁)群体中 CHD 的发病率以及死亡率并没有明显改善,说明目前对女性 CHD 人群,特别是年轻女性群体的防治重视程度仍然不够^[68]。目前 CHD 的研究对象以男性居多,实际上不同性别在 CHD 的发病风险以及预后上存在明显的差异。例如与男性患者相比,女性 CHD 患者血运重建术后,住院时间、院内死亡率、出血并发症均表现出较严重的现象^[69,70]。因此针对女性 CHD 诊断和治疗策略研究有助于改善女性 CHD 患者的预后,“精准医疗”也应该体现在 CHD 诊疗中的性别差异性上。

在队列研究中发现,HDL-c 的性别差异很大程度上解释了 CVD 风险的男女性别差异^[71,72],提示 HDL 介导的 RCT 在 CVD 的风险中可能存在性别差异。HDL 介导的 As 保护作用在本质上很可能是多效性的,HDL 通过接受由巨噬细胞排出的胆固醇促进 RCT 的能力被认为是冠脉保护关键的作用。影响巨噬细胞 CEC 的因素主要包括两方面:一个是位于细胞膜上参与胆固醇向胞外转运的膜蛋白 ABCA1、ABCG1;另一个是血浆中胆固醇受体脂蛋白^[73,74]。本研究旨在通过对初次行冠状动脉造影术评估冠脉血管的年轻女性 CHD 患者进行分析,研究年轻女性 CHD 的临床特点以及与巨噬细胞 CEC 间可能的潜在关联性。

1 研究内容与方法

1.1 研究对象

1.1.1 研究对象的选择

纳入 2019 年 1 月-2020 年 6 月,在新疆医科大学第一附属医院心内科初步诊断考虑 CHD,而首次行冠状动脉造影检查的女性住院患者共 732 例,其中年龄 ≤ 55 岁 325 例,年龄 > 55 岁 407 例。

纳入标准:1) 女性;2) 有胸闷、胸痛等心肌缺血症状;3) 术前检查完善;(4) 术前签署知情同意书。

排除标准:1) 药物或妇科手术后绝经(包括卵巢切除后、子宫切除后、使用激素替代治疗患者);2) 肝肾功能异常、血液疾病、重度感染、恶性肿瘤、风湿免疫

性疾病患者；3) 数据不完整患者。

1.1.2 冠状动脉造影方法

术前研究对象均签署冠状动脉造影知情同意书。常规选择经右侧桡动脉入径，以 Seldinger 技术穿刺成功后送入 6 F 鞘管入桡动脉，将多功能造影导管分别送至左、右冠状动脉开口处并打入造影剂，以造影剂均匀分布全部冠状动脉，冠状动脉血管走形显像清晰完整为标准。冠状动脉造影未发现 $\geq 50\%$ 的狭窄则归入对照组，影像发现任何一支主要冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ 即可以诊断为 CHD，并归入 CHD 组。

1.1.3 患者资料收集及相关定义

收集研究对象的年龄、基础疾病史、月经史、身体质量指数 (body mass index, BMI)、血脂、冠状动脉造影结果等资料。CHD 的诊断：选择性冠脉造影检查提示主要冠状动脉管腔内径狭窄 $\geq 50\%$ 。自然绝经指无子宫或双侧卵巢切除病史的女性末次月经出现在入院前 12 个月以上。血脂相关指标的实验室检测方法为患者入院后，隔日空腹至少 8 小时后清晨采集静脉血 3ml，统一送至新疆医科大学第一附属医院临床检验科进行检测，保证实验仪器型号及检测标准的一致性。

1.1.4 血液样本的收集

住院的患者空腹至少 8 小时后采集静脉血 5ml，统一使用 EDTA 抗凝采血管。全血标本采集后 1 小时内离心分装，完全分离血浆及血细胞。采血管在 3,000rpm 水平离心机中离心 10min，吸取血浆上清时注意避免触及下层沉淀，血浆以 100ul/EP 管分装，以避免后期样本使用过程中的反复冻融。制备好的血浆于 -80°C 冰箱内分装储存待用，下层细胞沉淀放置于冰上并立即用于抽提血液总 RNA。

1.2 内容与方法

1.2.1 酶联免疫吸附实验 (Elisa)

采用碧云天 Estradiol ELISA Kit (货号: PE223)，检测研究对象血浆中雌二醇的浓度。具体实验方法遵循 Estradiol ELISA Kit 说明书执行，具体描述如下：

1.2.1.1 样品准备

前期准备好并于 -80°C 冰箱内分装储存待用的血浆，实验前将待检测血浆取出后室温溶解至液态。

1.2.1.2 检测前准备步骤

(1) Estradiol ELISA Kit 中的相关试剂及材料在室温中复温 20min。

(2) 配制适当量的洗涤液：在 20X 洗涤液中加入双蒸水，使其稀释至 1X 洗涤液，待用。

(3) 取 6 个新 1.5ml EP 管，标记 1-6 号，在 2-6 号每管均加入 250ul 的 1X 样品稀释液，在 1、2 号管中分别加入 250ul 的标准品，将 2 号管内液体充分混匀后转移 250ul 至 3 号管，重复直至 6 号管。最终得到 2,000 pg/ml、1,000 pg/ml、500 pg/ml、

250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25pg/ml 共 6 个标准品浓度，并将 1X 上述稀释液定义为 0pg/ml，总计 7 个浓度梯度的标准品。下一步将 1-7 号标准品从 0-2000pg/ml 按顺序转移至预包被板的样孔内，设置 2 个重复。每次实验都需新鲜配制梯度标准品，并相应绘制出标准曲线，同时设置只加 TMB 溶液和终止液的空白孔。

(4) 根据每次实际需要的具体孔数，使用相应的预包被板条数并安装到 96 孔板架上。剩余包被板继续在避光密封袋 4℃ 储存。

1.2.1.3 样本浓度检测

(1) 准备好的样品吸取 90 μ l 后移至预包被板孔中，样本均设置 2 个复孔。下一步按 10 μ l/孔混入试剂盒中辣根过氧化物酶雌二醇并完全混匀 10 秒钟，接着将孔板用白色膜密闭封好，在常温下反应 120min，注意避光。如样本雌二醇浓度 >2,000pg/ml，可按倍数稀释样品后继续检测，最后以倍数计算最终浓度。

(2) 手工冲洗预包被板 3 次，并在吸水纸扣至无水状态：用 300ul 排枪加入洗涤液 300ul/每孔，洗涤液在孔中的时间保持在 15-30 秒为宜，反复洗涤 3 次后将预包被板倒扣在吸水纸上轻叩，使孔内保证无水状态，然后进行下一步。

(3) 然后每孔加 TMB 溶液（显色剂）100 μ l，以白色膜将孔板封闭好，在常温下反应 15-20 分钟，注意避光。终止时间以浓度梯度的标准品开始有明显颜色梯度变化为宜。

(4) 用排枪在每个孔中加 50ul 的终止液，混匀后迅速在酶标仪上以 A450 的吸光度上机检测。

1.2.1.4 结果分析

(1) 标准品和样本的复孔的 OD 值分别取均值后作为最终的测量 OD 值，两个复孔的差距应控制在 20%。

(2) 绘制标准曲线。将标准品的梯度浓度设置为纵坐标，每个浓度对应的 A450 处 OD 值设置为横坐标，制作拟合曲线，用 CurveExpert 1.4 软件计算出最优拟合方程，最后将每个样本的 OD 测量值的均值代入拟合方程，因人血浆中雌二醇的浓度范围 <2,000pg/ml，故所有检测样本均未稀释，计算出的数值即为最终的样本雌二醇浓度。

1.2.2 外周血总 RNA 提取

采集研究对象静脉血后，使用天根高效血液总 RNA 提取试剂盒（货号：DP443）抽提全血中总 RNA。实验过程完全根据试剂盒说明书完成，描述如下：

(1) 红细胞裂解液的稀释：计算最终需要的 1 \times 红细胞裂解液 H 体积，取相应体积的 10 \times 红细胞裂解液 H，加入 RNase-Free ddH₂O 至终浓度为 1 \times 红细胞裂解液 H。

(2) 以 1: 5 的比例混合血液标本和 1 \times 红细胞裂解液 H（过程总需要使用合适体积的管子，使得两者的终体积小于容器管子的 3/4 体积）。将管子放置在冰上反应

15min, 期间可以震荡 2 次使混合液充分反应。上述过程中混合液会逐渐转变为半透明的红色, 意味着红细胞已充分裂解, 如未达到半透明可以增加 5min 反应时间。

(3) 4℃ 2,100rpm 离心 10min, 将上层液体全部吸出弃掉。红细胞以外的血细胞会以团状沉淀聚在管底。

(4) 再次加入 1×红细胞裂解液 H, 体积为使用全血样本体积的 2 倍, 充分混合消除沉淀。4℃, 2,100rpm 离心 10min, 将上层液体全部吸出弃掉。

(5) 在上一步得到的沉淀中加入 600ul 裂解液 RLH (RLH 中需新鲜添加β-巯基乙醇至终浓度为 1%), 充分震荡混匀。

(6) 组合过滤柱 CS 与收集管成套, 将上一步得到的混合液加入过滤柱 CS 内, 12,000rpm 离心 2min, 扔掉过滤柱 CS, 收集管中的滤液待用。

(7) 添加 70%乙醇 600μl 在上述收集管中的滤液里, 用移液枪完全混匀, 重新组装吸附柱 CR4 和收集管后, 将滤液加入吸附柱 CR4 内, 12,000rpm 离心 60 秒, 丢弃收集管内溶液, 再次把吸附柱 CR4 组装在收集管上。

在这一步中使用的 70%乙醇需要用 RNase-Free ddH₂O 和无水乙醇配制; 如加入乙醇后的滤液体积超过吸附柱的最大容量, 可将剩余滤液再次加入吸附柱 CR4 中重复操作。

(8) 加 700μl 的去蛋白液 RW1H 至上一步中的吸附柱 CR4 内, 12,000rpm 离心 60 秒, 丢弃收集管内溶液, 然后加 500μl 漂洗液 RW 至同一吸附柱 CR4 内, 放置反应 2min, 然后再次 12,000rpm 离心 60 秒, 丢弃收集管内溶液, 再次把吸附柱 CR4 组装在收集管上。重复加入漂洗液 RW 漂洗一次后离心弃收集管内溶液。

(9) 为了让吸附材料内的漂洗液完全蒸发, 在室温下空置吸附柱 CR4 在 5min,

(10) 将吸附柱 CR4 转入一个新的 RNase-Free 离心管中, 加入 30μl RNase-Free ddH₂O 室温放置 2min, 12,000rpm 离心 2min, 得到 RNA 溶液。

为了保证 RNA 的回收效率, RNase-Free ddH₂O 体积不应少于 30μl。得到的 RNA 溶液用于反转录 PCR, 或暂时于 -80℃ 保存。

1.2.3 PCR

1.2.3.1 RNA 浓度测定

打开 nanodrop 机器左后侧开关, 枪调 1μl, 吸取 1μl RNase-free 水滴于测定镜头, 用擦镜纸擦拭, 仪器选 Nucleic Acid-RNA→吸取 1μl RNase-free 水 (空白对照) 滴于测定镜头, Blank 校正, 用擦镜纸擦拭。吸取 1μl 样品于测定镜头, 合上镜头盖, Sample 按钮开始测定, 结果出来后记录, 用擦镜纸擦拭样品, 吸取 1μl RNase-free 水滴于测定镜头, 再用擦镜纸擦拭, 下一个样品检测。RNA 样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7-2.1 为好, 浓度在 1000ng/μl 左右为佳, 可用 RNase-free 水调整浓度, 需保证浓度在 100ng/μl 以上, 否则无法满足后续 PCR 体系中所需 RNA 的质量。

1.2.3.2 反转录 PCR (RT-PCR)

反转录使用 Thermo Scientific Fermentas 反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, 货号: K1622)。具体实验方案遵循试剂盒说明书, 所有实验过程中使用无 RNA 的酶枪头以及 EP 管, 并在冰上操作。

(1) PCR 体系 (一份样本):

RevertAid Reverse:	1ul
RiboLock RNase Inhibitor:	1ul
5x Reaction Buffer:	4ul
dNTP Mix:	2ul
Oligo (dT) :	1ul
Tatol RNA:	1000 ng
RNase-free ddH ₂ O:	补足至 20ul

(2) PCR 程序设置:

70℃变性	30s;
42℃	60min;
4℃	forever

反转录完成后将产物放在冰上准备继续下一实验, 或暂时-80℃保存。

1.2.3.3 实时荧光定量 PCR (qPCR)

定量 PCR 采用 QuantiNova™ SYBR® Green PCR kit (Cat No./ID: 208054)。实验程序及步骤按试剂盒说明书执行。实验全程使用 RNase-free 的枪头以及 EP 管, 并在冰上操作。实验所需目标基因的引物设计及合成均由上海生工完成。表 1-1 列出了用于 ABCA1, ABCG1, ESR1 (ER α 的编码基因), GAPDH 的引物序列。

表 1-1 目标基因的引物

Table 1-1 Human primers for target gene

Gene	Primer
ABCA1	Forward 5'-GCTCAGTGGGATGGATGGCAACG-3'
	Reverse 5'-CTCCGTCTGGCAATTAGCAGTCTC-3'
ABCG1	Forward 5'-GAACTGCCCAACCTACCACAACC-3'
	Reverse 5'-CCCTCCGAACCGCTCTCAC-3'
ESR1 (ER α)	Forward 5'-CCTCCTCATCCTCTCCACATCAG-3'
	Reverse 5'-GCATCTCCAGCAGCAGGTCATAG-3'
GAPDH	Forward 5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
	Reverse 5'-GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'

(1) 引物溶解

引物干粉管在 4℃ 预冷的离心机中用 4,000rpm 离心 5min, 结束后取出置于冰上。根据每管引物上标识的所需 RNase Free H₂O 体积, 加入相应体积的 RNase Free H₂O 后, 即得到浓度为 100uM 的引物储存液, 可以在 -20℃ 冰箱储存。在新的无酶 EP 管内加 10ul 引物储存液母液和 90ul RNase Free H₂O, 可以得到 10uM 的引物工作液, 工作液于 4℃ 冰箱内保存。

(2) PCR 体系 (一份样本):

2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	10μl
QN ROX Reference Dye	0.1μl
RNase Free H ₂ O	5.1μl
Primer forward (0.7 μM)	1.4μl
Primer reverse (0.7 μM)	1.4μl
cDNA sample	2μl

(3) PCR 程序设置 (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System):

Stage 1: 95℃ —— 2min

Stage 2: 95℃ —— 5 秒; 60℃ —— 30 秒; 40 个循环

Stage 3: Melt Curve Stage (系统默认设置)

最后根据扩增曲线和融解曲线评估引物特异性以及体系是否合适。

(4) 导出、拷贝数据, 计算、统计结果。使用 2^{-ΔΔCT} 方法分析了 rt-qPCR 数据。

1.2.4 血浆胆固醇外流率检测

1.2.4.1 去除 apoB 颗粒的血浆制备^[75]

首先在 pH=7.4 的 200 mM 甘氨酸缓冲液中配置 20% 聚乙二醇溶液 (PEG 8,000), 充分混匀至无沉淀析出。取制备好的研究对象血浆样本 100ul, 加入 40ul 20% 聚乙二醇溶液, 常温下放置反应 20min, 4℃ 下 10,000rpm 离心 30min, 此时 apoB 颗粒可以被沉淀, 此上清中主要包括 HDL 颗粒, 吸取上清做下一步实验。处理后的血浆用于后续的胆固醇外流实验, 去除 apoB 颗粒的血浆需新鲜制备, 当天使用, 避免血浆的反复冻融。

1.2.4.2 荧光胆固醇标记巨噬细胞^[76]

购买小鼠单核巨噬细胞系 J774A.1, 提前一天将 J774A.1 细胞接种于 24 孔板 (接种密度 10⁵/孔), 荧光标记细胞时细胞使用无酚红的完全培养基进行培养, 500ul/孔。隔日更换细胞培养液为含有终浓度为 5uM 的 22-NBD-胆固醇的无酚红、无血清高糖 DMEM + 0.2%BSA 培养, 避光操作, 培养 4h。

1.2.4.3 巨噬细胞胆固醇外流率测定

上一步到时间后去除培养基, PBS 清洗细胞表面 3 次, 然后更换为无酚红高糖

DMEM + 0.2%BSA 培养基。然后每孔中分别加入含研究对象 2.8%去除 apoB 血浆，做好标记，共培养培养 4h。吸取培养液至干净新 EP 管内，注意编号记录；在培养板中加入 500ul 用 PBS 配置好的 1%Triton 裂解液，室温裂解 10 分钟，取各孔裂解液至干净的 EP 管中，注意编号记录，全程注意避光操作。将收集好的上清和细胞裂解液，以 10,000rpm 离心 20 分钟，分别取离心后的上清液 100ul，加入黑色酶标板中，用荧光酶标仪以 469nm 作为激发波长、537nm 作为发射波长来读取荧光 (FI)。NBD-胆固醇外流率计算原理为，每个孔中的培养上清中的荧光值为分子，细胞裂解液与培养上清中总荧光值为分母，计算比值。

1.2.5 实验仪器及主要试剂

1.2.5.1 实验试剂及试剂盒

Estradiol ELISA Kit (碧云天, 货号: PE223); 高效血液总 RNA 提取试剂盒 (天根, 货号: DP443); 反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific Fermentas, 美国, 货号: K1622); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (QuantiNova™ SYBR® Green PCR kit, QIAGEN, 德国, 货号: 208054); 聚乙二醇 PEG 8,000 (Solarbio, 中国, 货号: P8260); 牛血清白蛋白 BSA-V (不含脂肪酸) (Solarbio, 中国, 货号: A8850); 22-NBD-胆固醇 (百灵威, 中国, 货号: 625332)。

1.2.5.2 实验仪器

低速台式水平离心机 (Thermo, 美国); 低温高速离心机 (Sigma, 美国); 电子秤 (YB202N, 上海怡台电子科技有限公司); 细胞培养箱 (Thermo, 美国); 恒温水浴锅 (OLABO, 中国); 倒置荧光显微镜 (Leica, 德国); 荧光酶标仪 (TECAN, 瑞士); -80℃冰箱 (Thermo, 美国); nanodrop 分光光度计 (Thermo, 美国); 反转录 PCR 仪 (Bio-RAD, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500, 美国)。

1.3 质量控制

在课题设计阶段，查阅大量国内外相关文献，并对相关重点知识及研究热点进行了综述。经课题组成员讨论并征求导师同意后，开始了研究的预实验。在预实验结果基本符合预期的基础上，开始实施后续实验。文献综述和预实验分别为课题的顺利实施提供了理论基础和实践基础，保证了课题的顺利完成。在开展实验室工作之前，通过了临床研究院安排的实验室安全和操作技能培训。整个研究的实施过程都是在实验室负责老师的指导和帮助下完成。为了保证实验结果的可靠性和稳定性，严格按照实验操作规范进行操作。实验数据的搜集、整理和处理分析均在统计学专业人员的指导和帮助下完成，保证了数据处理的科学性和可靠性。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS 23.0 软件进行分析，统计图使用 GraphPad Prism7 制作。数据满足正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{X} \pm S$) 呈现，如满足参数检验条件，两

组的比较使用 t 检验，多组间比较使用方差分析；若不符合则考虑非参数检验；多于 2 组的两两相互比较采用 LSD- t 检验。计数资料用频数（百分比）呈现，组间比较使用 χ^2 检验。二分类多因素 logistic 多因素回归分析，进入方程方法选择向前：LR。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基线资料对比

将纳入的研究对象以 55 岁为分界点分为两组，再根据是否为 CHD 分组，比较组间临床资料的差异。结果可见，年龄 ≤ 55 岁的女性研究对象 CHD 组和对照组间的年龄无差异，而年龄 > 55 岁的研究对象中，CHD 组年龄大于对照组，但无统计学差异。年龄 ≤ 55 岁的 CHD 组 BMI 高于其余 3 组，且组间比较有统计意义。4 组间高血压、糖尿病的构成比在 CHD 组中高于同年龄层的对照组。两个年龄段中 CHD 组的 TG 均高于对照组，其中年龄 ≤ 55 岁的对照组与两个 CHD 组间比较均有统计学意义。年龄 ≤ 55 岁的 CHD 组 HDL-c 低于其余 3 组且组间比较均具有统计学意义。TC、LDL-c 组间比较无统计学差异。见表 1-2。

表 1-2 不同年龄分组下女性冠心病患者临床资料分析

Table 1-2 Analysis of clinical data of female patients with CHD in different age groups

	年龄 ≤ 55 岁		年龄 > 55 岁		F/χ^2	P
	对照组 ($n=163$)	冠心病组 ($n=160$)	对照组 ($n=117$)	冠心病组 ($n=292$)		
年龄	48.10 \pm 6.51	49.44 \pm 4.64	64.80 \pm 6.18 ^{ab}	66.9 \pm 6.35 ^{ab}	515.67	0
BMI[kg/m ²]	25.45 \pm 3.97	27.18 \pm 3.72 ^a	25.35 \pm 3.10 ^b	25.10 \pm 3.55 ^b	12.15	0
高血压[例]	59 (36.2%)	96 (60.0%) ^a	62 (53.0%) ^a	203 (69.5%) ^{ac}	48.88	0
糖尿病[例]	9 (5.5%)	40 (25.0%) ^a	18 (15.4%) ^a	101 (34.6%) ^{ac}	54.53	0
TG[mol/L]	1.48 \pm 0.92	1.77 \pm 1.01 ^a	1.58 \pm .97	1.66 \pm .93 ^a	2.81	0.03
TC[mol/L]	4.03 \pm 0.71	4.26 \pm 1.08	4.15 \pm 0.96	4.23 \pm 1.06	1.93	0.12
HDL-c[mol/L]	1.22 \pm 0.33	1.05 \pm 0.28 ^a	1.22 \pm 0.32 ^b	1.16 \pm 0.30 ^b	10.89	0
LDL-c[mol/L]	2.77 \pm 0.80	2.59 \pm 0.96	2.63 \pm 0.77	2.68 \pm 0.88	1.22	0.30
病变支数					1.77	0.18
单支	-	75 (48.7%)	-	123 (42.1%)		
多支	-	79 (51.3%)	-	169 (57.9%)		

注：a 表示与年龄 ≤ 55 岁的对照组比较， $P < 0.05$ ；b 表示与年龄 ≤ 55 岁的冠心病组比较， $P < 0.05$ ；c 表示与年龄 > 55 岁的对照组比较， $P < 0.05$ 。

女性绝经前后体内的雌激素水平存在很大的差异,这也是普遍认为绝经后女性CHD发病率增高的原因。为了了解绝经状态对年轻女性CHD患者的影响,我们将年龄 ≤ 55 岁的研究对象分为未绝经和绝经组,比较两种状态下CHD组与对照组的临床资料差异。对于未绝经状态下,CHD组的年龄高于对照组(46.02 \pm 4.84比43.76 \pm 6.94),在绝经后状态中,年龄的组间数据无差异。无论绝经与否,CHD组的BMI均大于对照组。同样,无论绝经与否,CHD组的高血压和糖尿病的比例均高于对照组。TG在不同绝经状态下均为CHD组高于对照组,其中在未绝经状态下两组间比较具有统计学意义;未绝经的对照组TC最低,其仅与绝经后CHD组间存在统计学差异。无论绝经与否,HDL-c在CHD组水平均低于对照组, $P < 0.05$ 。绝经后的年轻女性LDL-c表现出高于未绝经的年轻女性,但在同样绝经状态下组间比较中无统计学差异。apoA-1在未绝经的CHD组中最低,无论绝经与否,apoA-1在CHD组的水平低于对照组,且均有统计学意义。ApoB在各组间无显著差异性。见表1-3。

表1-3 年龄 ≤ 55 岁女性冠心病患者资料分析

	未绝经		绝经后		F/ χ^2	P
	对照组 (n=70)	冠心病组 (n=65)	对照组 (n=93)	冠心病组 (n=95)		
年龄	43.76 \pm 6.94	46.02 \pm 4.84 ^a	51.37 \pm 3.67 ^{ab}	51.89 \pm 2.66 ^{ab}	59.51	0
BMI[kg/m ²]	25.06 \pm 3.53	27.26 \pm 4.20 ^a	25.745 \pm 4.27 ^b	27.09 \pm 3.39 ^{ac}	5.82	0
高血压[例]	27 (38.6%)	37 (56.9%) ^a	32 (34.4%) ^b	59 (62.1%) ^{ac}	19.02	0
糖尿病[例]	4 (5.7%)	19 (29.2%) ^a	5 (5.4%) ^b	21 (22.1%) ^{ac}	25.33	0
TG[mol/L]	1.50 \pm 1.08	1.85 \pm 1.11 ^a	1.47 \pm 0.78 ^b	1.73 \pm 0.94	2.69	0.01
TC[mol/L]	3.85 \pm 0.72	4.03 \pm 0.90	4.17 \pm 0.68	4.42 \pm 1.16 ^a	5.81	0
HDL-c[mol/L]	1.19 \pm 0.31	1.00 \pm 0.27 ^a	1.24 \pm 0.34 ^b	1.08 \pm 0.28 ^c	9.83	0
LDL-c[mol/L]	2.54 \pm 0.74	2.39 \pm 0.79	2.94 \pm 0.80 ^{ab}	2.73 \pm 1.04	6.02	0
apoA-1[g/L]	1.19 \pm 0.20	1.08 \pm 0.19 ^a	1.26 \pm 0.22 ^b	1.15 \pm 0.23 ^{bc}	9.91	0
apoB[g/L]	0.84 \pm 0.30	0.83 \pm 0.27	0.91 \pm 0.25	0.89 \pm 0.31	1.56	0.07

注: a表示与未绝经的对照组比较, $P < 0.05$; b表示与未绝经的冠心病组比较, $P < 0.05$; c表示与绝经的对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 年龄 ≤ 55 岁研究对象外周血中相关基因的表达检测

为了了解年轻女性研究对象中相关指标的差异,以外周血为实验标本,检测年龄 ≤ 55 岁的女性研究对象胆固醇外流相关基因 ABCA1/ABCG1 mRNA、ER α 的编码基

因 ESR1 mRNA 以及雌二醇浓度的表达水平。CHD 组 ABCA1 mRNA 的表达水平低于对照组, $P < 0.05$, ABCG1 mRNA 的表达水平在两组间无差异; ESR1 mRNA 在对照组的表达水平高于 CHD 组, $P < 0.05$ 。在 mRNA 水平检测时, 分别使用两对不同引物序列对 ER β 的编码基因 ESR2 的 mRNA 检测时, 其 CT 值均在 35 左右, 无计算意义。考虑为 ESR2 在外周血细胞中表达水平过低, 故检测效率低, 因此在实验结果中无 ESR2 mRNA 的检测结果。Elisa 检测年轻女性研究对象的血浆中雌二醇浓度, 左侧为以标准品制作的标准曲线以及曲线方程, 可见曲线的决定系数 $R^2 = 0.9947$ (图 A); 右侧为根据拟合方程计算出的样本中雌二醇的浓度, 结果可见雌二醇在年龄 ≤ 55 岁的女性研究对象中 CHD 组和对照组间分布无明显差异 (图 B)。见图 1-1, 图 1-2。

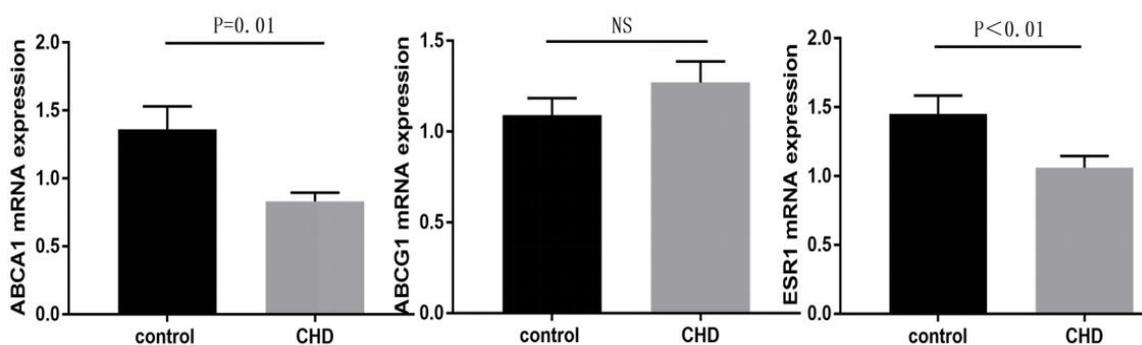


图 1-1 相关基因 mRNA 的水平检测

Fig.1-1 Detection of related gene mRNA

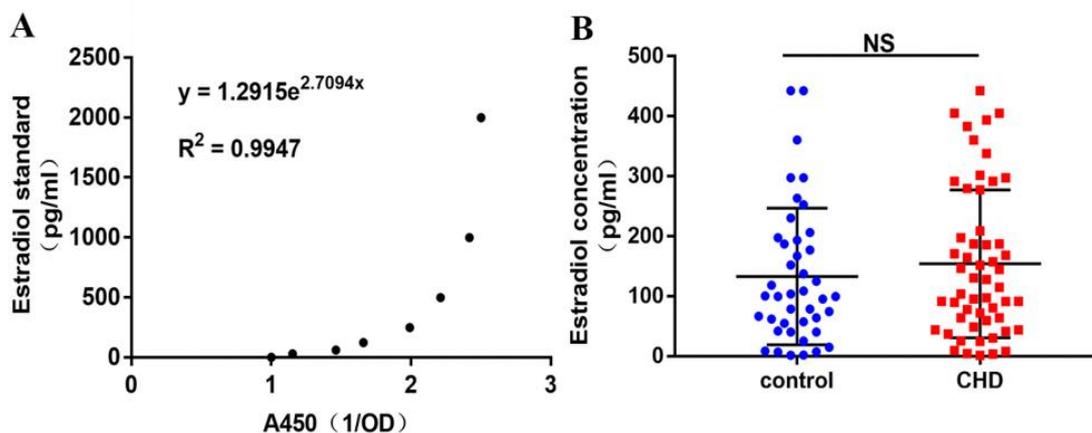


图 1-2 血浆雌二醇浓度 Elisa 检测

A: 雌二醇标准品曲线; B: 两组样本雌二醇浓度

Fig.1-2 Detection of plasma estradiol concentration by ELISA

A: Estradiol standard curve; B: Estradiol concentration of two groups of samples

2.3 雌激素受体与胆固醇外流相关基因 mRNA 表达相关性分析

为了了解雌激素受体(estrogen receptors, ER)与胆固醇外流相关基因 mRNA 表达水平之间的相关性,通过基因表达谱交互分析在线数据库(GEPIA, <http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>)对两者的相关性进行了分析。As 斑块中的巨噬细胞多来自于循环单核细胞,因此我们选择了非肿瘤的健康人外周血作为分析样本,使用 Pearson 相关系数分析相关性。结果可见,ESR1(ER α 的编码基因)和 ABCA1 mRNA 具有较强相关性, Pearson 相关系数 $R=0.75$, $P=0$ 。其次为 ESR1 与 ABCG1 之间的相关系数 $R=0.59$, $P=0$ 。ESR2(ER β 的编码基因)与 ABCA1、ABCG1 的相关系数 R 分别为 0.51 和 0.52, P 均=0。作为已知的参与调节 ABCA1/G1 表达的转录因子 LXR α (编码基因为 NR1H3),其与 ABCA1、ABCG1 的相关系数 R 分别为 0.26 和 0.24。见图 1-3、表 1-4。

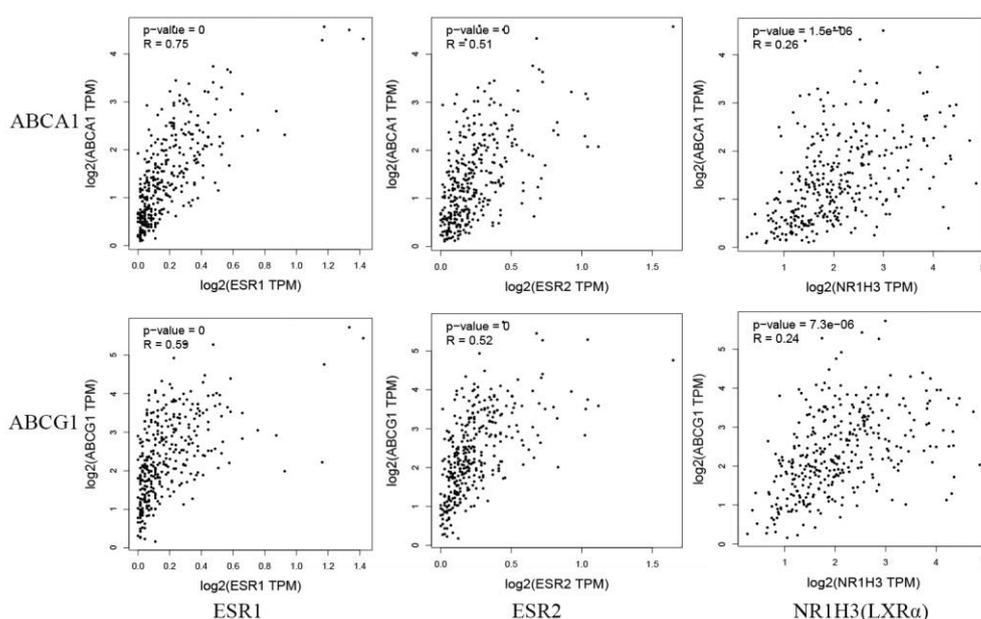


图 1-3 雌激素受体基因与胆固醇外流基因间相关性分析

Fig.1-3 Correlation between estrogen receptor gene and cholesterol efflux gene

表 1-4 雌激素受体基因与胆固醇外流基因间相关性分析

Table1-4 Correlation between estrogen receptor gene and cholesterol efflux gene

	ESR1(ER α)	ESR2(ER β)	NR1H3(LXR α)
ABCA1	R=0.75	R=0.51	R=0.26
ABCG1	R=0.59	R=0.52	R=0.24
<i>P</i>	0	0	<0.01

由 GEPIA 数据库分析的数据结果显示, ESR1 与 ABCA1 在 mRNA 水平具有良好的相关性, 为了验证 ESR1 与 ABCA1 在蛋白水平是否存在相互作用关系, 我们通

过 string 蛋白互作数据库 (<http://string-db.org>) 分析 ESR1 与 ABCA1 之间是否存在蛋白互作, 分析结果显示, ESR1 可以在核受体辅激活因子 1/2 (NCOA1/2) 作用下与 ABCA1 发生相互作用。见图 1-4。

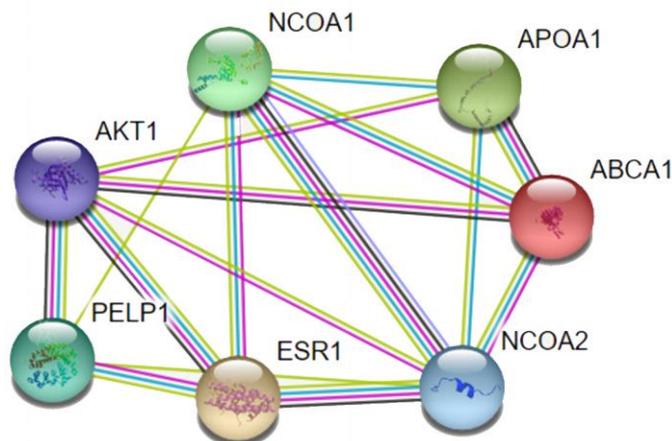


图 1-4 string 预测 ESR1 与 ABCA1 相互作用

Fig1-4 String prediction of interaction between ESR1 and ABCA1

2.4 血浆胆固醇外流能力检测

为了明确研究对象的外周血中血浆载脂蛋白在转运胆固醇能力上是否存在差异性, 我们选择年龄 ≤ 55 岁的年轻女性研究对象, 取血浆按前述方法制备去除 apoB 的血浆, 作为诱导胆固醇外流的诱导液。以 NBD 荧光标记的胆固醇作为检测的胆固醇, 检测 CHD 组和对照组间血浆介导的胆固醇外流率是否存在差异。经过 22-NBD-胆固醇孵育的 J774A.1 细胞内可见均匀分布的绿色 NBD 荧光 (图 A); 与 BSA 作为诱导液引流相比, 加入去除 apoB 的研究对象血浆明显增加了细胞胆固醇外流率的作用, 然而胆固醇外流率在年龄 ≤ 55 岁的 CHD 组与对照组间无差异 (图 B)。见图 1-5。

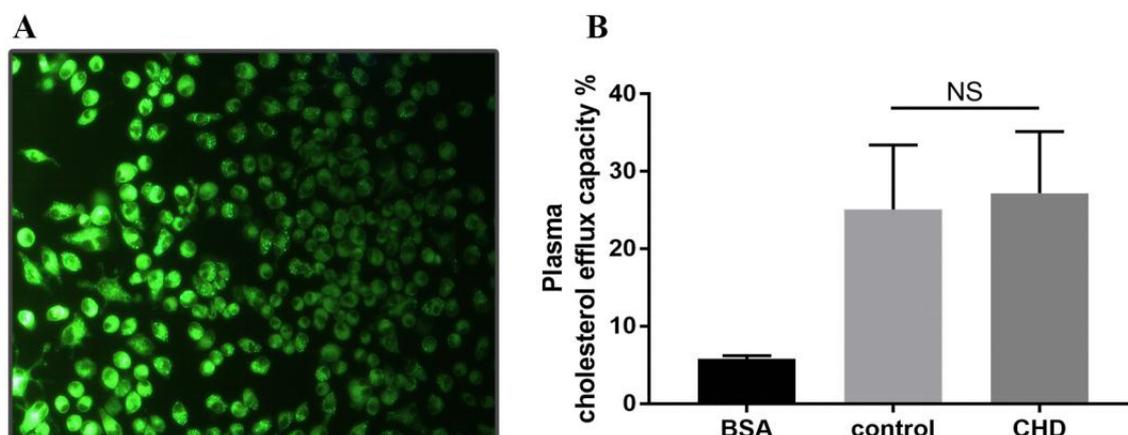


图 1-5 22-NBD-胆固醇标记的胆固醇外流率检测

Fig.1-5 22-NBD-cholesterol labelled cholesterol outflow rate detection

2.5 年轻女性冠心病的危险因素分析

将年龄≤55岁的女性作为研究对象，设置CHD为1的二分类的因变量，首先做纳入变量的单因素Logistic回归分析，将 $P < 0.05$ 的变量纳入多因素Logistic回归分析。在多因素Logistic回归分析中以纳入ABCA1 mRNA与否，分为模型1（不纳入ABCA1 mRNA）和模型2（纳入ABCA1 mRNA）。在单因素分析中可见除LDL-c、apoB外，其余各变量均与年轻女性CHD相关。在进行多因素分析前，进行变量间的共线性诊断，可见各变量均为容忍度 > 0.1 ，且方差膨胀因子（VIF） < 10 ，因此不考虑各变量间有共线性。在多因素分析显示，不纳入ABCA1 mRNA模型1中，高血压、糖尿病、TC是年轻女性CHD的独立危险因素，其中患有高血压的年轻女性患CHD的风险是非高血压年轻女性的2.11倍，患有糖尿病的年轻女性患CHD的风险是非糖尿病的年轻女性的3.91倍；TC每增加1个单位，其发生CHD的风险增加61%（95%CI=1.19-2.18）。纳入ABCA1 mRNA模型2中，年龄、BMI、TC是年轻女性CHD的危险因素，对于年轻女性年龄每增长1岁，患CHD的风险增加27%，BMI每增加1个单位，CHD的风险增加40%；TC每增加1个单位，患CHD的风险增加383%；apoA1是年轻女性CHD的保护因素（OR=0.002，95%CI=0-0.07）。见表1-5。

表 1-5 年龄≤55岁的年轻女性冠心病患者危险因素分析

Table1-5 Analysis on risk factors of CHD in young women aged ≤ 55

	单因素 Logistic			多因素 Logistic (Model 1)			多因素 Logistic (Model 2)		
	OR	P	95%CI	OR	P	95%CI	OR	P	95%CI
年龄	1.04	0.04	1.00-1.09	1.02	0.39	0.98-1.07	1.27	0.00	1.10-1.46
BMI[kg/m ²]	1.13	0.00	1.06-1.20	1.04	0.30	0.97-1.11	1.40	0.01	1.10-1.79
高血压[例]	2.64	0.00	1.69-4.15	2.11	0.00	1.27-3.53	0.35	0.19	0.07-1.71
糖尿病[例]	5.70	0.00	2.66-12.21	3.91	0.00	1.72-8.91	5.35	0.17	0.49-5.88
TG[mol/L]	1.39	0.01	1.09-1.78	1.03	0.85	0.78-1.35	0.83	0.59	0.42-1.64
TC[mol/L]	1.33	0.03	1.04-1.72	1.61	0.00	1.19-2.18	4.83	0.00	1.86-12.57
HDL-c[mol/L]	0.14	0.00	0.06-0.32	0.30	0.06	0.09-1.04	0.11	0.32	0.00-8.22
LDL-c[mol/L]	0.79	0.08	0.61-1.02	-	-	-	-	-	-
apoA-1[g/L]	0.09	0.00	0.03-0.27	0.24	0.08	0.05-1.20	0.00	0.01	0-0.07
apoB[g/L]	0.78	0.52	0.36-1.69	-	-	-	-	-	-
ABCA1mRNA	0.42	0.00	0.24-0.75	-	-	-	0.37	0.08	0.12-1.14

3 讨论

心血管疾病 (Cardiovascular disease, CVD) 目前仍然是世界范围内女性患病和死亡的主要疾病, 据统计, 有三分之一的女性死于 CVD, 45% 的 20 岁以上女性患有某种形式的 CVD^[77]。在我国, 女性 CVD 导致的死亡率在 2004 年-2010 年间以每年 1.56% 的上升速率增长, 且占总死亡构成比大于男性^[78]。2011 年美国心脏病学会 (ACC) / 美国心脏协会 (AHA) 首次针对女性 CVD 推出预防指南^[79], 但至今尚未再次更新。同一年中国女性心血管疾病预防专家共识组也首次发布了“中国女性心血管疾病预防专家共识”, 并且于 2017 年联合中国医师协会以及中华医学会再次更新^[80, 81]。说明 CVD 的女性特征越来越受到重视, 通过关注女性性别特异性心血管表现, 可以优化女性的心血管健康管理^[82]。因此, 对女性 CVD 风险的研究是为性别优化的心血管健康管理提供可靠理论依据的基础。

早发冠心病 (Premature coronary heart disease, PCHD) 是指发病年龄男性 ≤ 55 岁, 女性 ≤ 65 岁的冠心病患者^[83]。年轻女性的冠心病特征更具有性激素作用下的特点, 因此本研究中主要针对年轻女性为研究对象。更年期与 CVD 之间的相互关系是复杂的, 更年期增加了 CVD 的风险, 这是因为对雌激素戒断的生理反应, 包括体内脂肪分布的改变、糖耐量降低、血脂异常、血压升高、交感神经张力增加、内皮功能障碍和血管炎症^[84]。女性自然绝经的平均年龄为 51 岁^[85], 因此本研究中以年龄为 55 岁作为分界点, 比较了不同年龄段女性的临床基线资料; 并针对年龄 ≤ 55 岁的女性 CHD 危险因素进行分析。

3.1 高血压、糖尿病对年轻女性冠心病的影响

在本研究中, 不同年龄范围内女性 CHD 患者中高血压、糖尿病的患病率均高于对照组。在针对年龄 ≤ 55 岁的女性 CHD 多因素分析显示, 年轻女性高血压患者发展为 CHD 的风险是非高血压的 2.11 倍; 年轻女性糖尿病发展为 CHD 的风险是同年龄层非糖尿病的 3.91 倍。说明即使是在年轻女性人群中, 高血压和糖尿病仍然是 CVD 风险的主要因素。既往对年轻女性的心血管风险的认知存在一定的偏见, 在一系列基于性别差异的心血管疾病风险研究结果显示, 在各种年龄段的女性, 都不能低估其心血管疾病风险, 尤其存在高血压、糖尿病疾病因素的基础上, 女性可能面临着更严重的心血管风险以及不良预后。

3.1.1 高血压与年轻女性冠心病

数据表明, 女性比男性多面临更多额外的高血压风险, 尤其是在年轻人群中。首先, 不良妊娠结局将来会发生 CVD 风险增加了 1.8-4.0 倍, 严重或超过 1 次不良妊娠结局的女性 CVD 风险更高^[86-88]。因此, 美国妇产科学院建议患有不良妊娠结局和/或 CVD 危险因素的女性在产后 3 个月内进行 CVD 风险筛查^[89]。其次, 除了妊娠

直接对女性 CVD 风险的影响,妊娠相关高血压也会对女性远期高血压患病风险产生直接的作用。英国 Biobank 队列的 2019 年研究发现,怀孕期间的高血压与冠脉疾病的风险增加相关(HR: 1.8; 95%CI: 1.3 至 2.6)^[37]。对 348 万余名女性进行荟萃分析结果显示,先兆子痫的女性在以后 10-15 年患高血压的风险是未患病女性的 3.7 倍,患缺血性心脏病的风险是 2.2 倍^[87]。此外,在分娩后的第 1 年,所有妊娠相关高血压都会增加患慢性高血压的风险,分娩后 3 年内与 CVD 相关的住院风险增加两倍^[90-92]。先兆子痫在 2018 年胆固醇指南^[93]和 2019 年 ACC/AHA 发布的 CVD 一级预防指南^[94]中被列为“风险增强剂”。最后,对 1626158 名 15-49 岁的无妊娠的女性随访 15 年研究表明,女性口服含雌二醇的激素类避孕药与血栓性心肌梗死风险增加有关^[95]。这些研究结果均提示女性额外的 CVD 风险,然而在临床中,医生似乎放大了女性(尤其是年轻女性)的血管优势,忽略了以上因素对年轻女性潜在 CVD 风险的作用,并且表现出过度重视男性性别作为 CVD 的危险因素的作用。

与既往研究相同,本研究数据显示,CHD 组中高血压的比例大于对照组。在对照组中高血压的比例是 36.2%,与我国成年居民高血压检出率相似(39.1%,加权后检出率为 41.3%)^[96];而在 CHD 组中高血压的比例明显高于全国平均水平(年龄≤55 岁为 60%,年龄>55 岁为 69.5)。这可能是因为,一方面高血压作为 CHD 的危险因素,在 CHD 人群中高血压合并率远高于非 CHD 人群;另一方面高血压的发病率是随着年龄增加而升高,因此在不同人群中,高血压的检出率存在差异是可以理解的,本研究中以住院患者为研究对象,高血压的检出率是高于一般人群的。在多因素分析的模型 1 中,年龄≤55 岁的女性高血压患者发展为 CHD 的风险是非高血压的 2.37 倍。既往研究认为绝经前女性群体的高血压患病率往往低于同龄男性,在绝经后女性中高血压变得更加普遍^[77]。然而最新一项研究与女性重要的血管疾病进程落后男性 10 至 20 年这一观念相反,针对性别的分析表明,从生命的早期开始,女性的血压进展实际上比男性进展得更快,这一趋势一直持续到整个生命周期,这种早发的性别差异可能为晚年发生的心血管疾病奠定了基础^[97]。

研究报道称,女性即使处于高血压前期,即收缩压在 120-139 mm Hg 或舒张压在 80-89 mm Hg,其发生心肌梗塞等心血管死亡风险也高于高血压正常的女性^[98,99]。这表明女性对血压升高后血管内膜损伤更为敏感。还有研究表明,绝经后女性很可能会经历非浸润的夜间血压模式(夜间血压降低<10%),这就可以解释女性夜间观察到的心血管事件发生率高于男性的现象^[100,101],也强调了动态血压监测对女性血压评估的重要性及更多的获益。由于血压是衡量血管老化的一个简单易行的方法,也是未来心血管事件的一个重要预测因素,这些发现有助于解释女性与男性心血管疾病表现的一些差异,如舒张性心力衰竭等^[97,102]。这些区别于男性的女性高血压特点,都是临床医生在评估女性患者心血管风险时需要考虑的,否则容易出现低估风险的

可能。

3.1.2 糖尿病与年轻女性冠心病

美国有 2,600 多万人患有糖尿病, 其中 1,280 万为女性^[77]。本研究的结果表明, 对于年轻女性来说糖尿病仍是导致 CHD 的重要危险因素, 在不纳入 ABCA1 mRNA 的多因素分析模型 1 中可见, 患有糖尿病的年轻女性患者发展至 CHD 的风险是无糖尿病年轻女性的 3.91 倍。不区分性别的研究表明糖尿病使心肌梗塞或中风的风险增加了两倍^[103]。在我们的研究中, 对于年龄 ≤ 55 岁的女性, 糖尿病带来的 CHD 风险似乎更加显著。在存在 2 型糖尿病的情况下, 性别之间 CVD 的风险差异显著减小, 尽管没有完全消除^[104, 105]。最近对 500 多万名患者的系统回顾和荟萃分析发现, 糖尿病患者 CVD 死亡率的总相对风险中, 女性为 2.42, 男性为 1.86^[106]。社区 As 风险研究也有相似发现, 与男性相比, 糖尿病是女性心血管疾病和心血管疾病死亡率的更大危险因素^[107]。说明糖尿病在女性患者中的危害影响更大, 即使在绝经前女性存在心脏保护作用情况下, 随着糖尿病的存在女性心血管保护作用显著降低。2 型糖尿病的发病率在不同年龄阶段的性别差异是存在的, 女性在青年时期的发病率较高, 而男性在中年时期的发病率较高, 在老年阶段两者的发病率相似^[103]。鉴于心血管风险增加, 所有 DM 患者都需要积极评估 CVD 风险, 采取有效措施降低可能的危险因素。

相对于男性, 女性因妊娠获得额外心血管风险的原因不仅仅只包括妊娠期高血压。妊娠期糖尿病 (Gestational diabetes mellitus, GDM) 是出现在妊娠期间的一种葡萄糖不耐受性, 属于一种常见的妊娠并发症。既往患有 GDM 的女性将来患 CVD 的风险升高, 其中患 2 型糖尿病的风险增加 1.4-2.0 倍, 患高血压的风险增加 2 倍, 患中风的风险增加 2 倍, 患缺血性心脏病的风险增加 2.8 倍^[108]。即便是对于年龄 < 49 岁的年轻女性, GDM 带来的 CVD 风险仍然是存在的^[109]。另一项研究同样证明了这一观点, 同时还发现 GDM 的女性表现出较低的 HDL-c 水平以及较高的 TG 水平, 在这项研究的数据中, GDM 和低 HDL-c 水平之间的关联部分可以由 BMI 解释^[110]。肥胖是 GDM 以及 CVD 的共同危险因素, 三者间存在相互影响的作用关系。不论 GDM 是通过何途径影响女性 CVD 风险, 其带来的不良预后是确定的。因此美国心脏协会已提出 GDM 作为主要的心血管危险因素^[111]。已有研究证明对有 GDM 病史的女性进行早期的糖尿病预防干预措施可以减缓 As 的进展^[112], 这强调了糖尿病预防对于有 GDM 病史女性的重要性。女性特殊的心血管危险因素的影响是复杂的, 正确的认识和早期的预防干预是必要的。

3.2 年轻女性 CHD 患者脂代谢特点

我们的研究结果显示, BMI 在年龄 ≤ 55 岁的女性 CHD 组的最高, 且无论绝经与否; 年龄 ≤ 55 岁的女性 CHD 组年龄与对照组无差异, 但在区分绝经状态的统计中, 未绝经状态下 CHD 组年龄高于对照组。多因素分析的模型 2 中, BMI 每增加 1 个单

位, CHD 的风险升高 40%。快速识别超重或肥胖的最广泛使用的标准是 BMI, 由体重和身高决定。BMI 似乎是一个影响广泛的指标, 它同时是多种疾病的共同危险因素: 包括高血压、糖尿病、CHD, 此外 BMI 与血脂之间又存在相互关联性^[113]。因此, BMI 对 CHD 影响是多方面的, 但可以确定的是, BMI 与 CHD 风险之间存在正相关。研究表明, 与正常 BMI 组的成年人相比, 超重或肥胖的成年人中发生 CVD 事件的比例要高得多, 在调整所有年龄范围内的非 CVD 死亡相互竞争的风险后, 这些发现在所有年龄组中都是一致的^[114]。在一项大规模的基于人群的研究中发现, 与体重指数正常的患者相比, 无论是否接受药物治疗、冠脉支架或冠脉搭桥, 轻度和/或中度肥胖的 CHD 患者死亡率都有所下降。这些发现与之前的报告非常一致, 即肥胖与已确诊 CHD 患者的全因死亡率和心血管死亡率呈负相关。这一观察结果用“肥胖悖论”或“反向流行病学”来描述, 具体机制尚不清楚^[115]。这一观点在最新的一项 meta 分析中同样的到了证实, 体重过轻增加了急性冠脉综合症的死亡率, 以及 CVD 患者正规治疗干预后的死亡率^[116]。BMI 除了作为直接和间接的 CHD 危险因素, 其还与机体脂代谢存在密切的关系。研究发现 BMI 与 HDL-c 水平成反比^[117]。研究发现 BMI 与血清雌激素水平呈正相关, 可能原因是脂肪组织为雌激素合成的主要部位^[118, 119]。研究表明 BMI > 25 是年龄 ≤ 55 岁的女性 CHD 的危险因素^[120], BMI 作为导致 CHD 相关的疾病 (高血压、糖尿病、高血脂) 的危险因素, 以及 CHD 的直接危险因素, 其带来的危害是双倍的, 故对 BMI 的控制似乎也会收到双倍的健康获益。

在本研究中, 年龄 ≤ 55 岁的 CHD 组 TG 水平高于同年龄层的对照组, 不同绝经状态分组下, CHD 组 TG 水平均高于对照组, 然而在多因素分析中 TG 并没有表现出与 CHD 的独立危险关系。一项基于孟德尔随机化研究分析了 17 项研究的数据, 包括 62 199 名欧洲裔患者, 结果发现, TG 与 CHD 之间存在明确的因果关系^[121]。研究证实, 富含甘油三酯的脂蛋白 (triglyceride-rich lipoproteins, TRL) 及其残留物是 ASCVD 的重要贡献者。大的 TRL 颗粒 (例如新生的乳糜微粒) 无法穿透血管壁^[122], 但是富含胆固醇酯的较小 TRL (“残留物”) 通过渗透到血管壁以及促炎和血栓形成通路来促进 As 的形成。然而也有研究强调了 TRL 导致的 ASCVD 的风险中 ApoB 的浓度的重要性, 而不是 TG 水平, 同时降低 TG 的临床获益更多的与 ApoB 的水平相关^[123]。尽管 TRL 的循环水平预示着 ASCVD 风险增加, 并非所有 TG 颗粒都是致 As 的, 尚不清楚 TG 本身是否促成 As。与内膜泡沫细胞和 As 斑块中积累的胆固醇相反, TG 可以被大多数细胞降解。调整非 HDL-c (non-HDL-c) 或 ApoB 后, 流行病学研究中血浆 TG 与 ASCVD 风险的相关性减弱或消失。最近一项调查研究发现, 只要是载有 ApoB 颗粒的脂蛋白, 均有促进 ASCVD 风险的作用^[124]。

TG 作为脂肪组织的主要来源, 与肥胖密切相关。TG 与 HDL-c、BMI 之间复杂的关系, 在 CHD 的研究中显示出不一致的结果, 因此不能确定 TG 与 CHD 间是直

接相关，还是通过增加 CHD 的主要危险因素间接增加 CHD 的风险^[125, 126]。研究表明 TG 在女性人群中导致 CHD 的风险高于男性^[127]。此外，TG 升高经常与病理性 HDL 颗粒相关，可能会导致 ASCVD 风险^[128]。来自日本的一项针对糖尿病患者 CHD 风险的研究显示，对于男性糖尿病患者非 HDL-c 和 TC/HDL-c 是最佳预测因素，而对于女性糖尿病患者 TG 是最大的预测因素^[129]。说明 TG 在女性中具有特殊和更重要的意义，因为我们知道雌激素可以增加人血浆中 TG^[130]。

≤55 岁 CHD 组 HDL-c 低于其余三组，在年龄≤55 岁的人群中，HDL-c、apoA-1 在 CHD 组水平均低于同绝经状态下的对照组。虽然在不分性别的研究中已证实，HDL-c 是 CHD 的保护因素。然而在队列研究中发现，女性的 HDL-c 水平显著高于男性，且这种差异很大程度上解释了心血管疾病风险的性别差异性^[22, 71, 72]。近期研究发现 non-HDL-c 在 AS 的发生中发挥关键作用。Non-HDL-c 囊括了几乎所有致 As 的脂蛋白颗粒，具有不低于 LDL-c 预测 CHD 风险的价值^[131]。多项指南将 non-HDL-c 归入 CVD 的一、二级预防的首要指标^[93, 132, 133]。未绝经女性 non-HDL-c 水平低于同年龄段男性，然而绝经后 non-HDL-c 水平升高明显^[134]。根据既往研究结果，似乎女性在脂代谢上与男性存在较高差异性，这说明针对女性的抗 As 的血脂治疗指南是必要的。目前对于雌激素对血脂影响的作用方式尚不清楚，雌激素可以直接作用于靶细胞产生生物学功能，也可以通过 ER 发挥作用。研究发现 ESR 变异与脂质水平的变化有关，包括 HDL，LDL 和 TG^[135, 136]。但雌激素是否通过 ER 发挥生物学功能仍需要可靠的实验研究。

在本研究中多因素分析中，HDL-c 未显现出 CHD 的保护作用，但 apoA1 的保护作用在纳入 ABCA1 mRNA 中以微弱的作用显现。ApoA1 是一种贫酯的载脂蛋白，是 HDL 颗粒中的重要蛋白质组分，大部分由肝脏和小肠中合成。它在巨噬细胞胆固醇外流中接受由 ABCA1 转运出的胆固醇后形成 HDL 的前体形式，是参与胆固醇外流的重要载脂蛋白。我们的研究结果说明在年轻女性中血浆 apoA1 与 CHD 存在负相关，对年轻女性的 CHD 风险评估时血浆 apoA1 可能优于 HDL-c。有报道，女性多囊卵巢综合征（一种低雌激素状态）与 CEC 降低有关^[64]，相反的是，在绝经后妇女中 HRT 可有效地提高 CEC^[65]。这提示雌激素对 CEC 调控作用有可能是通过对调节血浆中 apoA1 和（或）HDL 颗粒实现的。结果的差异与研究群体的差异存在一定的相关性，但同时也说明雌激素在体内的作用方式和结果是多样的，探讨其不同的功能是必要的。

3.3 女性胆固醇代谢特点

有研究指出，脂肪肝和血脂异常的主要驱动因素是肝脏的脂肪流量，而不是胰岛素驱动的脂肪生成的源头^[137]。在相同脂肪生成的情况下，体内脂肪分解代谢的差异是导致个体血脂差异的主要原因。因此在对于脂肪代谢的调节是促进其排出的正

向途径，而不是抑制其生成。HDL 是主要的胆固醇转运蛋白，可以将外周 FC 转运至肝脏，胆固醇经肝脏代谢后以胆汁酸的形式排出体外，减少胆固醇对细胞及内环境的毒性作用^[138]。如 HDL 转运功能受损或成分改变，导致细胞内外 FC 积聚。FC 过饱和可造成胆固醇结晶，最终使细胞死亡和内膜损伤^[139]。此外，胆固醇结晶通过 NLRP3 炎症体引发局部炎症，并且导致白细胞介素-1 β (IL-1 β) 产生，最终从斑块内生长的胆固醇结晶和相关的炎症使斑块不稳定^[140]。由上可知，胆固醇不仅可以诱导 As 斑块形成，还可以导致斑块内部不稳定。故胆固醇的代谢研究是提供防治 CVD 重要理论依据的基础。HDL 参与的 RCT 是能逆转 As 病变的有效途径，因此，人们认为是 HDL 功能保护了 CVD，而不是 HDL-c 水平^[141]。有研究认为 HDL-c 和 CHD 存在负相关的根本原因在于 HDL 介导的巨噬细胞胆固醇外流能力 (CEC)，而不是 HDL 水平^[142, 143]，在颈动脉内膜厚度的研究中也得到了相同的结果^[144, 145]。HDL 转运功能受损和成分改变可导致细胞外 FC 的积聚，而细胞膜转运载体活性受损可导致细胞内 FC 的积聚，细胞内的 FC 饱和并具有细胞毒性，可导致胆固醇结晶，导致细胞死亡和内膜损伤^[140]。

影响 CEC 的因素一方面与细胞外接受胆固醇的 HDL 相关，另一方面与参与胆固醇从胞内向胞外转运的膜蛋白相关（即细胞胆固醇的释放能力）。针对以上两项影响 CEC 因素，本研究中检测了年龄 ≤ 55 岁的女性血浆介导巨噬细胞胆固醇外流率的差异，以及外周血中 ABCA1、ABCG1 mRNA 表达水平。同时为了探究体内雌激素与 CEC 是否存在关联，检测了研究对象的血浆雌二醇水平以及外周血中雌激素受体 α 的编码基因 ESR1 mRNA 的表达水平。结果可见，CHD 组 ABCA1、ESR1 mRNA 的表达水平低于对照组。同时基于在线生物数据库的基因相关性分析结果显示，ESR1 mRNA 与 ABCA1 mRNA 之间具有较强相关性，而两者在我们的 CHD 组中的表达均降低了，说明两者可能存在一定的相互关系，这一点在我们下一部分细胞实验中进一步研究。我们的实验结果中 CHD 组与对照组的血浆介导的巨噬细胞胆固醇外流率没有差异，这与一些其他实验结果不同。这考虑与选择的研究对象以及样本量的差异有关，此外，糖尿病对血浆的胆固醇外流率也产生一定的影响^[146]，这在我们的实验中没有区别分析。除了作为 CHD 的预测因素，CEC 还可以作为预测冠状动脉疾病患者全因和心血管死亡率的独立指标^[147]。这些研究重点都在于评估血浆的 HDL 功能，而忽视了循环中单核巨噬细胞释放胆固醇的能力。研究发现 ABCA1 基因多态性不仅可以影响血脂变异性和 CHD 风险，也可以改变血脂对 CHD 风险的影响^[148]。ABCA1 基因突变导致 Tangier 病和家族性 HDL 缺乏症的事实证明了 ABCA1 的重要性^[149]。我们的研究中，年轻女性 CHD 患者外周血中 ABCA1 mRNA 水平是降低的，且单因素分析中是 CHD 的危险因素。由于 ABCA1 与 HDL-c 之间相互关联，这可能是导致纳入 ABCA1 mRNA 的多因素模型 2 中 HDL-c 的保护作用消失，但 ApoA1 仍

显示出 CHD 的保护作用。

尽管当代降胆固醇治疗取得了进展，但与男性相比，女性接受指南推荐的他汀类药物治疗的可能性较低^[150]。最新的胆固醇管理指南和心血管疾病预防指南都强调了脂质管理对降低 ASVD 风险的重要性^[93, 94]。他汀类药物治疗的益处已被广泛接受，可减少心血管疾病事件，用于冠状动脉疾病的二级预防。然而，在女性初级预防中他汀类药物治疗的作用在过去十年间一直存在争议。这一争议部分源于缺乏关于他汀类药物在女性初级预防中的有效性的可靠数据，因为在随机对照试验中女性的代表性不足导致研究不足以按性别充分分析结果。此外，他汀类药物一级预防的早期荟萃分析产生了相互矛盾的数据，一些研究显示女性死亡率或心血管事件没有显著降低^[151]。至今为止，他汀类药物治疗的血液胆固醇管理没有性别特异性指南。根据 2016 年 ESC/EAS 指南，有 80% 的 ASCVD 事件发生在不符合预防性他汀类药物治疗的人群中^[152]。虽然在我们的研究中雌二醇水平并没有体现在组间差异上，但作为雌激素发挥功能的主要受体 ER α 在转录水平上表现出差异，这同样反应雌激素/ER 在女性 CHD 中发挥着调节作用。但对于雌激素/ER 信号轴是否作用于巨噬细胞胆固醇外流蛋白 ABCA1，着需要进一步的验证。似乎雌激素在 CHD 的保护上是多方面的，但在缺乏支持性干预研究的情况下，改变性激素水平以影响心血管病风险的最佳策略仍不确定^[153]。

新的证据表明，IHD 在男性和女性中的表现可能有所不同，从疾病的临床表现、诊断和治疗到心肌细胞功能和冠状循环的基本生物学和生物力学。与男性相比，女性的症状和共病负担更重，且预后更差^[48]。到目前为止，女性在改变指导方针的心脏病研究和试验中的代表性仍然不足，这在心血管医学的证据基础上造成了重要的限制。与男性相比，女性的心外膜冠状动脉较小，加上在整个生命周期内切变应力和炎症介质的差异，可能使易感患者的 CHD 发展为弥漫型，冠状动脉运动功能障碍的贡献大于男性^[154]。新的研究证实，有心肌缺血症状的女性比男性更容易出现非梗阻性 CHD 和冠状动脉微血管功能障碍。这代表了对冠状动脉系统性别差异的最新研究，着眼于不同的病理生理过程如 HDL-c 何可能导致在女性和男子中流行的 IHD，我们更需要了解 IHD 的病理生理学，而不是对梗阻性 CAD 的传统关注^[48]。总之，我们不能忽视性别在 CHD 中的病理生理差异，以及由此产生的在临床诊断和治疗过程中潜在的风险。

3.4 雌激素的冠状动脉保护机制

雌激素对心血管系统有正面和负面的双重影响。正面影响是，雌激素对脂质参数有潜在的有益影响，如降低 LDL-c 和增加 HDL-c，促进一氧化氮介制的血管化，抑制血管对损伤的反应和动脉粥样硬化的发展；负面的影响包括，雌激素增加甘油

三酯和炎症标记,如 C 反应蛋白(CRP),此外,雌激素也有许多血栓前效应的作用,如增加凝血酶原的循环水平和降低抗凝血酶III,导致静脉血栓事件的风险增加。重要的是,雌激素的许多这些影响是由对肝脏的先发效应来调解的,因此更多的是由 HRT 的口服而不是皮下管理引起的。例如,CRP 水平的增加似乎只发生在口服雌激素管理。这与心血管疾病风险增加的关联程度尚不确定。这些观察意见强调了管理模式对 HRT 对 CHD 风险的总体影响的潜在重要性^[155]。

随着我们对雌激素影响心血管系统的机制的了解增加,很明显,雌激素生物效应的复杂性反映了相当复杂的作用机制。雌激素可以调节各种系统性或循环性因素,包括脂质、炎症因素和凝血/纤溶级联的成员。此外,雌激素也可以通过雌激素受体(ER α 和 ER β)直接作用于心脏和血管,发挥多种调节作用。雌激素受体属于核受体超家族成员,是需要配体激活转录因子,可参与靶基因的转录调控,这种机制被称为基因组通路,也是雌激素发挥长期影响的主要方式,包括对脂代谢和凝血功能的影响;此外雌激素受体也能在接受雌激素信号的几分钟内发生快速效应,因其不依赖于基因表达的变化而被称为非基因组效应^[156]。心血管系统雌激素作用的这种非基因组效应研究得最好的例子是内皮细胞一氧化氮合成酶的活化,这种合成酶导致动脉血管发育,以响应雌激素的给药发挥作用。

研究证据表明,雌激素对血管的影响部分取决于 As 的病变程度。例如,雌激素受体表达在 As 动脉中明显减少,因此,如果对血管的直接、受体依赖性影响导致抗 As 作用的可能性,那么在患病动脉中这种效应就会减少或消失。此外,雌激素对给定通路的影响可能因底层血管的健康状况而产生不同的后果。例如,雌激素向上调节基质金属蛋白酶(MMP)家族的特定成员,在 As 动脉中,MMP-9 在 As 斑块的肩部表达,MMP-9 活性的增加可能与斑块破裂的风险增加以及急性冠状动脉综合征有关^[155]。在高胆固醇小鼠模型中,雌激素介导的环氧酶-2(COX-2)在延缓 As 方面起着重要作用^[157]。这表明,As 动脉与受损的 COX-2 反应也可能失去这种潜在的有益的激素治疗效果。

更年期后心血管事件的增加激发了人们对雌激素在心血管疾病中的作用的兴趣。最早的研究报告说,年龄匹配的绝经后妇女的心血管事件发生率是绝经前妇女的 2.6 倍;与同龄绝经前妇女相比,手术绝经相关的冠心病风险高 2.7 倍,与自然绝经妇女相比高 2.2 倍^[155]。这种过度的风险似乎可以通过 HRT 来预防。血浆脂蛋白被认为在绝经后冠心病风险增加中起作用,因为绝经后妇女的 TG、LDL-c 和 TG 水平均升高,而 HRT 似乎能对抗脂质的这些不利影响,尽管心脏保护性 HDL-c 增加也降低。这引起了人们对绝经后 HRT 潜在心血管益处的兴趣。但在实际中关于对 HRT 治疗的随机对照研究结果并没有显示出绝对的优势,甚至对 As 进展并没有影响^[158]。最近的研究还表明,ER 本身的遗传变异可以调节 HRT 的心血管效应,并改变 CHD

的潜在风险，这与增强的 HDL 效应有关^[159]。令人惊讶的是，ER 的这种相同的基因变异也与男性心肌梗死风险增加约 3 倍有关^[160]。总之，HRT 的争议尚未平息。目前的随机临床试验数据支持了美国心脏协会/美国心脏病学院的指导方针，即 HRT 不应该被规定用于预防心血管疾病。

3.4.1 雌激素对 As 炎症的影响

血管炎症是 As 发生和斑块形成的重要过程。在 As 病变早期参与炎症过程包括白细胞和单核细胞迁移到内皮下，内皮细胞表达粘附分子，如可溶性细胞间粘附分子-1 (sICAM) 以及选择素等介导白细胞粘附和迁移到动脉壁^[161]。循环粘附分子与 As 水平和心血管事件风险呈正相关。在一项横断面研究中，未接受激素治疗的绝经后妇女的循环炎症标志物明显高于同年龄和 BMI 的绝经前妇女；同样的，HRT 的绝经后女性的血管炎症总体减少^[162]。绝经后由于雌激素的急剧下降导致炎症标志物水平升高，但雌激素的抗炎作用只能在雌激素水平较高的情况下才能预期，比如外源性雌激素使用者，而不是在绝经后妇女的内源性生理水平上。雌二醇还通过抑制巨噬细胞和树突状细胞分泌 IL6 或 TNF- α 发挥抗炎特性，雌激素可能在靶向炎症中具有旁分泌作用，以减轻潜在的组织损伤效应。但目前研究中尚无雌激素对炎症反应作用是通过雌激素受体的转录调节，还是通过 GPER 的膜受体激活的直接作用。不论是何种方式，雌激素对血管内的炎症表现出明显的抑制作用，这很大程度上解释了年轻女性在血管保护上的优势，因为在 As 起始和进展的过程中炎症发挥了重要的作用。

3.4.2 雌激素对动脉内皮细胞的作用机制

内皮细胞凋亡是 As 斑块进展的另一个关键因素。雌二醇是内皮细胞的生存因子，在生理浓度下抑制内皮细胞凋亡，增强内皮细胞粘附、迁移、增殖和分化。雌激素呈现出剂量依赖性的抑制细胞因子诱导内皮细胞凋亡现象，随后的研究证实了这是通过抑制 ERK 磷酸化进而抑制内皮细胞凋亡的^[163]。雌二醇除了对内皮细胞的凋亡抑制作用，还可以刺激内皮细胞释放 NO，并通过对内皮细胞 NO 合成和释放的调节，影响 As。NO 对内皮细胞具有直接的抗氧化、抗凋亡和抗炎作用，不仅可以通过抑制白细胞粘附到内皮细胞，而且通过放松血管平滑肌细胞来拮抗 As 血管的改变。雌激素诱导内皮依赖性血管舒张的机制包括增强内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 基因的表达，以及内皮细胞内质网非基因组机制中 NO 释放或 eNOS 活性的急性升高。雌二醇治疗后 eNOS 和内皮 NO 释放的快速激活主要通过 PI3K-Akt 级联和 MAPK 激活介导^[164]。内皮细胞中的内质网介导的 NO 释放依赖于细胞内钙的动员。然而，雌二醇也可以诱导快速的 NO 产生，独立于钙动员刺激。有研究表明，氮硝酰化有助于 NO 诱导的抗炎作用。细胞内蛋白 S-亚硝酰化是一种翻译后修饰，通过抑制 NF- κ B 的激活而影

响多种内皮活性，包括抑制促炎症反应和凋亡，而 17β -雌二醇可以通过 $ER\alpha$ 和eNOS增加内皮细胞中的半胱氨酸S-硝基化^[165]。这可能是雌激素对内皮细胞炎症反应的抑制作用的方式之一。Notch信号通路是调控血管生成的重要途径之一，雌二醇已经被证明以一种增加内皮细胞中Notch-1和抑制Notch-2的方式影响几个Notch通路成分，从而揭示了E2在内质网介导的血管生成调节中的新作用^[166]。此外，雌二醇还可以通过端粒酶活性的增强以及雌激素介导的线粒体保护来延缓内皮细胞的衰老。

对As小鼠模型的研究表明，雌激素对ASCVD的保护作用更多的是通过 $ER\alpha$ 介导的。雌激素对apoE缺乏小鼠As病变进展的保护作用似乎是通过 $ER\alpha$ 发挥的，尽管雌激素介导的一些保护作用在雌激素 α 缺乏的雌性小鼠中仍然存在，但主要的雌激素受体在小鼠内皮细胞中表达。在另一项研究中，在缺乏内皮细胞 $ER\alpha$ 的As小鼠模型中，雌二醇的As保护作用被完全消除^[166]。有研究发现雌激素通过ERK抑制抑制大鼠内皮细胞凋亡的作用是 $ER\alpha$ 依赖的^[167]。另一方面，除了 $ER\alpha$ 外， $ER\beta$ 还被证明介导内皮细胞腔中的非基因组eNOS激活。 $ER\beta$ 是绝经前和绝经后妇女内皮细胞和血管平滑肌细胞以及所有冠状动脉壁层的主要ER亚型，在As斑块的进展和内膜钙化中起着重要作用^[168]。

综上所述，雌激素对女性的影响是多方面的，在体内的复杂环境中我们很难将其中的某一种作用放大或者忽视。但可以肯定的是，雌激素作为一种内分泌物质，对循环系统的作用存在且重要的，其对胆固醇代谢的直接作用，会影响As病变的发生和进展。

4 小结

4.1 年轻女性 CHD 表现出高 BMI、高血压和糖尿病合并率；以及高 TG，低 HDL-c，这在未绝经的年轻女性中更为明显。

4.2 在胆固醇外流相关指标中，年轻女性 CHD 患者中 ABCA1、ESR1 mRNA 表达低于对照组，ESR1 和 ABCA1 mRNA 具有良好的相关性；两组血浆介导的巨噬细胞胆固醇外流能力无差异。

4.3 不纳入 ABCA1 mRNA 模型 1 中，高血压、糖尿病、TC 是年轻女性 CHD 的独立危险因素。纳入 ABCA1 mRNA 模型 2 中，年龄、BMI、TC 是年轻女性 CHD 的独立危险因素，apoA1 是年轻女性 CHD 的保护因素。

第二部分 雌二醇通过雌激素受体 α 上调 ABCA1 促进巨噬细胞胆固醇外流

心脑血管疾病是造成全球死亡人数最多的疾病，并且预计到 2040 年仍为全球首位死亡病因^[3]。As 是心脑血管疾病的病理生理基础，其中巨噬细胞在 As 的起始、进展和破裂全过程中发挥关键作用^[169]。在 As 病变中，富含脂质的巨噬细胞转化为泡沫细胞，并形成动脉壁上 As 斑块的核心。胆固醇从巨噬细胞等细胞中流出至 HDL，由 HDL-c 的形式经循环到肝脏，在肝细胞中代谢为胆汁酸并由消化道排出，这被称为 RCT^[170]。RCT 能够有效的促进 As 斑块消退，延缓病变进展。由此可知，巨噬细胞特异性胆固醇外流作为 RCT 途径的关键起始限速步骤，提升巨噬细胞内胆固醇外流是抗 As 的关键^[171]。临床研究也证实了 HDL 介导的巨噬细胞 CEC 与冠状动脉疾病的存在和严重程度呈负相关^[142-144]。巨噬细胞 CEC 主要受两方面的影响：巨噬细胞释放胆固醇的能力和 HDL 作为细胞外胆固醇受体与胆固醇结合的能力^[73, 74]。

目前研究已明确，巨噬细胞释放胆固醇主要依赖其细胞膜蛋白上胆固醇转运蛋白 ABCA1、ABCG1^[172]。第一部分我们的实验中发现，在年轻女性冠心病患者中 ABCA1、ESR1 mRNA 表达低于对照组。此外，在外周循环中 ABCA1 与 ESR1 mRNA 表达存在较强的相关性。因此我们考虑，在循环单核巨噬细胞中雌激素是否通过雌激素受体参与 ABCA1 的表达调控。本研究通过体外细胞实验，明确雌激素对单核巨噬细胞胆固醇外流的影响以及可能的机制。

1 研究内容与方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验中细胞系及来源

实验选择小鼠单核巨噬细胞系 J774A.1，其来源于 BABL/cN 小鼠，为贴壁细胞，具有抗体依赖的吞噬作用。该细胞株已经被证明具有细胞膜蛋白 ABCA1、ABCG1 表达。细胞武汉普诺赛生物科技有限公司采购，由供货方提供细胞种属鉴定证明以及支原体检测阴性证明。

1.1.2 细胞培养

使用 DEME 高糖培养基配制 J774A.1 细胞的完全培养基，具体配置方案为：DEME 高糖培养基（BI, Beit-Haemek, 以色列），10%胎牛血清（FBS）（Gibco, Carlsbad, USA），1%青霉素-链霉素溶液（BI, Beit-Haemek, 以色列），0.5ug/ml

支原体去除剂 (Beyotime Biotechnology, 上海, 中国) 以预防支原体污染。细胞的培养环境为 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱。培养 36-48 小时后需要换液或传代处理, 具体根据细胞实际密度及状态而定。

1.1.3 细胞传代

因 J774A.1 细胞在胰酶的刺激下容易出现分化现象, 影响细胞状态, 故本实验中不使用胰酶进行消化, 采用一次性独立包装无菌细胞刮传代。在细胞密度为 80%-90% 时需要进行传代处理, 为达到良好的细胞状态传代前 12 小时换液。细胞传代比例为 1: 3 (按传代前后同等规格的培养容器计算)。

具体操作步骤如下: 在超净台内用巴氏管吸取培养皿/瓶内旧培养液, 然后加入 2ml 新鲜完全培养基, 用细胞刮单向有序的将细胞刮起, 确认贴壁细胞全部挂起后轻轻吹匀培养基, 将细胞悬液移入 15ml 离心管, 加入完全培养基至所需的最终总体积, 用巴氏管将细胞完全吹散后, 等体积分别移入三个培养皿/瓶中, 将培养皿/瓶以 8 字摇匀培养液, 在显微镜下确认细胞为单个无团块状态且均匀分布。确认后将培养皿/瓶再次置于细胞恒温培养箱内培养。

1.1.4 细胞冻存与复苏

在首次收到采购的细胞后首先进行细胞扩繁, 并分批次冻存细胞。细胞冻存液配制方案为: 55%基础培养 + 40%FBS + 5%DMSO, 每个冻存管终体积为 1.5ml, 细胞冻存液需提前至少 15 分钟配好后再操作细胞, 避免 DMSO 产热影响细胞, 细胞数量需保证在 1×10^6 /管以上, 为使细胞达到良好状态, 冻存前 24 小时可以给细胞换液处理。

详细冻存过程如下 (以 6cm 培养皿为例): 用细胞刮将细胞转移至 15ml 离心管中 (方法同上述细胞传代步骤), 以 1000rpm/min 离心 5min, 去除培养液, 将已配好的冻存液 1.5ml 加入细胞沉淀中, 用移液枪把细胞吹散至无黏附聚集后, 全部移至冻存管中。在冻存管表面写上细胞株名称、代数和冻存时间, 最后用封口膜封口。冻存管立即放入常温的细胞梯度降温盒内, 然后一起放入 -80℃ 冰箱过夜 (至少 8 小时), 隔日取出细胞冻存管, 并迅速放入液氮罐内的细胞盒中, 记录具体位置以便后期取用。

细胞复苏具体步骤如下: 提前准备细胞超净台及需使用物品, 水浴锅温度调至 37℃。将细胞从液氮罐中取出后, 迅速将细胞冻存管置入 37℃ 水浴锅中, 匀速晃动直至冻存液完全变为液态。用无菌纱布擦干冻存管后用 75% 酒精喷洒表面, 在超净台内将细胞冻存悬液全部加入含 5ml 基础培养基的 15ml 离心管, 轻柔混匀清洗细胞。以 1000rpm/min 离心 5min, 去除培养基, 在离心管中加入 4ml 完全培养基, 轻柔的吹匀至细胞悬液状态后, 接种至 25T 培养瓶中并摇匀, 显微镜下确认细胞均匀分布在培养瓶中后放入恒温培养箱内, 隔日换液。

1.2 内容与方法

1.2.1 雌二醇及氟维司群溶液配制

17 β -雌二醇购买于索莱宝（货号：E8140），分子式： $C_{18}H_{24}O_2$ ，分子量：272.38。氟维司群购买于 sigma（货号：V900926），分子式： $C_{32}H_{47}F_5O_3S$ ，分子量：606.77。使用电子天平称取试剂粉末，以 DMSO 为溶媒，保证培养皿中的 DMSO 终浓度在 0.1% 以下。配置浓度为 1M 的储存液在 -80℃ 冰箱保存，适量体积分装避免使用过程中反复冻融。根据溶液计算公式： $C=m/V$ 。储存液用 DMEM 基础培养基稀释至工作液浓度。

1.2.2 小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 胆固醇外流率的检测

1.2.2.1 细胞铺板及分组

将 J774A.1 以每孔 5×10^4 个细胞密度接种在 24 孔板中，并且培养基是不含酚红的 DMEM，添加有 0.2% 不含脂肪酸的 BSA。

1.2.2.2 22-NBD-胆固醇溶液配置

22-NBD-胆固醇购买于百灵威（货号：625332），分子式： $C_{28}H_{38}N_4O_4$ ，分子量：495，纯度 90%。使用无水乙醇为溶媒配置储存液，使用基础培养基稀释至工作液使用，保证培养皿中的乙醇终浓度在 0.1% 以下。由于 NBD 为荧光标记物，故在溶液配置、储存过程以及实验过程注意严格避光，避免荧光猝灭。

1.2.2.3 巨噬细胞胆固醇外流检测

根据实验设计首先按需要处理细胞 24 小时，下一步用含 5 μ M 的 22-NBD-胆固醇培养基更换培养基，共孵育 4 小时，然后用 PBS 洗涤细胞 3 次，最后加入含有 50 μ g/ml HDL（广州市奕元生物技术有限公司）或标准血清的新培养基孵育 4 小时。将上清液转移到新的 EP 管中后待用；向细胞板中添加 1% Triton（Triton X-100，solarbio）裂解细胞 10 分钟，将裂解液转移到另一个 EP 管中，然后以 10000rpm 离心上清液和裂解液 10 分钟，把上清液和裂解液各 100 μ l 分别加入黑色 96 孔板中。在荧光酶标仪中设置 469nm 作为激发波长和 537nm 作为发射波长来读取荧光（FI）。

$NBD \text{ 胆固醇外流率} = \frac{\text{上清液 FI}}{\text{上清液 FI} + \text{裂解液 FI}} \times 100\%$ 。

1.2.3 泡沫细胞诱导、油红 O 染色及定量分析

（1）将 1×10^5 细胞每孔接种在 6 孔板中过夜。处理后在处理因素存在条件下，使用不含 FBS 的培养基，加入 50 μ g/ml 氧化低密度脂蛋白（ox-LDL，广州市奕元生物技术有限公司）共孵育 24 小时。

（2）油红 O 工作液的配制：饱和油红 O 原液（索莱宝，G1260）按 3: 2（油红 O: 蒸馏水）加入蒸馏水，混匀，室温放置 5-10 分钟，滤器过滤后使用。

（3）先去除培养液，加适量 4% 多聚甲醛细胞组织固定液固定 30 分钟，蒸馏水充分洗涤。

(4) 加入 1ml 事先配制好的油红 O 工作液 10 分钟左右。

(5) 脱色：用 60% 的异丙醇漂洗染色好的细胞，以减少背景染料。蒸馏水充分洗涤。

(6) 加入 1ml 蒸馏水并用显微镜拍照。

去除蒸馏水，加入等量 100% 异丙醇，浸泡 30 分钟，适度震荡。结束后每个样本取 100ul 加入 96 孔板中，并使用酶标仪在 510nm 下测量吸光度，进行油红 O 进行定量评估。

1.2.4 基因表达检测

1.2.4.1 mRNA 水平表达检测

1.2.4.1.1 贴壁细胞总 RNA 抽提

(1) TRIzol 裂解：贴壁细胞弃培养液，将培养皿移到专用于提 RNA 的橱柜里，先加入 500 μ l 的 TRIzol，摇匀后室温裂解吹打，再加入 500 μ l 的 TRIzol 洗一洗，将细胞裂解液加入新的无酶 EP 管中，做好样本标记。

(2) 氯仿抽提：往每个 EP 管加入 200 μ l 氯仿，混合震荡 30s 至溶液乳化呈乳白色，静置 10 分钟并放入 4 $^{\circ}$ C 离心机中 12000rpm 离心 15 分钟，缓慢拿出离心管，上层透明液体为含 RNA 的溶液，在通风橱中用 200 μ l 枪吸出上层无色上清液，切勿触碰及吸出白色中间层，加入新的一批标记好的 EP 管中，每管大概 400-500 μ l 左右。

(3) 异丙醇沉淀：往每个 EP 管加入 600ul 异丙醇，上下颠倒 EP 管混合摇匀 30 秒，室温静置 10 分钟，放入 4 $^{\circ}$ C 离心机，以 12000rpm 离心 10 分钟，管侧面和底部出现白色沉淀，小心去除上清，轻轻加入用无酶水配好的 75% 乙醇 1ml，慢慢吹起，轻摇 15 秒，以 7500rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟，去除上清，避免碰到沉淀，再重复洗一遍。打开 EP 管盖子，先用 200 μ l 枪吸取，再用 10 μ l 枪吸取剩余的酒精，斜放晾干沉淀 10 分钟。用 20 μ l 无酶水溶解 EP 管内 RNA，然后放于冰上测浓度或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4.1.2 PCR

提取细胞总 RNA 后，后续的 RNA 浓度测定、反转 PCR、实时荧光定量 PCR 使用试剂盒及实验步骤同第一部分相关实验内容描述（见第一部分 1.2.3 PCR）。

下表列出了用于实时荧光定量 PCR 实验中使用的小鼠 ABCA1, ABCG1, ESR1, LXR α , GAPDH 的特异性引物序列。见表 2-1。

表 2-1 小鼠目标基因引物

Table 2-1 Mouse primers for target gene

Gene	Primer
ABCA1	Forward 5'-AGAAGGAGGCTCGGCTGAAGG-3'
	Reverse 5'-GAGGGATGAGGCTGCTAACAAACC-3'

Gene	Primer
ABCG1	Forward 5'-CATGCTGCTGCCTCACCTCAC-3'
	Reverse 5'-TCTCGTCTGCCTTCATCCTTCTCC-3'
ESR1 (ER α)	Forward 5'-GCCGCCTTCAGTGCCAACAG-3'
	Reverse 5'-GGCTCGTTCTCCAGGTAGTAGGG-3'
NR1H3 (LXR α)	Forward 5'-AACTGAAGCGGCAAGAGGAAC-3'
	Reverse 5'-TGGCAGGACTTGAGGAGGTGAG-3'
GAPDH	Forward 5'-TGGTGAAGCAGGCATCTGAG-3'
	Reverse 5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'

1.2.4.2 蛋白水平表达检测

1.2.4.2.1 蛋白质印迹(western blot)

1.2.4.2.1.1 细胞总蛋白提取

(1) 用 PBS 冲洗细胞 2-3 次。并完全去除干净 PBS，避免残留。

(2) 按一定比例加入新鲜配置且含有 1% 鸡尾酒蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液到培养皿中，使其充分接触反应数分钟。

(3) 用细胞刮把细胞及裂解液聚集到培养皿一侧，然后用 1ml 移液枪吸取转移至 1.5ml 离心管。

(4) 在冰上静置 30 分钟，可以间断吹打彻底混匀裂解液，使细胞充分裂解。

(5) 12000g 离心 10min，收集上清，即为总蛋白溶液。

1.2.4.2.1.2 蛋白浓度测定

BCA 法测蛋白浓度。

(1) BCA 工作液：计算好需要工作液的总体积，然后以 50: 1 的体积比完全混合 A 与 B 液，需新鲜配置。

(2) 配置浓度梯度的标准蛋白液：取 8 个新 1.5ml EP 管，标记 1-8 号，在 2-8 号每管均加入 50ul 的 PBS，然后在 1、2 号管中分别加入 50ul 的标准品，再将 2 号管内液体充分混匀后转移 50ul 至 3 号管，重复直至 7 号管，8 号管中不加任何含有标准品的液体。最终得到 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 共八个浓度的标准品，各取 40ul 加入新的 EP 管中待用。

(3) 再取蛋白样品数个新 EP 管，每管中均加入 36ul PBS，然后分别加入 4ul 的蛋白样品，做好标记，充分混匀。

(4) 向制备好的 8 个标准品以及稀释的蛋白样品的各个 EP 管中分别加入 200 μ l

第一步中配好的 BCA 工作液，充分混匀后，取各管体积 70ul/孔加入 96 孔板中（避免出现气泡），设置 3 个重复，将 96 孔板放入 37℃ 恒温箱中静置孵育 30 分钟后上机检测。

（5）设置检测波长为 562nm，96 孔板上酶标仪检测。

（6）以梯度浓度的标准品吸光度制作标准线，以拟合度 $R^2 > 0.99$ 为宜，得到线性方程，将蛋白样品 OD 值代入方程计算，得到的数值需要按蛋白样品的稀释度计算最终浓度。

1.2.4.2.1.3 SDS-PAGE 电泳

（1）清洗玻璃板（提前完成）：使用洗洁精清洗制胶玻璃板后，随后用蒸馏水冲洗干净并烘干待用。

（2）灌胶与上样：将玻璃板的前板和后板贴合对齐，并用玻璃板架固定好。将带有固定好玻璃板的架子垂直卡在制胶架上。根据制胶盒的说明书配胶，具体见下表。配胶过程中，每次加完新试剂后均充分混匀后再加下一个试剂，最后加入 TEMED 后迅速混匀灌胶。灌胶的枪头需紧贴着玻璃板打出，灌胶体积以胶面达绿线下方为宜。灌胶结束后需加入无水乙醇填满剩余体积，消除胶面气泡的同时使胶面水平。30 分钟左右可轻晃制胶架，胶面保持固定时表明分离胶已凝固，需完全去除乙醇并晾干。开始配制浓缩胶，方法同上。浓缩胶管好后立即插入梳子，注意出现气泡。梳子表面的突起处与前板玻璃缘完全吻合，必要时可以在两侧补浓缩胶。确定浓缩胶凝固后将玻璃板从制胶架子上取下，放入电泳固定架上，玻璃前板向内，后板向外固定好后放入电泳槽内，向两玻璃板间的空间内倒满电泳液即可，然后平行向上拔出梳子，准备上样。PAGE 胶溶液配制方案见表 2-2。

表 2-2 PAGE 胶配置方案

Table2-2 The components of PAGE gel

试剂	10%分离胶	5%浓缩胶
H ₂ O (ml)	5.9	4
30%丙烯酰胺 (29: 1) (ml)	5	1
1.5M TRIS-HCl (PH 8.8) (ml)	3.8	0
1.5M TRIS-HCl (PH 6.8) (ml)	0	1
10%SDS (ml)	0.15	80
AP (ml)	0.15	60
TEMED (ul)	7.5ul	8ul
总体积 (ml)	15ml	10ml

根据前期测好的蛋白原液浓度，用 RIPA、4×蛋白上样缓冲液将所有的蛋白样品均调整至终浓度为 3g/ul，并保证蛋白上样缓冲液终浓度为 1×。充分混匀后将装有样品的 EP 管在 70℃金属浴煮 15 分钟，使蛋白充分变性。上样前瞬离样品，然后放于冰上准备加样。以上样蛋白终质量为 60g，即 20ul 样品，按计划顺序上样，枪头一用一换，空置的孔槽内加入等体积的 1×蛋白上样缓冲液。上样结束后在电泳槽内加入足够的电泳液，盖上盖子准备电泳。

(3) 电泳：设置电泳程序为 80V 恒压 30 分钟（浓缩胶内），结束后以 110V 恒压电泳 1 小时 30 分钟，以溴酚兰线处于分离胶的下缘结束电泳。

(4) 转膜：将电泳好的凝胶轻轻撬去前板，将浓缩胶部分切除，分离胶部分放置在玻璃后板上浸泡在转膜液中；裁好 2 张 7.5×8.5cm 的 PVDF 膜，首先在甲醇中浸泡 2 分钟，然后在蒸馏水中浸泡 15 秒，最后放入转膜液中浸泡待用（操作全程戴手套并且避免直接接触 PVDF 膜）。用两张 10×10cm 海绵、2 张 7.0×8.0cm 的滤纸和 1 张 PVDF 膜，1 块电泳好的 SDS-PAGE 胶制作对称的“三明治”，用转膜夹夹紧。制作过程中用瓷盘中倒入适量的转膜液，将滤纸和海绵打湿，将夹子黑面置于底层，其上按顺序放置海绵、滤纸、PAGE 胶、PVDF 膜、滤纸、海绵，避免 PVDF 膜与凝胶间出现气泡，全程在转膜液中。制作好后将两个转膜夹一起放入转膜槽内，注意两个夹子均为黑面对槽的黑面，转膜槽中空的部分可以加入冰袋。设置转膜程序以 300mA 恒流转膜 2 小时 30 分钟。转完后将膜用 PBST 漂洗 3 次后进行封闭。

1.2.4.2.1.4 免疫反应与化学发光和成像

用镊子夹起 PVDF 膜一角放入用 TBST 配制 5%牛奶封闭液中，室温下低速摇床封闭 1 小时 30 分钟，结束后用 PBST 洗膜 3 次。取目的分子的一抗，在 15ml 离心管中用抗体稀释液配制目标浓度的一抗工作液；从 PBST 中夹起膜，用滤纸吸干后，放到有一抗工作液的离心管内贴壁固定，将离心管固定在旋转架上，4℃孵育过夜（旋转架速度调到最慢档）。孵育至少 12 小时后用 PBST 洗膜 3 次，然后用配制好浓度的辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗室温孵育 PVDF 膜 1-2 小时，最后再次用 PBST 洗膜 3 次。

抗 ABCA1 单克隆抗体（1：800 稀释，abcam，美国）；

抗 ABCG1 单克隆抗体（1：2000 稀释，abcam，美国）

抗 LXR α 单克隆抗体（1：1000 稀释，abcam，美国）；

抗 ER α 单克隆抗体（1：1000 稀释，abcam，美国）；

抗 GAPDH 多克隆抗体（1：5000 稀释，CST，英国剑桥）；

HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗（1：5000 稀释，BIOSS，北京，中国）；

HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗（1：5000 稀释，BIOSS，北京，中国）；

ECL 化学发光反应：使用 Affinity ECL kit，货号 KF001，A、B 两种溶液各 0.5ml

在孵育盒中混匀，用镊子夹起膜蛋白面朝下与显色液充分接触，然后将膜放进 BIO-RAD 凝胶成像仪内进行成像，在 Image lab 软件中处理图像。

1.2.4.2.1.5 相关溶液的配制

TBST: TBS (10×) 100mL+纯水 900mL+Tween20 5mL。

PBST: PBS (10×) 100mL+纯水 900mL+Tween20 5mL。

Running buffer: 14.4g Glycine+3.02g Tris+1g SDS+纯水定容至 1L。

Transfer buffer: 14.4g Glycine+3.02g Tris+0.1g SDS+200ml 甲醇+纯水定容至 1L。

1.2.4.2.2 流式细胞术检测膜蛋白

(1) 收集和固定细胞: 去除培养液，用预冷的 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次，加入 1ml PBS 并用细胞刮刮起细胞至培养皿的一侧，收集细胞于新的 EP 管中重悬细胞，做好标记。800rpm 离心 5 分钟，去除上清，加入 100ul 甲醇固定细胞 5 分钟。

(2) 增加细胞通透性及封闭: 800rpm 离心 5 分钟去除上清，加入 1ml 0.1%Tween20 渗透 20 分钟，然后再离心去除上清。加入 100ul 10%的山羊血清并重悬细胞静置 15 分钟，为了避免非特异性相互作用。

(3) 抗体免疫反应: 800rpm 离心 5 分钟后弃上清留细胞沉淀，加入 100ul PBS 重悬细胞，加入 2ul ABCA1 抗体充分混匀，室温下孵育 30 分钟。期间轻弹 EP 管 1-2 次，以保证抗体与细胞的充分接触。800rpm 离心 5 分钟，去除上清，加 1 mL PBS 洗涤三次，最后将细胞重悬于 0.1mL PBS 中。将荧光二抗山羊抗小鼠 IgG/PE 抗体 (bs-0296G-PE, BIOSS) 按照 1: 100 比例加入细胞悬液中充分混匀，室温避光孵育 30 分钟。800rpm 离心 5 分钟，去除上清，加 1mL PBS 洗涤三次，加入 400ul PBS 重悬细胞。

(4) 上机检测分析: 将细胞用滤网过滤成单个细胞后加入流式管中，在 EPICS XL 流式细胞仪上分析，收集了 10000 个事件。数据分析处理使用 Flow Jo 软件操作。

1.2.5 小干扰 RNA 转染

本实验所需的小干扰 RNA (siRNA) 分子的设计和合成均来自上海 Sangon，每个基因设计并合成三条 siRNA 序列，包括 si-ESR1，si-LXR α 和 si-vector，在 mRNA 水平分别检测三条 siRNA 的转染效率，最终选择转染效率最佳的序列开展后续实验。siRNA 转染使用 RFect siRNA/miRNA 转染试剂 (常州生物百代生物技术有限公司)。对于细胞 siRNA 转染，根据转染试剂说明书建议浓度，用带有荧光标记的 siRNA 进行转染条件评估，选择最佳转染浓度、转染时间以及转染试剂的比例进行后期实验。最终选择转染终浓度为 30nM 的 siRNA，与 RFect 比例关系为: siRNA 质量 (pmol) /RFect 体积 (ul) =1: 3，转染后 48 小时收获。阴性对照选择 Mock 对照，即加用同体积的 RFect 转染试剂，而不加用任何 siRNA 序列。表 2-3 列出了我们研究中使用的 siRNA 序列。

1.2.5.1 SiRNA 工作液的配置

SiRNA 以冻干粉形式储存，使用前瞬时离心 1 分钟，用一定体积的无菌 RNase-free-H₂O 溶解冻干粉，配置成 20 μ M 的储存液，溶解后再次瞬离数秒钟，用无菌的 RNase-free EP 管分装，-20 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融。操作过程在超净台内无菌处理，过程中使用的 EP 管、枪头均为 RNase-free 产品。

表 2-3 小鼠目标基因 siRNA 序列

Table 2-3 siRNA sequence for mouse target gene

Gene	siRNA sequence
ESR1 (ER α)	sense 5'-GAAGGCUGCAAGGCUUUCUUUTT-3'
	antisense 5'-AAAGAAAGCCUUGCAGCCUUCTT-3'
NR1H3 (LXR α)	sense 5'-GAAACUGAAGCGGCAAGAAGATT-3'
	antisense 5'-UCUUCUUGCCGCUUCAGUUUCTT-3'

1.2.5.2 转染 siRNA 实验的具体步骤为（以 6 孔板为例）

(1) 细胞铺板：转染前一天使用 6 孔板进行细胞铺板，2500 μ l/孔的培养基 (DEME+FBS，不含任何抗生素)，使细胞在转染时密度在 30-50%。

(2) siRNA-RFectPM 混合物准备：

- 在无酶无菌 EP 管中用 250 μ l 无血清 DEME 培养基稀释 3 μ mol siRNA。
- 在无酶无菌 EP 管中用 250 μ l 无血清 DEME 培养基稀释 15 μ l RFect。
- 充分混匀并在室温下共孵育 5min。注意：保证在 25min 内执行下一步操作，延迟会影响转染效率。

(3) 孵育 5min 后，充分混合 siRNA 稀释液和 RFect 稀释液，室温孵育 20min。

(4) 将 500 μ l 混合物按实验分组分别加到对应的孔板中，轻轻晃动培养板，混匀后继续细胞培养箱内培养。

(5) 根据细胞状态 8 小时后选择性换液，待 36-48 小时后收获细胞，进行下一步实验。

1.2.6 实验仪器及主要试剂

1.2.6.1 实验试剂及试剂盒

(1) 细胞培养试剂及耗材：DMEM 高糖基础培养基 (BI，以色列，06-1055-57-1ACS)；PBS (BI，以色列，02-024-1ACS)；胎牛血清 (Gibco，美国，16000-044)；青霉素/链霉素双抗 (BI，以色列，03-031-1B)；支原体清除试剂 (碧云天，中国，C0288S)；DMSO (sigma，美国，D2650)；一次性无菌细胞刮 (NEST，中国)。

(2) 试剂: 17 β -雌二醇 (Solarbio, 货号: E8140); 氟维司群 (sigma, 货号: V900926); 22-NBD-胆固醇 (百灵威, 中国, 货号: 625332); Triton X-100 (Solarbio, 货号: T8200); 4 \times 蛋白上样缓冲液 (含巯基还原剂) (Solarbio, 货号: P1016); 人 HDL (广州奕元, 货号: YB-003) x-LDL (广州奕元, 货号: YB-002); 饱和油红 O 原液 (索莱宝, G1260); RIPA 裂解缓冲液 (Thermo, 美国, 货号: 89900); 抗 ABCA1 单克隆抗体 (Abcam, 美国, 货号: ab18180); 抗 ABCG1 单克隆抗体 (abcam, 美国, 货号: ab52617); 抗 LXR α 单克隆抗体 (abcam, 美国, 货号: ab176323); 抗 ER α 单克隆抗体 (abcam, 美国, 货号: 32063); 抗 GAPDH 单克隆抗体 (CST, 英国剑桥, 货号: 5174S); HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (BIOSS, 中国, 货号: bs-40295G-HRP); HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗 (BIOSS, 中国, 货号: bs-40296G-HRP); Goat Anti-Mouse IgG/PE antibody (BIOSS, 中国, 货号: bs-0296G-PE); Rfect siRNA/miRNA 转染试剂 (常州百代, 中国, 货号: 11012);

(3) 试剂盒: Invitrogen TRIzol RNA 分离试剂 (Thermo, 美国, 货号: 15596026); 反转录试剂盒 (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo, 美国, 货号: K1622); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (QuantiNovaTM SYBR[®] Green PCR kit, QIAGEN, 德国, 货号: 208054); BCA 蛋白定量分析试剂盒 (Thermo, 美国, 货号: 23246); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Solarbio, 货号: P1200); ECL kit (Affinity, 美国, 货号 KF001)。

1.2.6.2 实验仪器

垂直板电泳转移装置 (Bio-Rad, 美国); Trans-Blot 转膜装置 (Bio-Rad, 美国); 电泳仪 (Bio-Rad, 美国); 多功能酶标仪 (Thermo Fisher, 美国); 除热原超纯水系统 (Millipore, 美国); 低温高速离心机 (Sigma, 美国); 电子秤 (YB202N, 上海怡台); 细胞培养箱 (Thermo, 美国); 恒温水浴锅 (OLABO, 中国); 荧光酶标仪 (TECAN, 瑞士); -80 $^{\circ}$ C 冰箱 (Thermo, 美国); 流式细胞仪 (BD, 美国)。

1.3 质量控制

由专业可靠的细胞出售端购买细胞, 购买的细胞经由专业机构进行细胞系的鉴定并提供鉴定报告。在细胞培养过程中是在专门的细胞培养实验室, 并配有用于细胞培养过程中专用的培养箱、离心机、水浴锅、显微镜、电子称量天枰。每日检查细胞培养箱运转是否正常, 温度与湿度是否在要求范围内。对细胞培养实验室内的所有仪器, 使用前首先确认仪器状态, 并填写专门配备的仪器使用记录本。参与细胞培养操作的人员均为临床医学或生物科学相关人员, 并经过实验室研究员的针对性培训, 受实验室研究员的监督和管理。细胞实验过程中使用的离心管、试剂、培养瓶等均为双标识。所有用于细胞实验的试剂及耗材均具有国家规定的体外诊断或者体内应用的药械准字批文。每次细胞冻存或复苏时严格比对信息并做好代数、

日期等标记。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS 23.0 软件进行分析, 统计图使用 GraphPad Prism7 制作。满足正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{X}\pm S$) 表示, 如满足参数检验条件的 2 组间统计采用 t 检验, 大于 2 组统计方法采用方差分析; 若不满足则采用非参数检验 (2 组间比较采用 Mann-Whitney 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验), 多于 2 组的两两相互比较采用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌二醇对 J774A.1 细胞的胆固醇外流的影响

为了观察雌激素对小鼠巨噬细胞系 J774A.1 胆固醇流出的影响, 我们使用 22-NBD-胆固醇 (绿色荧光) 检测 J774A.1 细胞内胆固醇的外流率。将 J774A.1 细胞在有或无氟维司群 (非选择性雌二醇受体拮抗剂) 的情况下, 用雌二醇处理 24 小时, 然后在处理条件存在的情况下由 HDL 或去除 ApoB 的标准血清诱导胆固醇外流。无论是 HDL 还是处理后的标准血清作为胆固醇外流诱导液, 雌二醇处理组的胆固醇外流率均高于对照组。为了确认雌二醇是否通过雌激素受体起作用, 我们用氟维司群对细胞进行预处理 1 小时, 然后与雌二醇一起孵育 24 小时, 结果可见雌二醇+氟维司群组逆转了雌二醇促进胆固醇外流的作用, 并且低于对照组的胆固醇外流率。这表明雌二醇对巨噬细胞胆固醇外流的影响是通过雌激素受体实现的。见图 2-1。

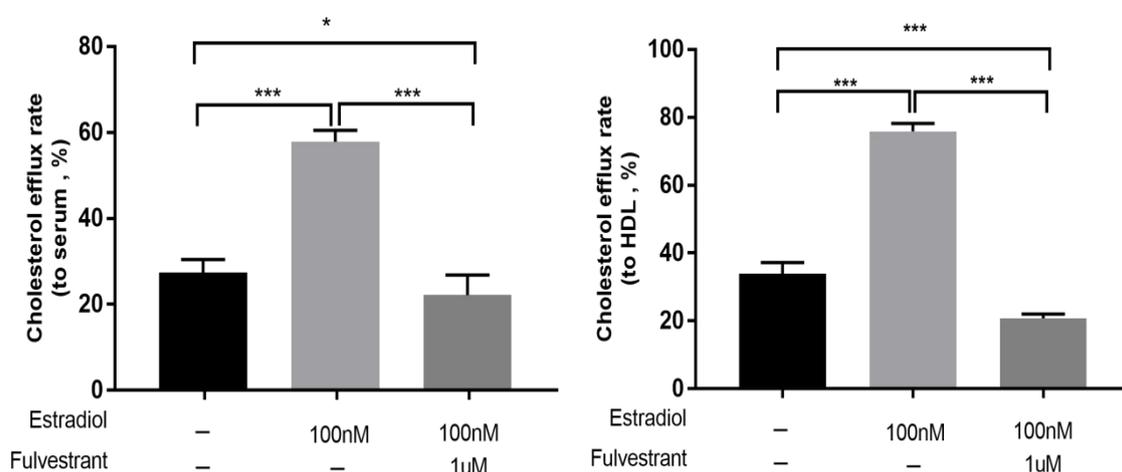


图 2-1 雌二醇对 J774A.1 细胞胆固醇外流率的影响

Fig.2-1 Effect of estradiol on cholesterol efflux rate of J774A.1 cells

2.2 雌二醇对 J774A.1 细胞内脂滴含量的影响

根据不同的处理条件，将细胞同样分为对照组，雌二醇组，雌二醇+氟维司群组，我们使用 50ug/ml ox-LDL 诱导 J774A.1 细胞转化为泡沫细胞，并定量分析了细胞内脂滴含量。结果表明，雌二醇处理组的细胞（A）内脂质滴含量明显低于雌二醇+氟维司群组（B）。定量分析结果同显微镜观察结果，雌二醇处理组巨噬细胞内脂滴含量低于对照组，雌二醇+氟维司群组处理组的细胞内脂滴含量高于对照组和单独雌二醇组。见图 2-2。

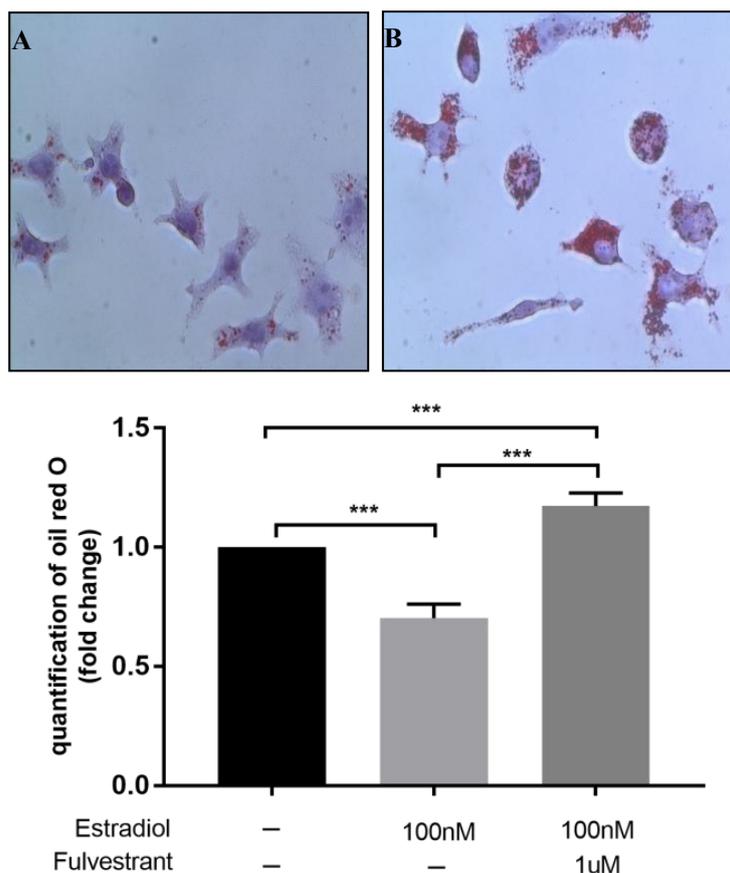


图 2-2 J774A.1 细胞诱导的泡沫细胞内脂滴形成

A: 雌二醇处理组, B: 为经氟维司群预处理 1 小时后于雌二醇共孵育组

Fig.2-2 The formation of lipid droplets in J774A.1 cells-driven-foam cells

A: Estradiol treatment group, B: Estradiol co-incubation group after pretreatment with Fulvestrant for 1 hour

2.3 雌二醇对 ABCA1、ABCG1 表达的影响

为了验证雌二醇是否通过调节 ABCA1 和（或）ABCG1 的表达水平，实现促进巨噬细胞胆固醇外流的作用，对 J774A.1 细胞进行了不同浓度雌二醇处理，并使用 rt-qPCR 检测了 ABCA1、ABCG1 mRNA 水平的变化。我们注意到，在雌二醇处理的细胞中，ABCA1 和 ABCG1 mRNA 的表达均被雌二醇上调，其中 ABCA1 在浓度为

100nM 和 1000nM 雌二醇处理组的上调倍数相对于对照组有统计学差异；三个不同雌二醇处理组与同时加用氟维司群组相比，ABCA1 mRNA 在氟维司群组明显下调，差异均有统计学意义。与 ABCA1 变化不完全相同，ABCG1 mRNA 在三个浓度雌二醇处理组的变化与对照组相比无统计学差异；然而，在雌激素处理组与同浓度下加用氟维司群组相比，ABCG1 mRNA 在氟维司群组明显下调，差异均有统计学意义。见图 2-3。

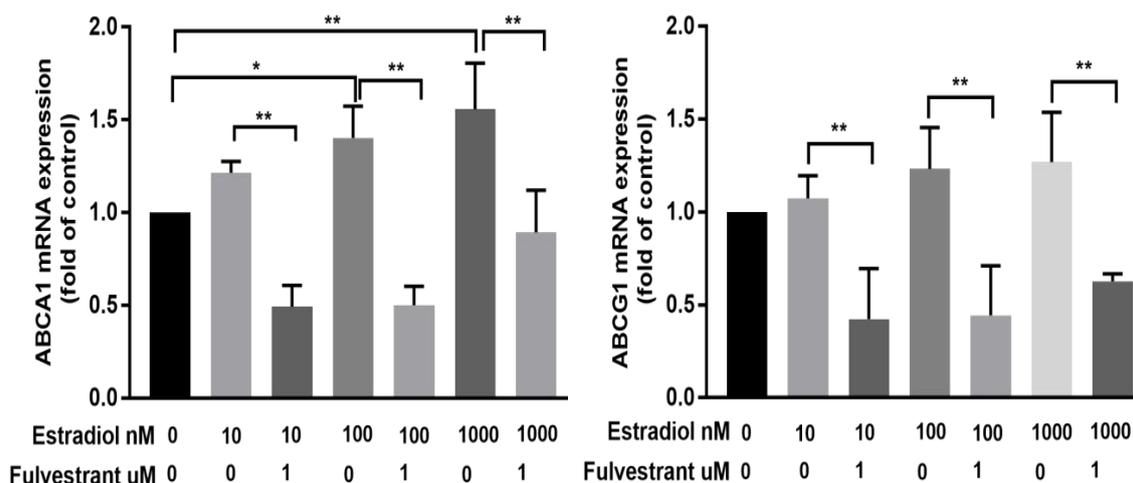


图 2-3 ABCA1、ABCG1 mRNA 表达变化

Fig.2-3 Expression of ABCA1、ABCG1 mRNA

在蛋白水平上,参考 mRNA 的结果,选择雌二醇浓度为 100nM,分别进行 western blot 检测 J774A.1 细胞总蛋白中 ABCA1、ABCG1 表达水平的变化,结果可见,雌二醇处理组的 ABCA1 总蛋白水平高于对照组,而雌二醇+氟维司群共孵育组 ABCA1 蛋白水平低于对照组以及雌二醇处理组; ABCG1 蛋白仅在雌二醇处理组和对照组间存在差异,其余组间无差异。见图 2-4。

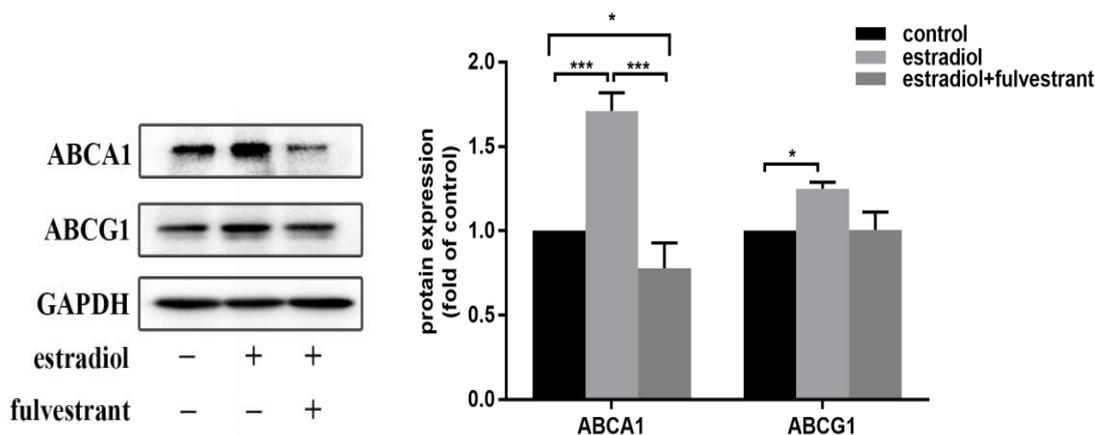


图 2-4 ABCA1/ABCG1 蛋白在雌二醇刺激下表达变化

Fig.2-4 Expression of ABCA1/ABCG1 protein stimulated by estradiol

使用流式细胞术检测细胞膜上 ABCA1 的变化,结果显示,在细胞膜蛋白水平表现出与总蛋白相同的趋势,雌二醇处理组的 ABCA1 膜蛋白水平高于对照组,而雌二醇+氟维司群共孵育组 ABCA1 低于雌激素处理组。在流式细胞直方图可见三者间的表达差异。见图 2-5。

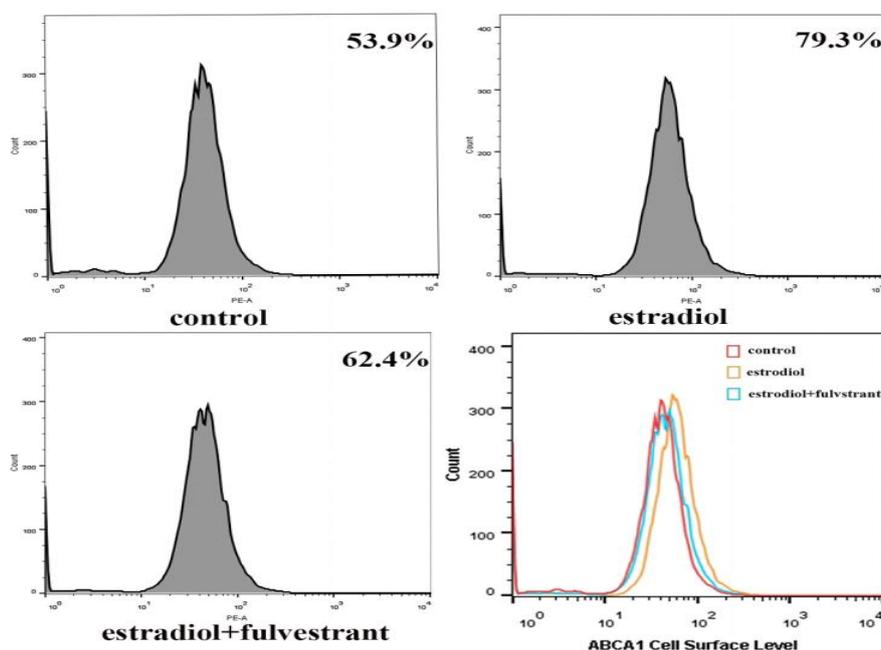


图 2-5 ABCA1 膜蛋白对雌二醇刺激下表达变化

Fig.2-5 Expression of ABCA1 membrane protein stimulated by estradiol

2.3 雌二醇通过 ER α 上调 ABCA1 表达, 独立于 LXR α 作用

由于雌二醇可以促进胆固醇外流和 ABCA1 的表达,并被 ER 拮抗剂阻断,表明雌二醇对 ABCA1 的调节是通过 ER 起作用的。鉴于 ER α 与 ABCA1 在人外周血中的相关性最高,我们推测雌二醇在与 ER α 结合后可以发挥核受体的转录活性并上调 ABCA1 的转录调控。为证实这一推测,我们使用了 siRNA (si-ESR1 和 si-LXR α) 来抑制 ER α 和 LXR α 的表达,以同浓度转染试剂 mock 为对照组。结果可见,在用 si-ESR1 敲减 ER α 的表达后,ABCA1 的表达在 mRNA 水平上降低,敲减 ESR1 同时加用雌二醇孵育组中,ABCA1 的表达并没有增加。与人外周血中的相关分析结果相似,ESR1 与 ABCA1 mRNA 之间存在强相关性。为了排除 LXR α 的可能的中间作用,我们用 si-LXR α 敲低了 LXR α 的表达,可见 ABCA1 mRNA 的表达降低了;然而在敲减 LXR α 的基础上加入雌二醇后,发现 ABCA1 的表达相对于单独的 LXR α 敲减组有所增加。此外,在加入雌二醇后,LXR α 和 ABCA1 mRNA 两者之间无明显相关性。见图 2-6。

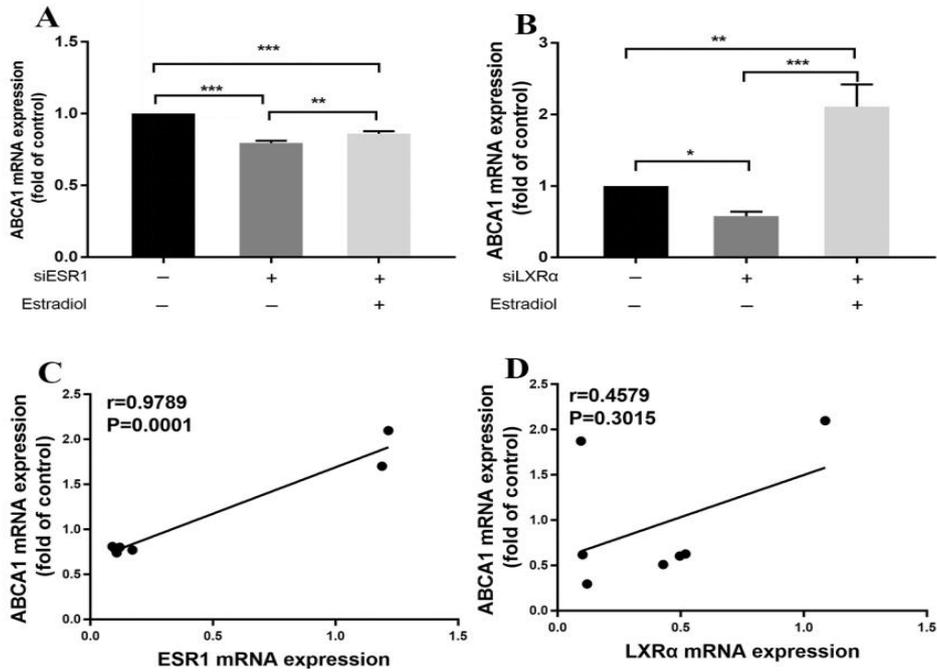


图 2-6 分别敲减 ESR1、LXRα后 ABCA1 mRNA 的表达变化

Fig.2-6 Changes of ABCA1 mRNA expression after ESR1 and LXRα knockdown

在蛋白水平上表现与 mRNA 相同，用 siRNA 敲减 ERα 表达后 ABCA1 的蛋白水平同样出现下调，加用雌二醇并没有逆转这种现象。与之不同的是，用 siRNA 敲减 LXRα 表达后 ABCA1 蛋白表达是下调的，但加用雌二醇后 ABCA1 蛋白的表达被部分逆转了。见图 2-7。

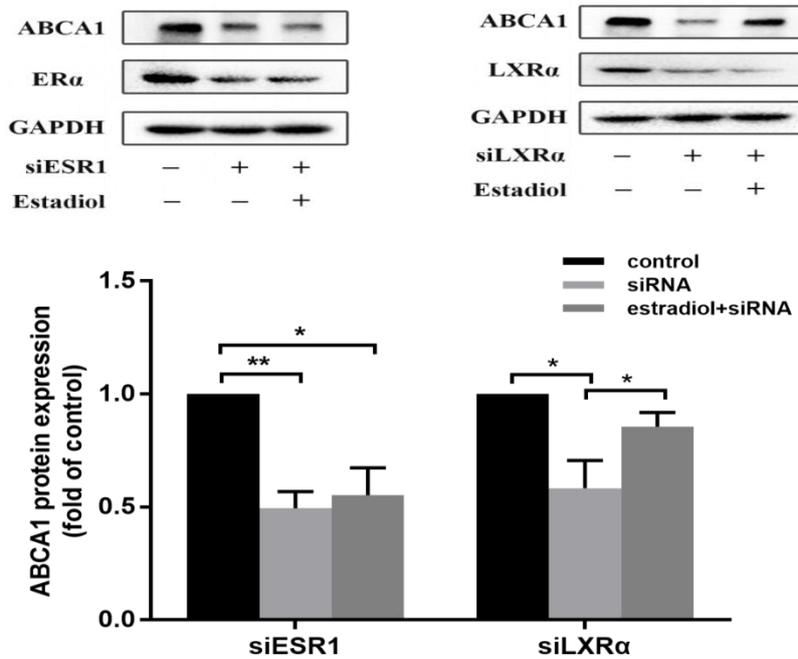


图 2-7 分别敲减 ESR1、LXRα后 ABCA1 蛋白的表达变化

Fig.2-7 Changes of ABCA1 protein expression after ESR1 and LXRα knockdown

3 讨论

本研究中观察到,雌二醇可以增加小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 胆固醇的外流,并且减少细胞内脂滴的形成;这种作用可以被非选择性雌激素受体拮抗剂氟维司群抑制,因此我们考虑雌激素对巨噬细胞胆固醇外流的作用是通过雌激素受体完成的。通过检测 J774A.1 细胞胆固醇释放相关膜蛋白后发现,雌二醇可以提高 ABCA1 的表达,这个作用同样可以被氟维司群抑制。基于第一部分实验中发现 ESR1 与 ABCA1 表达的良好相关性,我们通过 siRNA 去验证两者是否存在调节作用。结果发现敲减 ESR1 基因降低 ER α 表达后,ABCA1 的表达也降低了,而且加用雌二醇并不能逆转。我们同样敲除 LXR α 后 ABCA1 表达是降低的,但敲除 LXR α 同时加用雌二醇组表现出比单纯敲除 LXR α 较高的 ABCA1 表达。因此我们的结果表明雌二醇可以通过与 ESR1 的结合发挥上调 ABCA1 表达,促进小鼠单核巨噬细胞胆固醇外流的作用,这个作用独立于已知的 ABCA1 转录因子 LXR α 的转录调控。

3.1 巨噬细胞在 As 中的作用机制

炎症在 As 的开始和进展中起着关键作用,可由多种原因引起,包括循环 LDL-c 浓度增加。As 斑块含有各种促炎免疫细胞,如巨噬细胞、DCs、T 细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞等。其中巨噬细胞产生于单核细胞,并积极参与细胞碎片、异物颗粒、凋亡/坏死细胞和其他有害物质的吞噬。巨噬细胞代表免疫防御的第一线,巨噬细胞是 As 斑块中发现的第一个免疫细胞:1979 年, Gerrity 等人首次报告了猪病变中大量巨噬细胞的存在^[173]。巨噬细胞在 As 相关炎症中起着重要作用,其表达的 SR 和 Toll 样受体 (TLR)。在斑块中,巨噬细胞接受修饰的 LDL,并自身转化为泡沫细胞,负责动脉壁内脂质的积累。TLR 对 As 的发展非常重要,在 TLR 被相应的配体刺激后,使得巨噬细胞对脂质的吸收得到增强。此外,激活这些 TLR 可抑制巨噬细胞中的胆固醇排出,进而增加脂质积累和泡沫细胞的形成^[174]。可见巨噬细胞在 As 中的重要性,因此本研究中选择巨噬细胞作为雌激素作用受体的研究对象。

巨噬细胞的特点是极高的可塑性,在不同的微环境下表现为不同的表型。已报道的两种主要巨噬细胞亚型是经典的促炎的 M1 型和抗炎的 M2 型。这两个亚型都可以在 As 斑块中找到,但发挥相反的作用。经典 M1 表型的形成是由炎症性细胞因子信号,如肿瘤坏死因子 (TNF) - α 和干扰素 (IFN) - γ 引起的,具有促进炎症的特性,释放炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和趋化因子,并产生高水平 NO 和活性氧物种 (ROS);相比之下, M2 巨噬细胞起着抗炎作用,并参与依赖 Th2 的免疫级联,并释放抗炎细胞因子 IL-10^[174, 175]。修饰的 LDL 具有促进炎症的特性,可以通过改变这些细胞的代谢途径来影响单细胞/巨噬细胞表型。这些观察结果共同突出了巨噬细胞在 As 发展中的促炎和抗炎两极分化之间的平衡的重要性。

3.2 NBD-胆固醇在胆固醇代谢研究中的应用

目前对胆固醇的研究方法存在多种,为了更好的观察以及定量胆固醇在代谢过程中的形式和定位,在实验中多采用标记的胆固醇进行胆固醇的追踪。采用较多的标记胆固醇包括同位素气标记的胆固醇(3H-胆固醇)、荧光标记的胆固醇(NBD-胆固醇、BODIPY-胆固醇),三者普遍用于胆固醇代谢研究中。3H-胆固醇是最早用于研究中的标记胆固醇,是胆固醇外流实验检测的金标准,然而由于其本身的放射性危害,以及对实验室环境安全要求较高,很大的而限制了其在研究中的应用。目前荧光标记的胆固醇逐渐成为了胆固醇代谢研究的主要方式,其中应用较多的是 NBD-胆固醇。

FC 在细胞内会被内质网中的胆固醇酯化酶催化为胆固醇酯,这也是胆固醇在细胞内的储存形式。因此在胆固醇代谢的实验研究中往往需加入胆固醇酯化酶抑制剂,以避免胆固醇的酯化。研究表明,NBD 标记的胆固醇与细胞共孵育 24 小时后,仅 7.8%存在被酯化现象,大都以非酯化的形式存在,且荧光强度并未受到影响^[176, 177]。因此,在测定细胞胆固醇外流实验中,24 小时内使用 NBD-胆固醇无需添加胆固醇酯化酶抑制剂,很大程度尚简化了实验步骤、减少了干预影响。除了细胞实验,目前的研究还使用 NBD-胆固醇来观察小鼠甾醇的摄取。既往认为,NBD 胆固醇比胆固醇具有更高的水溶性,可能不能真正代表胆固醇的吸收和流出,通过用乙醇溶解 NBD-胆固醇并直接孵育细胞,NBD 胆固醇的更高溶解度已被用于摄取研究,并且使用 3H-胆固醇重复关键实验,排除了 NBD-胆固醇的高溶解度对胆固醇摄取和流出研究结果的影响。NBD-胆固醇在孵育细胞 2 小时后就能观察到细胞内丰富的 NBD 荧光,4 小时后荧光强度几乎保持不变,并且荧光强度可以持续稳定到 24 小时,在 48 小时时细胞内荧光强度急剧下降^[178]。近年来,NBD-胆固醇已经成为研究胆固醇代谢的重要工具,因为它在代谢和细胞内流动方面与胆固醇的行为非常相似^[179]。除了体外的细胞实验,NBD-胆固醇还被用于动物的体内实验中。NBD-胆固醇的肠道吸收也类似于胆固醇吸收,对肠细胞具有特异性,并且可被胆固醇吸收抑制剂 L166143 和 L165313 抑制。这些结果表明,虽然 NBD-胆固醇可用于示踪体内胃肠道的胆固醇吸收,但其吸收方式是独立于 NPC1L1 和依折麦布不敏感的方式进行的^[180]。

NBD-胆固醇是将 NBD 荧光探针标记于胆固醇烷基基团,根据连接位置的差异,主要分为三种,NBD 连接在第 22 位碳侧链上(22-NBD 胆固醇)、第 25 位碳侧链上(25-NBD 胆固醇)以及 NBD 连接在碳链的 3 β 羟基端。三者的荧光波长均在激发光为 469 nm 和发射光 537 nm 处检测到绿色荧光,荧光强度随浓度的增加而增强^[181]。其中,连接在 3 β 羟基端的 NBD 胆固醇,其羟基可能与鞘脂的氢键结合有关,并通过细胞中的 ACAT 作为甾醇与脂肪酰基辅酶 A 酯化的底物,因此不适合细胞模型中的胆固醇类似物;22-NBD 胆固醇是卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT)的良好底物,

也是 HMG-CoA 的有效抑制剂, 已用于包括代谢研究在内的多种研究目的; 25-NBD 胆固醇在细胞膜磷脂双分子层中的转运与 22-NBD 胆固醇相似, 但与二氢乙锭 (Dihydroethidium, DHE, 是一种最常用的超氧化物阴离子荧光检测探针) 和胆固醇形成强烈对比, 因此, 25-NBD 胆固醇不能准确模拟胆固醇的膜组织, 不适合研究细胞内胆固醇的运输^[182]。故在本研究中评价细胞胆固醇外流率时使用的是 22-NBD 胆固醇, 结果可见在与细胞共孵育 4 小时后, NBD 荧光就会均匀分布在细胞内。

3.3 ATP 结合盒转运蛋白超家族在胆固醇逆向转运中的作用

虽然所有哺乳动物细胞都能产生胆固醇, 但大多数不能分解代谢该分子, 因此需要将多余的胆固醇从细胞中排出或以胆固醇酯的形式储存在脂滴中。这需要 ATP 结合盒转运蛋白超家族: ABCA1、ABCG1、ABCG5、ABCG8 四个成员以细胞类型特异性方式负责胆固醇流出; 其中巨噬细胞中主要存在 ABCA1 和 ABCG1, 肝细胞和肠细胞中主要存在 ABCG5 和 ABCG8, 四者共同参与介导了体内胆固醇流出的机制。

ABCA1 可以直接转运或翻转几种磷脂穿过脂质双层, 最有可能的是通过从膜的内部小叶横向募集胆固醇。然而, ABCA1 调节胆固醇流出至 ApoA-1 的机制仍有争议。一种观点认为, 当胞外结构域中负载胆固醇和磷脂时, ABCA1 可以与 apoA-I 相互作用, 从而将两种脂质直接传递到 apoA-I; 另一种观点认为, ABCA1 通过促进磷脂转运, 创造了一个从细胞表面突出的活化微结构域, 用于 apoA-I 结合, 在 ABCA1 将氮末端解折叠后, ApoA-1 被插入膜中, 启动脂质双层的微溶解, 导致胆固醇和磷脂的流出^[183]。此外, apoA-I 结合可以防止 ABCA1 在早期内体中降解, 从而促进其再循环到细胞表面和随后新生的高密度脂蛋白生物发生^[184]。

ABCG1 可以与另一种 ABCG1 或 ABCG4 二聚化, 构成功能性转运蛋白, 迄今为止, 对 ABCG1 介导的脂质去除的机制知之甚少。然而比较明确的是, 在富含巨噬细胞的组织中, ABCA1 和 ABCG1 的同时缺失会诱导大量脂质积聚。这些结果支持巨噬细胞 ABCA1 和 ABCG1 直接参与胆固醇流出、预防 As 进展。ABCG1 介导胆固醇流出到各种细胞外受体, 包括高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、白蛋白等^[185]。ABCG1 的准确亚细胞定位一直是存在争议的, 早期内体和再循环内体中的 ABCG1 被认为将胆固醇从内质网动员到囊泡的内小叶, 这些囊泡在与质膜融合时, 将胆固醇分布到质膜的外小叶; 或晚期内体中的胆固醇可以通过非囊泡机制输送到质膜。在细胞表面, ABCG1 特异性定位于富含胆固醇和鞘磷脂的微结构域, 可以重新分布膜胆固醇并增加其对细胞外受体的可及性^[183]。

ABCG5 和 ABCG8 几乎只在肝细胞和肠细胞的顶面表达, 在那里它们作为异二聚体分别调节胆固醇向胆汁和肠腔的排泄^[186]; 肝脏中的 ABCG5 和 ABCG8 可以直

接促进肝细胞胆固醇流出到胆汁中，而肠道对应部分参与将血浆来源的胆固醇排入肠道。除了翻转胆固醇穿过膜双层，ABCG5 和 ABCG8 介导的胆固醇流出的确切机制仍有待确定。与 ABCG5 和 ABCG8 形成功能对一致，ABCG5 和 ABCG8 位于相反的 DNA 链上，并共享一个基因间区域作为共同的启动子，驱动两个基因在相反方向上的转录^[183]。ABCG5 和 ABCG8 在肝脏和肠道的两种途径中发挥着将转化为胆汁的胆固醇向体外排出的作用。

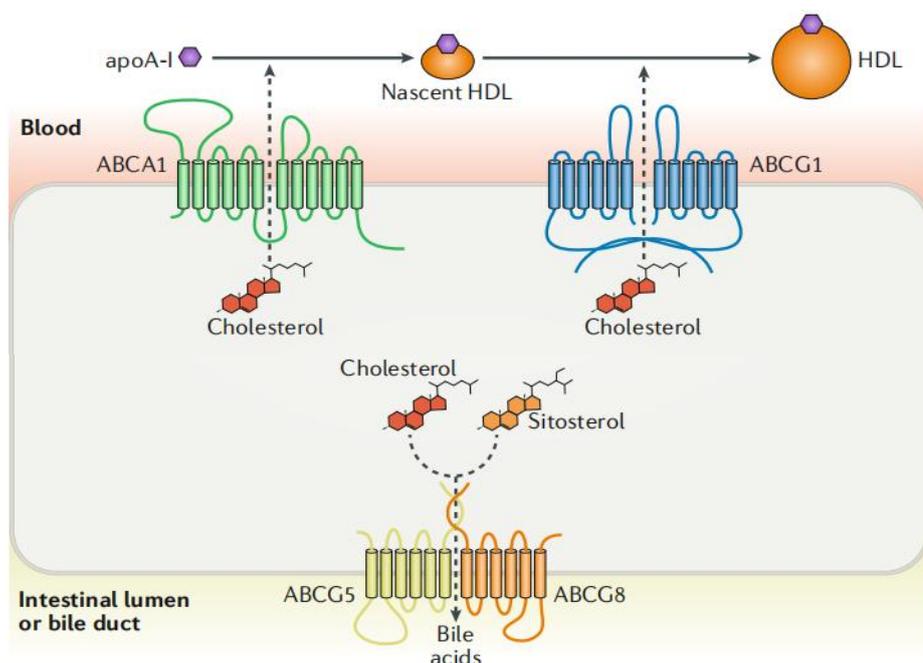


图 2-8 ATP 结合盒转运蛋白超家族胆在固醇外流作用示意图^[183]

Fig. 2-8 Schematic diagram of the role of ATP-binding cassette transporter superfamily of cholesterol efflux^[183]

3.4 ABCA1 在抗 As 中的作用机制

虽然胆固醇在哺乳动物的基础代谢中是必须的，但除了肝脏、肾脏以及性腺细胞外，大部分细胞是不能分解胆固醇的。不论是细胞内还是细胞外胆固醇富集均会产生细胞毒性，因此一般情况下多余胆固醇需要从外周细胞中排出或者以胆固醇酯这种无毒的形式储存在细胞内的脂滴中。循环中胆固醇不仅可以附着在动脉壁上形成脂质斑块，还会激活局部炎症反应，是 As 的主要危险因素。巨噬细胞吞噬富含胆固醇的低密度脂蛋白后，以脂滴的形式储存于胞内，逐渐积累形成泡沫细胞。巨噬细胞衍生泡沫细胞是构成 As 斑块的主要组成部分。胆固醇的外流可以减少细胞内的脂滴，还可以发挥消炎作用，延缓 As 的形成和进展^[187]。了解胆固醇的代谢机制及影响因素极大的影响了 As 的预防和治疗，尤其是对胆固醇消减代谢的研究对冠状动脉保护可以提供可靠的理论依据。

ATP 结合盒转运蛋白超家族中的 ABCA1、ABCG1 就是外周细胞中负责将游离胆固醇排出胞内的主要转运体。研究表明, ApoA-1 是胆固醇由 ABCA1 流出后的主要受体^[188]。结合胆固醇的 ApoA1 转化为新生的 HDL 颗粒, 然后可以在 LCAT 的作用下, 这些 HDL 颗粒有能力从 ABCG1 中获得胆固醇, 这一过程最终形成更大的球形成熟粒子, 如 HDL3, 最后是 HDL2, 最终形成成熟的 HDL^[189]。由此可见, ABCA1 是胆固醇外流中关键的限速步骤。人类 ABCA1 具有 2261 个氨基酸, 含有两个跨膜结构域 (transmembrane domains, TMD), 每个 TMD 包括 6 个跨膜螺旋结构, 是一个完整的转运体。与所有其他 ABC 转运蛋白不同, ABCA1 是 ABCA 亚家族所特有的。ABCA1 向 apoA-I 传递胆固醇的具体模式尚不清楚, 目前在原有交替转运模型的基础上提出一种新的侧向进入的转运模式^[190]。ApoA-I 与两个胞外结构域 (ECD1 和 ECD2) 结合, 这两个结构域共同包围一个疏水通道, 作为脂质输出到该胞外受体的通道, ABCA1 和 ApoA-I 形成一种高亲和力的分子复合物, 以实现最佳胆固醇外流。这种相互作用延长了 ABCA1 在质膜中的半衰期, 因为它促进了其 PEST (脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸和苏氨酸) 序列中 ABCA1 的去磷酸化, 这对于避免钙蛋白酶降解非常重要^[191]。在从细胞中排出后, ApoA-I 中的 FC 被酯化为酰基链, 通过 LCAT 形成胆固醇酯。ABCA1 的遗传缺陷会导致丹吉尔病, 其特征是周围细胞中, 特别是巨噬细胞中胆固醇酯的积累, 以及 HDL 和 apoA-I 的缺失, 冠状动脉疾病风险增加^[192]。对全身 ABCA1 敲除小鼠和人 ABCA1 转基因小鼠的研究表明, ABCA1 在巨噬细胞中具有特别重要的作用, 它能促进细胞内过量胆固醇的清除, 从而防止巨噬细胞向泡沫细胞转化并防止 As 进展^[193, 194]。

ABCA1 启动子区域包含 1453bp, 具有多个转录因子结合位点。研究表明核受体是 ABCA1 的主要转录因子, 包括 LXR、过氧化物酶体增殖剂激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR)。其中 LXR α 在巨噬细胞中高表达, 通过调节 ABCA1 和 ABCG1 的表达, 是 RCT 启动的重要调节因子。LXR α 可以被氧化甾醇 (内源性产生的胆固醇氧化衍生物) 的积累激活, 随后 LXR α 与维甲酸 X 受体 (Retinoic acid X receptor, RXR) 的形成异二聚体进入细胞核, 与具有 LXR 反应元件 (LXRE) 的靶基因 (如 ABCA1、ABCG1) 结合启动转录^[140]。另一类参与调节 ABCA1 和 ABCG1 表达的核受体是 PPAR, 它包含三种亚型。与 LXR 一样, PPAR 在被配体激活后与 RXR 形成异二聚体, 与靶基因中的同型特异性 PPAR 反应元件 (PPRE) 结合, 调控靶基因的转录。在体外和体内研究中, PPAR 与 ABCA1 表达的增加相关, 并因此增强 HDL 的生成^[195]。三种 PPAR 亚型都通过 LXR α 介导上述效应, 即 PPAR-LXR α -ABCA1 信号轴, 然而只有 PPAR γ 通过与 LXR α 启动子附近的 PPAR 反应元件的相互作用直接影响 LXR α 的表达^[196]。对于 ABCA1 的调节除了转录水平的调节, 还有转录后的非编码 RNA 的调节, 对于 ABCA1 的蛋白丰度同样重要。

最新研究发现 lncRNA MeXis, 在巨噬细胞内表达诱导 LXR_s 的序列, 可以增强 LXR_s 途径诱导的 ABCA1 表达^[197]。由此可知, 针对 ABCA1 途径治疗胆固醇外流的有效方法可以是在转录水平, 也可以在转录后水平。其中核受体是细胞胆固醇稳态的重要效应器, 是诱导 ABCA1 和 ABCG1 表达并最终增强细胞胆固醇外流和 RCT 的主要靶标。

3.5 核受体转录因子超家族

核受体 (Nuclear receptor, NRs) 包含一个保守转录因子的超家族, 主要由小的亲脂性配体和细胞信号通路调节, 人类 NR 超家族共有 48 个成员, 这些受体作为单体和同源/异源二聚体发挥作用, 直接调节基因的转录。它们的配体是脂性化合物, 如类固醇、甲状腺激素、维生素 D3 和维甲酸等。由于核受体几乎涉及人类生理的所有方面, 并与许多重要疾病, 包括癌症、糖尿病和脂代谢有关, 因此, 对这些受体的理解对人类生物学和新药治疗的发展具有重大意义。核受体是与 G 蛋白偶联受体 (GPCRs)、离子通道和激酶等具有相似重要性的药物的靶点。

NRs 含有一个 C 末端配体结合和反式激活结构域 (LBD), 一个中心 DNA 结合结构域和一个可变的 N 末端无序反式激活结构域。这些受体通过招募修饰染色质和相关转录复合物的共同调节蛋白, 从 LBD 中的配体结合转导信号, 以调节基因表达。NR 配体与共调节因子结合位点间的变构信号传导机制尚不清楚。NR 可以根据其受体二聚模式和 DNA 类型分为四种。第一种为形成同型二聚体并结合到 DNA 反向重复序列, 并且包括类固醇受体, 主要为各种激素受体, 如 ER、雄激素受体、孕激素受体等; 第二种为与 RXR 结合形成异二聚体, 并且直接结合到 DNA 重复序列上, 包括过氧化物酶体增殖剂激活受体 (peroxisome proliferators activated receptors, PPARs)、LXR 等; 第三种为直接结合到 DNA 重复序列的同型二聚体, 例如 HNF-4 α 、Rev-Erb; 第四种为与扩展的单个 DNA 半位点结合的单体, 包括 ROR 和 NURR 家族成员等受体^[198]。非甾体受体的共有半位点通常为 5'-AGGTCA-3' 序列, 甾体受体的共有半位点通常为 5'-AGAACA-3' 序列。这些是特异性接触反应元件的 DNA 结合域 (DBD) 和识别内源性小分子配体和协同调节区的配体结合域 (LBD)。由此可知, 具有相同转录结合位点的 NRs 很有可能存在相同的调控靶基因, 并发挥相似的作用功能。

3.6 雌激素/ER 发挥功能的作用方式

雌激素受体作为 NRs 家族中的成员之一, 受到配体雌激素的结合后激活。人体内存在的雌激素具有三种结构形式: 雌酮、雌二醇和雌三醇, 其中雌二醇是雌激素的一种最有效、最普遍的形式, 因此在研究中主要以雌二醇作为雌激素的主要研究替代主体。雌激素主要通过经典的 ER 结合发挥生物学效应, ER 是一种配体激活增

强蛋白，是 I 类核受体超级家庭的成员。哺乳动物 ER 包括两种亚型：ER α 和 ER β ，分别由两种不同的基因 ESR1 和 ESR2 编码。两者结合后形成二聚体后构象发生变化，称为“激活”，并转移到细胞核，以高亲和力与雌激素反应元件（EREs）的特定 DNA 序列结合，发挥雌激素的生物学功能^[199]。17 β -雌二醇或其他雌激素结构形式对靶基因表达调节的作用机制被认为是主要通过两种作用方式产生的：一种是“直接结合”的方式，即雌激素与 ER 结合后形成同二聚体的形式，伴随着与 hsp90、hsp70 的分离，雌激素/雌激素受体复合物发生活化，进入细胞核中，与启动子中具有 ERE 特定序列的靶基因结合，最终形成转录起始复合物导致转录增强^[200]，ERE 的序列为 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3'，其中 n 是任何核苷酸^[201]；另一种方式是“栓系”，ER 不直接与 DNA 结合，而是与另一种转录因子相互作用，达到稳定该转录因子的 DNA 结合和/或招募复合物的辅活化剂，使一些蛋白赋予雌激素反应^[202]。因此，识别和理解由雌激素调节的基因的转录机制至关重要。

总的来说，ER α 比 ER β 表现出更高的转录活性^[203]，配体结合是体内 ER α -ERE 结合所必需的，体外中虽然不需要配体的结合^[204]，但配体可以稳定 ER-ERE 结合^[205]。研究数据表明 ER α 结合亲和力与雌二醇诱导的转录激活没有线性关系，造成这种不一致的原因可能包括 ERE 和转录起始点之间的距离；细胞数量和其他转录因子、辅活化子和衔接蛋白在 ER 结合和转录激活中的作用；ER 和其他相关蛋白的磷酸化转录激活；以及序列特异性和蛋白质诱导的染色质结构改变。此外，数据表明，在 ERE 序列的核苷酸变化越多，ER α 结合亲和力越低，转录活性越低^[202]。因此，对 ER 参与的转录调控的靶基因，启动子区域内的 ERE 序列的保守性，影响着转录水平。

3.7 雌激素/ER α 途径对 RCT 的影响机制

绝经前女性的低心血管风险已引起对雌激素在心血管系统中的保护作用的极大关注。既往研究集中于雌激素在肝脏中调节脂质代谢和转运的机制^[206, 207]。本研究表明雌激素通过调节肝细胞内 HMG-CoA 还原酶和 LDLR 的表达，降低肝脏及血浆内胆固醇的含量^[53, 59, 60]。此外，雌激素通过 ER α 发挥作用，以浓度依赖的方式在育龄期雌性小鼠肝脏中，周期性的诱导 HDL 结构和功能重塑，促进了肝脏中胆固醇外流和胆汁酸合成而降低心血管疾病风险^[208]。本研究结果证实雌二醇可以在巨噬细胞内与 ER α 结合后，正向调控 ABCA1 的转录表达，促进巨噬细胞内胆固醇的外流，并且不依赖于 LXR α 。

ER 属于 I 类核受体，LXR 和 PPAR 是 II 类核受体。I 类核受体之间的进化关系是由其高保守 DNA 结合结构域（DBD）和保守性较差的配体结合结构域（LBD）中推论得出，表明这一大类的蛋白质是由一个共同的祖分子产生的^[209]。有意思的是，LXRE 以及 PPRE 特异性 DNA 序列为两个直接重复的激素反应元件序列 5'-AGGTC-3'，不同的是 LXRE 是被四个核苷酸隔开，PPRE 被一个核苷酸隔开^[210]。

^{211]}。虽然 ERE 存在一个或多个核苷酸的变异,但序列中 5'-AGGTCA-3'为 ER 提供了结合位点和结合能^[202]。这种共同起源解释了核受体超家族成员之间 DNA 结合和转录激活机制的相似性。作为具有高度相同结合序列的核受体超家族成员,这可能是雌激素参与调解多种脂代谢的潜在机制。

鉴于 ABCA1 启动子中有 ERE 结合序列,我们通过小干扰 RNA 技术得到了证实,雌激素/ER α 复合物参与 ABCA1 转录水平的调控,且上述调节机制独立于 LXR α 对 ABCA1 的转录调控作用。这与 wang 等的研究结果不同。这项对平滑肌细胞的研究结果显示,雌二醇通过 ER β 正向调控 LXR α ,间接的参与 ABCA1、ABCG1 表达调控^[212]。这与其他基于细胞的研究结果相同^[212, 213]。在动物水平的研究结果显示,小鼠髓系特异性 ER α 缺乏,其腹腔巨噬细胞的 ABCA1 蛋白表达降低,加速了 As^[214]。通过 ³H 胆固醇标记的巨噬细胞观察体内胆固醇代谢研究发现,ER α 信号促进了肝脏对胆固醇的吸收,以及改善了泡沫细胞 CEC,在雌性小鼠 As 早期保护动脉避免脂质积聚^[215]。ER α 和 ER β 具有不同的组织/细胞分布,并且对它们调节的配体和非重叠基因具有不同的亲和力^[216]。因此导致这种结果差异的可能原因在于 ER 在不同细胞中的作用优先级差异造成的。

此外,核受体超家族中成员间的相互作用也是存在的,例如在 THP-1 衍生泡沫细胞中,核受体 PPAR γ 通过 PPAR γ -LXR α -ABCA1 轴介导 ABCA1 表达增加和 apoA-1 介导的胆固醇流出^[217]。在小鼠肝脏中,高浓度的雌激素可以增强雌激素/ER α 复合物与 DNA 的结合,并促进 LXR α 的结合和转录活性^[208]。这解释了在我们的结果中,ER 拮抗剂可以明显降低 ABCG1 的表达,但雌二醇对 ABCG1 的影响与对照组相比,并无统计学意义。Rai 的研究发现,即使在 ER- α 缺乏的小鼠中,雌激素也增加了肝脏 ABCA1 基因,这表明在肝脏组织中 ER α 的存在不是雌激素介导的 ABCA1 调节的先决条件,其他雌激素受体,如 ER β ,可能取代 ER α 的功能^[218]。不论是在体内肝脏中还是体外的巨噬细胞,雌激素/ER 途径似乎均显示出有益的胆固醇调节作用。

3.8 靶向 RCT 的抗 As 治疗

HDL 被认为通过多种机制抑制 As: HDL 可以减少细胞中过量的胆固醇,具有很强的抗氧化作用,抑制血小板聚集,并发挥多种血管保护作用。最值得注意的是, HDL 还具有显著的调节各种细胞类型炎症反应的能力。从健康个体中分离的 HDL 或从纯化的 apoA1 和磷脂中重构的 HDL 具有很强的抗炎作用^[219]。炎症反应和胆固醇过载是巨噬细胞发挥致 As 的主要机制。炎症介质(IL-1 β 、TNF α 和 MCP-1 等)由巨噬细胞泡沫细胞在 Toll 样受体等固有免疫受体刺激下分泌,或通过炎症小体途径分泌,对斑块中的其他两种主要细胞类型内皮细胞和血管平滑肌细胞产生不利影响。此外,死亡的巨噬细胞泡沫细胞有助于坏死核心的形成,而坏死核心富含胆固醇、炎症物质和组织因子,是易损斑块的标志^[220]。因此, HDL 作为同时具有抗炎和降低

细胞内胆固醇的有效脂蛋白，成为了抗 As 治疗非常有前景的研究热点，目前已有多项基于 HDL 治疗的临床 II 期实验。

针对 HDL 的许多研究都致力于模拟或过度表达 apoA-I 作为潜在的 As 治疗策略，这是一种很有前景的治疗方法。首先，apoA-I 是 HDL 中功能最丰富的结构脂蛋白，约占 HDL 总量的 70%^[221]。此外，由 ABCA1 转运胆固醇给 apoA-I 被认为是 HDL 颗粒生物合成的限速步骤。因此，使用 apoA-I 模拟物提高 apoA-I 水平有望刺激 RCT。这一策略的潜力在一些体外和体内研究中得到了证实，在这些研究中，用 apoA-I 模拟物治疗可提高血浆 HDL 水平，减少 As 病变^[222]。然而，最近临床试验评估这些 apoA-I 模拟物的输注，包括有效的模拟 apoA-I 米兰诺，没有显示出对 As 的保护作用^[223]。这也证实了不是 HDL 水平，而是 RCT 的其他部分，如 ABCA1-和 ABCG1 介导的胆固醇外流，导致 HDL 水平与 As 事件之间的负相关。

在降胆固醇治疗基础上增加 ABCA1 和 ABCG1 介导的细胞胆固醇外流似乎是一种降低心血管风险的有效策略。然而，LXRs 激动剂可诱导 SREBP-1c，导致血清甘油三酯水平升高和肝脂肪变性^[197, 224]。雌激素既可以正向调节脂质稳态，又可以促进 RCT。这也解释了年轻女性相对于同龄男性不易患冠心病，且女性绝经后的低雌激素状态患冠心病的风险等同于男性。

由上可知，ER 属于转录因子，本研究只间接证明雌激素通过 ER α 参与 ABCA1 的转录调节，未证明雌激素受体与 ABCA1 启动子的直接结合。后期可通过荧光素酶基因报告实验等，验证 ER α 与 ABCA1 启动子的直接结合并参与转录激活。我们的结果表明，雌二醇可以通过 E/ER α 途径上调 ABCA1 的表达，促进巨噬细胞内胆固醇的外流，延缓巨噬细胞向泡沫细胞的转化。雌激素在心血管系统的作用是复杂的，目前 HRT 对绝经后女性是否有益仍然存在较大争议^[225]。针对雌激素水平的研究，有助于针对女性 As 患者的诊断和治疗策略。

4 小结

4.1 雌二醇可以促进小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 胆固醇外流，减少细胞内脂滴的形成，这种促进胆固醇外流的作用可以被雌激素受体拮抗剂阻断；

4.2 雌二醇对 ABCA1 的表达具有正调控作用，这种调控作用同样可以被雌激素受体拮抗剂阻断；

4.3 雌二醇是通过 ER α 发挥对 ABCA1 的调节作用，与 LXR α 对 ABCA1 的调控作用无关。

第三部分 雌激素调节巨噬细胞 ABCA1 表达延缓动脉粥样硬化小鼠模型的研究

富含胆固醇的脂质在动脉内皮下沉积是 As 斑块形成的主要因素^[24, 226]，因此，脂代谢在 As 中的作用机制研究一直是心血管疾病的研究热点。在 As 的形成过程中，富含脂质的巨噬细胞逐渐衍生为泡沫细胞并形成动脉壁上 As 斑块的核心^[227]。雌激素作为类固醇类激素，可以由特异性细胞分泌后进入血液循环，最终停留在不同的组织器官内，发挥不同的效应机制。在外周循环中，雌激素同样可以作用于血管壁，产生各种血管效应。例如在循环中，雌激素通过自身的生物活性作用，通过调节血浆内皮素、NO 等影响血压及血管弹性；同时也参与血液中各类血脂成分的调节，与血脂水平密切相关^[228]。因此，针对雌激素靶效应的研究是必要的。

在此部分的研究中，为了在小鼠体内验证前期细胞实验的结果，我们在雌性 ApoE 基因敲除小鼠中，通过卵巢切除构建体内的雌激素阻断，检测巨噬细胞内相关蛋白水平的变化，以及冠状动脉内粥样硬化斑块中 ABCA1 表达的变化与斑块面积的可能关系。

1 研究内容与方法

1.1 研究对象

由北京斯贝福生物公司购买 8 周龄 ApoE 基因敲除 C57BL/6 雌性小鼠 24 只（实验动物生产许可证编号：SCXK（京）2019-0010），每组 8 只，购买后适应性饲养 1 周开始后续实验。根据不同处理，实验小鼠分为三组：

- （1）假手术组（sham）；
- （2）双侧卵巢切除组（OVX）；
- （3）双侧卵巢切除+雌二醇灌胃组（OVX+E2）。

1.1.1 小鼠卵巢切除模型

1.1.1.1 小鼠双侧卵巢切除

- （1）麻醉：以 0.3ml/100g 的比例用 7%的水合氯醛腹腔注射。
- （2）固定、消毒：小鼠体位为侧卧位固定，用酒精棉球对小鼠背侧、腹侧皮肤消毒。
- （3）背侧单切口卵巢摘除：以小鼠下肢根部水平线与脊柱交界处，取距离脊柱约 1 厘米处定位，以纵向水平方向做 0.5 厘米的切口，并离断切口下的肌肉组织，探

查可见被脂肪组织包绕的卵巢，用镊子轻夹住脂肪组织缓慢将其拉至切口处，可见连接输卵管的子宫，以子宫角为定位标志，结扎其上部和下部分别与输卵管连接处，然后离断结扎部位完成卵巢的切除。检查有无出血，确认后把其余脂肪组织缓慢放回腹腔，全层缝合切口。缝合时需注意使用高压灭菌器械，多次给予酒精和碘伏进行消毒。缝合后，肌注青霉素注射液 0.5ml，降低小鼠感染概率，提高存活率。

1.1.1.2 雌激素给药

β -雌二醇购买于 sigma（货号 E8875），将粉末状的雌二醇溶于橄榄油中，按雌二醇终浓度 0.3mg/kg 给 OVX+E2 组小鼠灌胃，每日一次；sham 组和 OVX 组给予等体积溶媒灌胃，灌胃时间及次数同 OVX+E2 组。

1.1.2 小鼠 As 模型

小鼠喂养过程中三组均用高脂高胆固醇饮食，具体配方为：胆固醇 1.25%，脂肪 15%，胆酸 0.5%，基础饲料 83.25%。从卵巢切除后开始喂养 8 周。8 周后进行下一步处理。

1.2 内容与方法

1.2.1 腹腔巨噬细胞提取

- (1) 5% 巯基乙酸盐培养基经过高温高压灭菌后密封，并于 4℃ 保存备用；
- (2) 每只小鼠在腹腔内注射 5% 巯基乙酸盐培养基 2ml，注射时应保证针头在腹腔内，72 小时后结束；
- (3) 术前保证小鼠禁食时间达到 8 小时以上；
- (4) 经颈椎脱臼法将小鼠处死，然后用 75% 酒精充分消毒腹部操作部位；
- (5) 剪开皮肤并且将腹膜充分暴露；
- (6) 用镊子提起腹膜，向腹膜下的腹腔内缓慢打入 5ml 的 1640 培养基（最好提前 4℃ 预冷），缓慢轻揉小鼠腹部 5 分钟，然后回抽收取腹腔内液体，并收集到离心管，为了充分收集巨噬细胞，重复操作一次。
- (7) 将收集的液体在预冷的离心机中以 1000rpm 离心 8 分钟，去上层液体，可见底部白色的细胞沉淀（如若沉淀中含有过多的红细胞，可考虑使用红细胞裂解液）；
- (8) 在细胞沉淀中加入适量体积的含有 20% FBS 的 1640 培养基，用巴氏管吹散细胞，在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱提纯培养 2 小时，贴壁细胞即为巨噬细胞。

1.2.2 免疫组化

1.2.2.1 心脏取材

颈椎脱臼法处死小鼠后解剖，用外科剪刀剪开小鼠胸腔，充分暴露心脏后取出心脏，放入预冷的 PBS 中多次洗涤，去除血细胞。在解剖显微镜下用眼科剪分离出左心室部位前降支所在区域的心脏组织，放入 4% 多聚甲醛中固定。

1.2.2.2 固定、脱水、包埋和切片

1.2.2.2.1 固定

取 15ml 离心管，加入 10ml 4% 的多聚甲醛溶液，取小鼠需要观察的心脏组织，使用 PBS 涮洗两次，去除杂质后，用滤纸吸干多余水分，置于前期准备好的多聚甲醛中，通常固定时间约 24h。

1.2.2.2.2 脱水

将固定好的心脏组织取出，使用流动自来水冲洗 5min，之后将其置入脱水笼中，按照以下条件进行脱水：

50%乙醇 1h

70%乙醇 1h

90%乙醇 1h

95%乙醇 I 1h

95%乙醇 II 1h

100%乙醇 I 1h

100%乙醇 II 1h

松节油 I 30min

松节油 II 30min

提前将三种不同熔点的组织包埋专用石蜡加热至熔化，将透明后的组织放入其内，梯度浸蜡，每缸 2h 以上，总计浸蜡时间不低于 6h。

1.2.2.2.3 组织包埋

预热包埋机，熔化足量包埋用石蜡，并且将模具置于 65℃ 石蜡包埋机操作台上预热，同时开启冷冻台预冷。待石蜡熔化后，用半剂量的液态石蜡填充在模具内，之后将组织小心放在模具中间部位，并仔细调整好组织方向，然后再次加入液体石蜡，填满整个模具。将石蜡放于 4℃ 冰箱中使其凝固，待石蜡凝固后取出石蜡块。将石蜡标记清楚组织样本名称后妥善存放备用。

1.2.2.2.4 制作石蜡切片

提前开启预冷台、展片机，将已经制作好的石蜡块放于提前预冷的预冷台上充分降温，固定蜡块于切片机上，先使用 20~40 μ m 的修片厚度进行修片，待切至目标部位最大切面时，调整至正常切片厚度。使用镊子小心地将组织切片放置于预热好的展片机上，使组织舒展开，使用提前用铅笔写好标本名称的防脱玻片捞片，70℃ 烤片机上烤片，烤干的切片、有序地放置于切片盒中。调整好切片机夹具与刀片距离，卸下刀片，登记使用情况，展片机使用过后清洗干净，换上新的单蒸水，整理物品，彻底清理、实验垃圾，保持清洁。

1.2.2.3 脱蜡及抗原修复

1.2.2.3.1 烤片

将石蜡切片放在玻片架上，并将玻片架放入提前预热到 65℃ 的烘箱上层，烤片 2h 左右，使蜡熔化。

1.2.2.3.2 脱蜡

取出烤好的玻片，以下述步骤开始脱蜡：如采用松节油，则应将其提前预热至 37℃。松节油/二甲苯 15min，松节油/二甲苯 15min，无水乙醇 10min，无水乙醇 10min，95%乙醇 5min，80%乙醇 5min，75%乙醇 5min，50%乙醇 5min，ddH₂O 5min。

1.2.2.3.3 抗原修复

配置适量柠檬酸钠抗原修复液，倒入高压锅中，打开电磁炉放上高压锅进行加热。待修复液开始冒小气泡后，放入脱蜡后的切片，使得抗原修复液没过切片。盖好高压锅盖，等冒气以后，开始计时 3min，并调整电磁炉为保温 120℃。待抗原修复时间结束后，将高压锅拿下，放于防烫的实验台上，等锅内压力自然降低以后，方可开盖。注意：抗原修复液应足量，避免组织干燥。

1.2.2.4 抗体孵育及显色

1.2.2.4.1 封闭

等待抗原修复液自然冷却至室温后，将载玻片泡在 PBS 中浸泡 5 分钟，更换 PBS 重复 2 次；为了除去标本中的过氧化物酶，将玻片放入 3% 双氧水中浸泡 10 分钟；将载玻片置于 PBS 中 5min，洗 2 次；用吸水纸小心擦干组织周围的 PBS，注意不要碰到组织，将擦干的玻片平铺于孵育盒；加入适量的血清封闭液，以阻断非特异性结合。注意要尽快操作，以避免组织过于干燥，出现非特异性染色；将孵育盒在 37℃ 恒温箱中封闭半小时。

1.2.2.4.2 孵育一抗

取出载玻片，去除载玻片上组织四周残余的血清，载玻片反面的血清也需要擦拭干净。使用免疫组化笔在组织周围画圈，滴加一抗（空白对照的组织上加一抗稀释液，阴性对照滴加 IgG）；加完一抗后将玻片放在 4℃ 冰箱中过夜；加一抗二抗增强剂。将 4℃ 一抗结合后的载玻片从冰箱中取出，静置于室温平衡 30 分钟；将复温后的玻片放入玻片架上，使用 PBS 浸泡清洗 3 次，每次 5 分钟；吸水纸去除组织周围的液体后加一抗二抗增强剂，室温放置 15~20 分钟。

1.2.2.4.3 孵育二抗

孵育二抗前将玻片在 PBS 中洗涤 3 次，5 分钟/每次；擦干组织周围 PBS 残留液后将玻片平铺在孵育盒中，滴加适量体积的二抗；室温放置 30~45 分钟。

1.2.2.4.4 显色

按照说明书配置合适浓度的 DAB 染色液，混合均匀后备用；将玻片取出，擦干

多余水分，显微镜调至合适视野，滴加适量 DAB 显色液，计时，显色；其余玻片选用相同的显色时间进行显色

1.2.2.5 复染

将显色后的片子用流动的水冲洗 10 分钟；洗过后的片子浸泡在苏木素染色液中染色 5 分钟左右；继续使用清水将染色后的片子冲洗 10 分钟；使用苏木素分化液浸泡 2s 进行分色；流水冲洗 5 分钟；使用苏木素返蓝液浸泡 2 秒进行返蓝，严格控制时间；流水冲洗 5 分钟。

1.2.2.6 脱水

将复染后的玻片按下列描述依次放入以下溶液：50%、70%、80%、90%、95%、100%、100% 的 6 个浓度的乙醇中，每个浓度浸泡 5 分钟，然后在二甲苯/松节油 15 分钟，二甲苯/松节油 15 分钟。

1.2.2.7 封片、采图

将玻片置于玻片晾片板上，在组织旁边滴加中性树胶，然后在有树胶的一侧轻轻放下盖玻片的一边，接着缓慢将盖玻片放下，过程中避免产生气泡。在通风柜中将片子完全晾干，标签纸注明切片信息，收纳于切片盒中。显微镜下采图、分析数据。

1.2.3 主动脉油红 O 染色

1.2.3.1 全主动脉油红 O 染色

将对照小鼠和喂食药物小鼠在实验结束时采用颈椎脱臼的方法处死，小心将主动脉从小鼠体内完整剥离。在体式显微镜下，将主动脉外侧附着的脂肪组织等剥离完全。将整个主动脉放在 4% 的多聚甲醛组织固定溶液中浸泡固定至少 24 小时。用 1×PBS 溶液清洗主动脉两次，每次 5 分钟。然后再将清洗过的主动脉浸泡在油红 O 工作液中 40-60 分钟。油红 O 染色后立即用 60% 异丙醇短暂浸泡以除去组织背景染液，然后使用蒸馏水反复冲洗数次。于显微镜下再次观察主动脉，主动脉内富含脂滴的 As 斑块呈现红色，其余血管壁无特殊染色。于显微镜下拍照，保存照片。

1.2.3.2 主动脉根部冰冻切片油红 O 染色

先用 4% 多聚甲醛组织固定液固定小鼠心脏 30 分钟，取出后脱水处理，然后用 OCT 进行组织包埋。以 8-10 μ m 的厚度制备冠状连续冰冻切片。切面角度和三尖瓣瓣口保持平行。切片保存于 -40℃ 冰箱备用。将切片从冰箱内拿出后立即在 PBS 溶液中浸泡 10 分钟后进行油红 O 染色。用油红 O 工作液完全浸泡住切片内的组织，避光接触染色 15 分钟，然后用 PBS 浸泡洗涤 3 次，每次 5 分钟，洗涤结束后用甘油封片，显微镜下拍照留图。

1.2.4 蛋白质印迹 (western blot)

腹腔巨噬细胞提取后检测细胞总蛋白 (western blot 的具体实验方法见第二部分

1.2.4.2.1 蛋白质印迹)。

1.3 质量控制

首先, 保证实验过程中使用动物的品系正确尤为重要。为了保证实验小鼠符合实验要求, 针对购买的小鼠随机进行鼠尾基因型鉴定, 以确保购买的实验用小鼠品系正确。其次, 为了保证动物实验外界因素影响, 需保证实验用的小鼠生长环境进行严格控制。本实验中动物饲养环境温度 18~29℃; 相对湿度 40~70%; 小鼠饲养环境以及喂养过程中接触的物品需要保证无毒性、无气味、无致癌物质以及无添加实验外药物。最后应严格控制饲养方式和饲料配方是符合实验设计的, 不可以在饲养过程中变化, 以保证小鼠生长环境的稳定性。

1.4 统计方法

所有数据采用 SPSS 23.0 软件进行分析, 统计图使用 GraphPad Prism7 制作。满足正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{X}\pm S$) 表示, 如满足参数检验条件的 2 组间统计采用 *t* 检验, 大于 2 组统计方法采用方差分析; 若不满足则采用非参数检验 (2 组间比较采用 Mann-Whitney 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验), 多于 2 组的两两相互比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠卵巢切除及雌二醇灌胃模型

ApoE 基因敲除小鼠根据实验设计分为三组, 分别为假手术组 (sham), 卵巢切除组 (OVX), 卵巢切除+雌二醇灌胃组 (OVX+E2)。小鼠麻醉腹部定位后做皮肤切口 (A), sham 组随后缝合皮肤切口, OVX 组探查卵巢后以子宫角作为标志物切除卵巢 (B), OVX+E2 组在切除卵巢后每日给予雌二醇灌胃 (C); 同时 sham 组和 OVX 组给予溶媒 (橄榄油) 灌胃。处理后的三组小鼠的均为高脂饲料喂养, 见图 3-1。

2.2 雌激素对小鼠体重的影响

按实验设计将小鼠分为三种不同的处理组, 均高脂喂养 8 周, 在结束喂养开始组织实验前对所有小鼠称重。结果可见, 单纯 OVX 组以及 OVX+E2 组小鼠体重平均水平高于 sham 组, 两组比较均具有统计学意义; OVX 组和 OVX+E2 组小鼠体重比较无统计学差异。见图 3-2。

2.3 雌激素对小鼠动脉内斑块形成的影响

全主动脉油红 O 染色可见 OVX 组 (B) 血管壁上脂滴较 sham 组 (A) 和 OVX+E2 组 (C) 多; 进一步对主动脉根部做冰冻切片油红 O 染色, 可见 OVX 组 (E) 斑块面积及脂滴含量大于 sham 组 (D) 和 OVX+E2 组 (F)。见图 3-3。

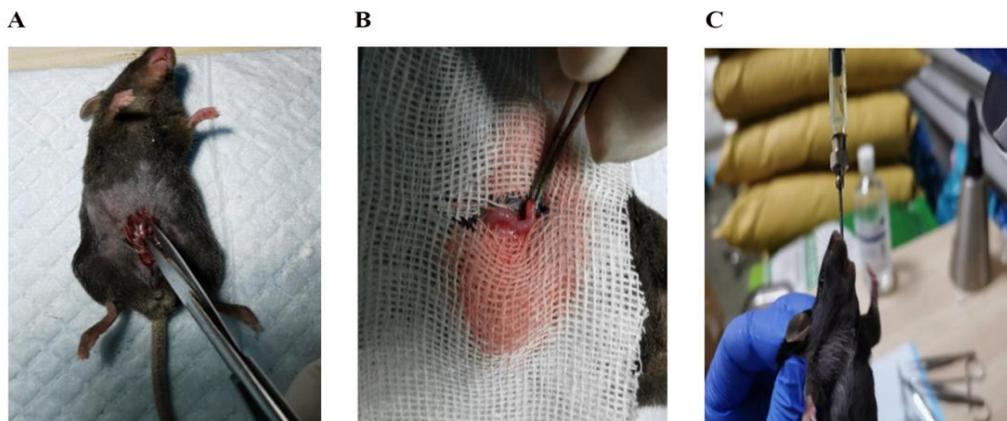


图 3-1 ApoE 基因敲除小鼠卵巢切除及雌二醇灌胃模型

Fig.3-1 Ovariectomy and estradiol intragastric administration in ApoE knockout mice

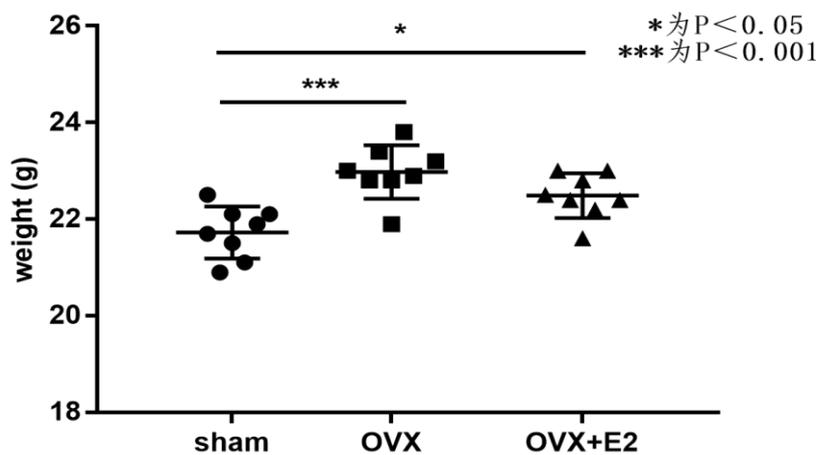


图 3-2 三组小鼠体重比较

Fig.3-2 Comparison of body weight of three groups of mice

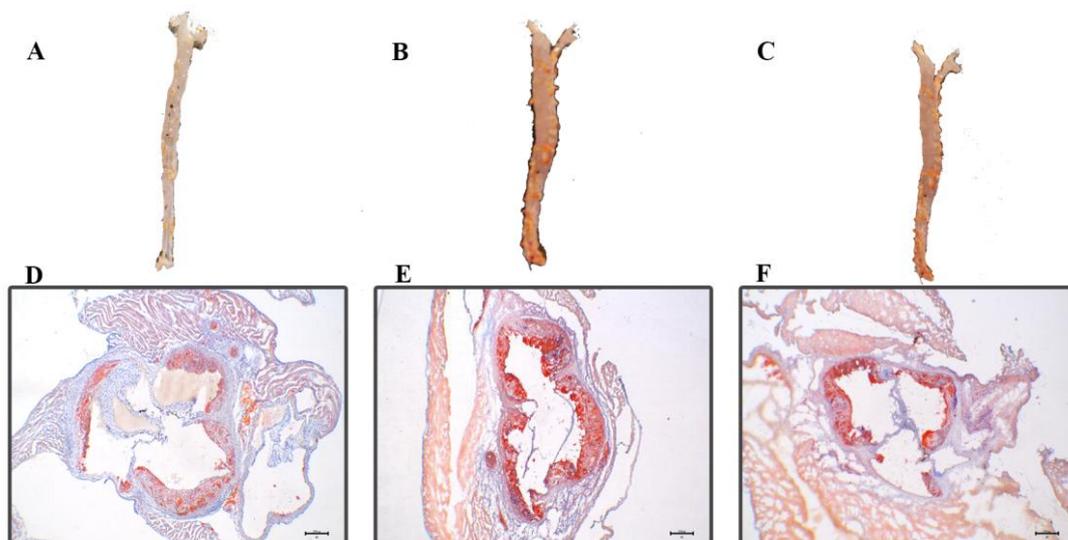


图 3-3 小鼠主动脉油红 O 染色

Fig.3-3 mouse aorta oil red O staining

2.4 小鼠腹腔巨噬细胞相关基因表达分析

三组小鼠经高脂高胆固醇喂养 8 周后, 提取腹腔巨噬细胞后检测相关蛋白表达水平。结果可见, ABCA1 和 ABCG1 在 OVX 组表达低于 sham 组和 OVX+E2 组, OVX+E2 组 ABCA1 和 ABCG1 表达低于 sham 组; ER α 表达较 sham 组及 OVX+E2 组低, 而 sham 组高于 OVX+E2 组; 且差异均有统计学意义。见图 3-4、图 3-5、图 3-6。

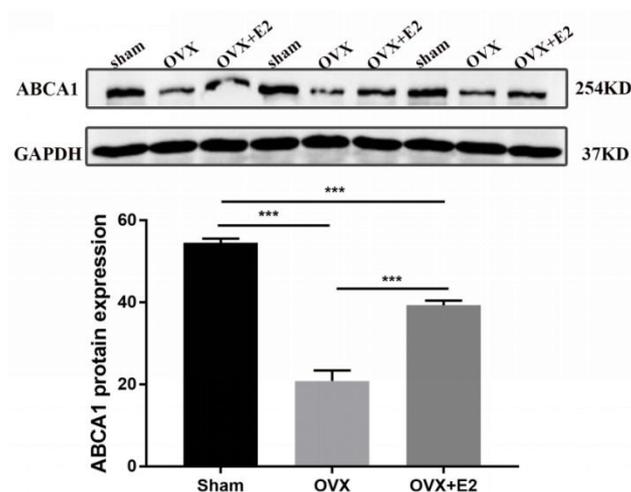


图 3-4 小鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达

Fig.3-4 ABCA1 Protein expression of mouse peritoneal macrophages

注: ***为 $P < 0.001$

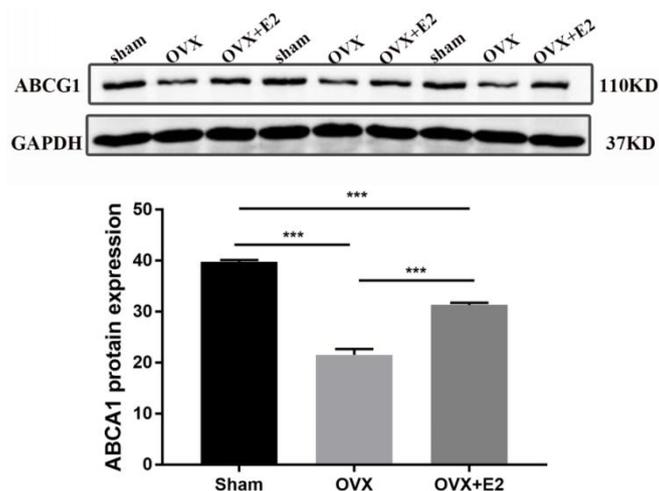


图 3-5 小鼠腹腔巨噬细胞 ABCG1 蛋白表达

Fig.3-5 ABCG1 Protein expression of mouse peritoneal macrophages

注: ***为 $P < 0.001$

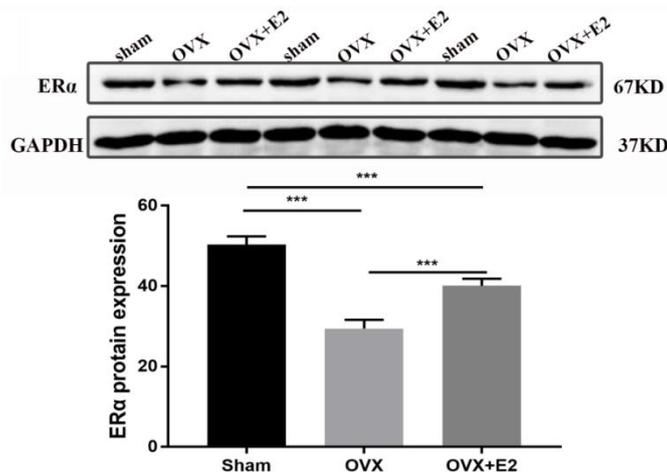


图 3-6 小鼠腹腔巨噬细胞 ERα 蛋白表达

Fig.3-6 ERα Protein expression of mouse peritoneal macrophages

注: ***为 $P < 0.001$

2.5 雌激素对小鼠冠状动脉内 ABCA1 表达的影响

以小鼠心脏冠状动脉做免疫组化切片, 检测三组冠状动脉内 ABCA1 的表达水平。结果可见, 在冠状动脉中有 ABCA1 的表达, 管腔内颗粒物为残留血细胞。其中 OVX 组 ABCA1 表达低于 sham 组和 OVX+E2 组, OVX+E2 组 ABCA1 的表达低于 sham 组。见图 3-7。

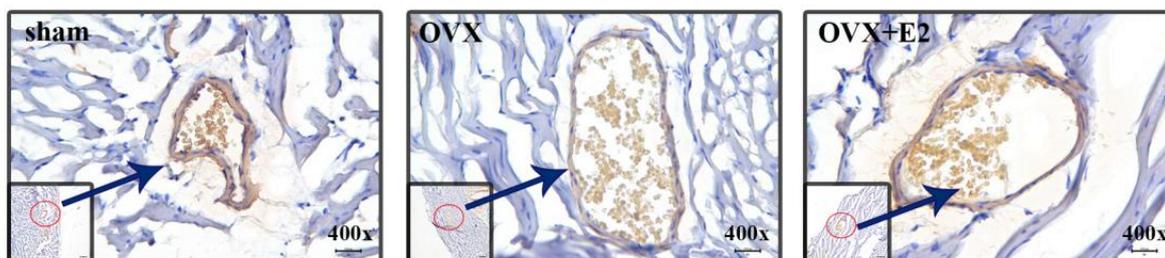


图 3-7 冠状动脉 ABCA1 免疫组化

Fig.3-7 Immunohistochemical study of ABCA1 in coronary artery

3 讨论

在本研究的结果中, 与既往卵巢切除小鼠 As 模型结果相同, 卵巢切除后的小鼠表现出更严重的主动脉 As 斑块, 给予雌二醇治疗的小鼠 As 严重程度相对较低。本研究还关注了三组小鼠的体重变化, 发现卵巢切除组的小鼠体重增加明显, 这考虑是雌激素对体内一系列代谢过程的影响结果。在对三组小鼠腹腔巨噬细胞蛋白水平检测中发现, 内源性雌激素缺乏后 ERα 的表达是下调的, 同时观察到, ABCA1、

ABCG1 的表达也表现出下调的趋势,这种变化在给予外源性雌二醇治疗组的小鼠中有所逆转。在对心脏冠状动脉免疫组化的结果分析中可见,小鼠心脏冠状动脉内存在 ABCA1 的表达,且在因卵巢切除后导致的内源性雌激素缺乏的小鼠中,ABCA1 在冠状动脉中的表达是下调的。由我们的实验结果可知,内源性雌激素对小鼠的体内 ABCA1 的表达是存在一定影响的,虽然外源性补充雌二醇可以在一定程度上减少对 ABCA1 的表达影响,但并不能完全抵消。

3.1 As 斑块的形成机制

As 的特征是斑块在动脉壁内积聚,这是一种由外膜、中膜和内膜组成的多层组织。动脉的最内层是一层内皮细胞,形成一个半透膜,调节分子的运输。内皮细胞产生的 NO 是一种有效的动脉扩张剂,可以促进血管舒张;此外内皮细胞还分泌前列环素,发挥抑制血小板聚集的作用。内膜的完整性对于防止 As 的发展至关重要,因为内皮细胞的损伤引起较大的颗粒如 LDL 进入内膜。在 As 中,胆固醇、脂类、钙和纤维蛋白在内膜中积聚,形成脂肪条纹,随着时间的推移而膨胀形成斑块,这导致了动脉重塑,管腔变窄,血流受限,导致输送到重要器官的氧气和营养物质减少^[229]。As 中膜由许多层维持血管张力的血管平滑肌细胞组成。在炎症状态和高胆固醇饮食下,由于血管平滑肌细胞从中膜迁移而产生新的内膜层,这一层被称为新生内膜,不仅包含血管平滑肌细胞,还包含泡沫细胞、巨噬细胞、胆固醇和钙晶体^[230]。这些细胞和分子共同形成斑块,当血管平滑肌细胞分泌细胞外基质 (ECM) 成分如弹性蛋白和胶原时,斑块可能会纤维化。这种 ECM 基质包裹着由巨噬细胞、ox-LDL、泡沫细胞以及合成的、衰老的和凋亡的血管平滑肌细胞组成的坏死核心。在 As 斑块中钙化越多,斑块的稳定性越好;血管平滑肌细胞也通过分泌胶原蛋白促进斑块的稳定性^[231]。然而,血管平滑肌细胞也会衰老,分泌炎症分子和金属蛋白酶 (MMP8、MMP9),导致 As 斑块不稳定,继而发生破裂以及血栓的形成^[229]。

3.2 CEC 与 As 炎症

HDL 的一个主要抗 As 特性被认为是其促进巨噬细胞泡沫细胞胆固醇流出的能力。此外,HDL 被描述为具有多种抗炎特性,包括其结合脂多糖、从低密度脂蛋白中去除氧化脂质以及携带使氧化磷脂失活的酶如血小板活化因子乙酰水解酶 (PAFAH) 和对氧磷酶 (PON) 的能力^[232]。HDL 及其载脂蛋白介导巨噬细胞胆固醇流出的能力在很大程度上取决于巨噬细胞 ABC 转运蛋白 ABCA1 和 ABCG1。ABCA1 促进胆固醇流出到贫脂的 ApoA-1,而 ABCG1 诱导胆固醇流出到 HDL 颗粒^[183]。因此,巨噬细胞逆向胆固醇转运的体内测量显示 ABCA1 和 ABCG1 的双重效应。造血细胞中 ABCA1 和 ABCG1 的基因敲除导致大量胆固醇酯在腹腔巨噬细胞中积累,器官中泡沫细胞显著积聚,As 形成加速。但是,令人惊讶的是在大多数研究中,将 ABCG1/骨髓移植到 As 易感受体中并没有导致 As 的改变或减少。这些观察表明,在 ABCG1

转运蛋白缺陷的巨噬细胞中积聚胆固醇、氧化固醇或其他脂质导致炎症基因表达增加^[187]。

脂质积累和炎症基因表达增加是 As 形成的中心事件，脂质积累与巨噬细胞炎症之间是存在一定联系的。研究表明，在暴露于脂多糖后，*ABCG1*^{-/-}和 *ABCA1*^{-/-}*ABCG1*^{-/-}的巨噬细胞中胆固醇的积累导致 TLR4 通过 MyD88/TRIF 的水平和信号的增加，以及炎症反应的增加。与 *ABCA1* 相比，*ABCG1* 在调节巨噬细胞炎症反应中具有更大的作用，并且当 *ABCG1* 缺乏时，*ABCA1* 具有补偿作用^[187]。这表明血浆和内质网膜中 FC 的负载导致对 TLR 配体的炎症反应增强。HDL 和 ApoA-1 通过 *ABCA1* 和 *ABCG1* 促进胆固醇外流的能力可能对这些先天性免疫反应有下调作用，也可能与 As 的炎症有关。*ABCA1*^{-/-}*ABCG1*^{-/-}巨噬细胞中通过 TLR2、3 和 4 增强的信号可能与造血细胞中这两种转运蛋白缺乏的小鼠的 As 加速有关。HDL 和 LXR 在抑制先天和获得性免疫反应中的作用，这是通过 *ABCA1* 和 *ABCG1* 促进胆固醇流出的结果^[187]。此外，*ABCG1*^{-/-}小鼠的巨噬细胞显示巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 的分泌增加，这两种细胞都是强嗜中性粒细胞趋化因子^[233]。因此推测在外周炎症刺激后，低 HDL 水平和低 *ABCG1* 活性的个体可能更容易受到病变中增强的炎症反应的影响，导致斑块不稳定。由此可知，HDL 是通过促进胆固醇由 *ABCG1* 流出的能力，进而抑制了局部的炎症反应，其中一部分是通过 *ABCA1* 的效应实现。从而抑制巨噬细胞泡沫细胞中的炎症和趋化因子反应，发挥抗 As 的特性

3.3 雌激素对体内脂肪分布的影响

在本研究中，卵巢切除组的小鼠表现出体重的增加，这与既往研究结果相同^[234, 235]。这考虑是雌激素对脂代谢的影响下的综合作用结果，包括新陈代谢的各个方面：脂肪量、脂肪分布、食欲、能量消耗、温度和葡萄糖稳态^[236, 237]。脂肪组织在新陈代谢中发挥的关键作用更多是被其导致的其他疾病而引起人们的重视：例如 CVD、胰岛素抵抗、高脂血症和肿瘤。除了作为能量储存库，脂肪组织还是控制食欲、葡萄糖平衡、胰岛素敏感性、衰老等内分泌器官^[238, 239]。既往研究已经证明，相对于内脏脂肪，皮下脂肪更有利于代谢健康^[240]。女性的总脂肪和皮下脂肪往往比男性多，这种雌激素依赖的女性脂肪分布模式被认为是代谢保护性的，因为男性内脏脂肪的增加与代谢紊乱有关^[241, 242]。在第一部分我们研究结果表明，在年轻女性 CHD 患者 BMI 高于对照组，ER α mRNA 低于对照组，这可能是雌激素对脂肪分布调节功能减弱后的结果。针对低雌激素状态的 PCOS 患者研究表明，与对照组相比，PCOS 患者 CHD 和卒中的合并相对风险为 2.02 (95%置信区间, 1.47-2.76)，当仅限于对体重指数进行调整的两项研究时，相对风险降至 1.55 (95%置信区间, 1.27-1.89)^[64]。这提示我们脂肪对女性心血管风险的重要性，BMI 可能在不同雌激素水平下呈现脂肪的分布

和质量的差异，这对女性低雌激素水平导致的脂肪含量增加提供了一个潜在的治疗途径。

肥胖被称为全身炎症性疾病，包括脂质在血管内的沉积也会引起血管内皮的炎症反应，而肥胖更多是白色脂肪（white adipose tissue, WAT）积累的结果^[243, 244]。研究表明，雌激素和 ER 在脂肪分化和脂肪分布中起着至关重要的作用，如女性绝经期间雌激素减少与内脏脂肪组织质量增加相关^[245]。围绝经期不同的激素水平意味着不同的脂肪分化及分布的调节程度，此外，脂肪重分布背景下也会意味着不同的各项血脂指标的变化。一项针对女性的回顾性研究结果显示^[246]，在 BMI < 25 kg/m² 围绝经期的女性中，TC 水平升高明显，但 ApoA1 的水平无显著变化；BMI ≥ 25 kg/m² 的女性中，TC 和 LDL-c 升高，HDL-c 降低，TC 水平变化不显著；BMI ≥ 25 kg/m² 与 BMI < 25 kg/m² 的两组女性相比，仅 ApoA1 和 TG 的水平有显著性差异。这充分说明了脂肪质量不同的背后是机体血脂成分的变化，这也可能是在围绝经期女性心血管评估研究结果差异的一个可能因素，激素水平可能在无外在干预条件下是维持在一定的水平，但 BMI 是会因个体运动、饮食等的差异存在显著差异的。在分析相关的 CVD 风险时，就很难将雌激素和 BMI 之间的的共性显现出来。体内的白色脂肪是脂质和能量储存的主要形式，成年人少量棕色脂肪的存在，主要功能是消耗能量和产生热量。还有研究表明，ER α 可以控制脂肪祖细胞的分化方向，决定分化为 WAT 或棕色脂肪谱系，OVX 可以改变脂肪祖细胞增殖和数量。与内脏组织相比，在皮下组织中缺乏 ER α 具有更有害的结果，这与 ER α 在皮下脂肪中的更高表达一致^[247]。雌激素通过 ER α 调节女性体内的脂肪分布，当这种调节功能改变后，会导致脂肪的重分布以及脂肪祖细胞的分化方向。皮下脂肪组织比内脏脂肪组织更容易发生肥胖引起的结构变化，这可能是由于皮下脂肪组织含有较少的棕色脂肪组织所致^[248]。总之，这些发现表明 ER α 在细胞内以一种与普遍代谢性疾病相关的方式自主调节脂肪谱系以及全身代谢。

3.4 RCT

RCT 是去除胆固醇的主要途径，因此是维持细胞胆固醇稳态的重要机制。巨噬细胞的胆固醇外流可通过由 ABCA1 和/或 ABCG1 介导的单向 ATP 依赖性途径以及由 SR-BI 介导的双向 ATP 非依赖性途径发生。胆固醇的外流也可以通过一个梯度依赖过程中的受体非依赖性胆固醇扩散发生，该过程占总胆固醇外流的 30%^[249]。胆固醇负荷后，参与 RCT 的蛋白质上调，特别是对 ox-LDL 中的氧化甾醇的反应，最重要的内源性氧化甾醇由胆固醇在细胞内产生。这些氧化甾醇是 LXR α 和 β 的内源性配体，LXR 与维甲酸 X 受体 (RXRs) 异二聚，并与 ABCA1 和 ABCG1 启动子区域的 DR-4 序列相互作用以诱导转录。在巨噬细胞中，氧化甾醇不仅刺激胆固醇外流，而且抑制促炎症信号级联，增强细胞外排能力，促进存活，所有这些都抵消了病变进展。

ABCA1 的上调致使 RCT 的启动,介导 FC 和磷脂从动脉巨噬细胞向细胞外受体 apoA-I 的流出。成熟的 HDL 通过 ABCG1 促进巨噬细胞胆固醇外流,ABCG1 的另一个重要作用是通过激活 AMPK 促进促凋亡的氧化甾醇 7-酮胆固醇(7KC)从外周细胞流出^[250]。这是一个重要的功能,因为 7-KC 以及 27-羟基胆固醇是 As 病变中发现的主要氧化甾醇。

去除外周组织中的胆固醇后, HDL 返回肝脏, TG 和磷脂的含量被肝脏脂肪酶水解,形成小的 HDL,被肝脏中存在的 SR-BI 吸收。将胆固醇输送到肝脏的另一种途径是胆固醇酯转移蛋白(CETP),它介导 CE 和 TG 在血浆脂蛋白之间的双向转移。因此, CETP 将胆固醇从高密度脂蛋白转移到富含 ApoB 的颗粒,这些颗粒将通过 B/E 受体进一步传递到肝脏。CETP 结构呈现疏水性隧道,在 N-和 C-末端结构域中具有开口,其中容纳磷脂。磷脂的两亲性增加了蛋白质与水环境的相容性。因此, CETP 可以在脂蛋白之间进行脂质交换,因为通道的两端可以接受来自供体脂蛋白颗粒的中性脂质并将其传递给受体^[251]。

最后,胆固醇也通过富含 ApoB 的颗粒输送到肝脏的 LDLR,酯化的胆固醇将被胆固醇酯水解酶水解并排泄到胆汁中。胆固醇排泄的另一种途径是非胆道途径,称为经肠胆固醇排泄(TICE),它对人体中性固醇排泄有显著贡献。基底外侧膜肠上皮细胞从血浆脂蛋白摄取胆固醇和 ABCG5/G8 排泄胆固醇是 TICE 的主要途径。关于肠道胆固醇摄取的最公认的方面与定位于肠细胞基底外侧的 LDLR 的存在有关。一些研究调查了 HDL 在这个过程中作用,结果似乎有争议。在胆汁分流和肠道插管后对小鼠进行的一项研究表明, HDL 和 LDL 都能在空肠基底外侧膜为 TICE 输送胆固醇^[252]。在这项研究中,他汀类药物增加了 TICE 活性,而参与 LDLR 降解的蛋白 PCSK9 降低了 TICE 活性,强调了这种受体与 TICE 的相关性。基底外侧膜肠细胞摄取胆固醇的作用仍有待阐明。

3.5 雌激素缺乏对胆固醇外排的影响

雌激素缺乏对年轻女性的作用机制在患有 PCOS 患者中得到了很好的研究。已有研究发现, PCOS 患者与同年龄的女性表现出更多的脂质代谢紊乱以及胰岛素抵抗以及心血管风险增加。其中一项平均年龄在 28 岁的 PCOS 患者胆固醇流出能力的研究显示, PCOS 患者在脂代谢上表现出 TG 水平较高,但 HDL-c 和 LDL-c 的平均水平在两组中相似, apoA1 的水平明显较低^[64]。在体外胆固醇流出试验评估了 HDL-c 的功能结果发现,尽管 HDL-c 水平相似,但与对照组相比,病例的胆固醇流出能力显著降低。在多变量回归模型中, PCOS 状态与 HDL-c 外排能力降低显著相关。在一项检查性别对外排能力影响的研究中,血清雌二醇水平与胆固醇外排能力无关^[253]。

本研究结果显示, OVX 组小鼠主动脉根部斑块面积明显高于 sham 组和 OVX+E2

组,表明雌激素对 As 进展是明确有保护作用的。此外,在冠状动脉中,OVX 组 ABCA1 的表达低于其他两组,在 OVX+E2 组 ABCA1 的表达是低于 sham 组、高于 OVX 组。巨噬细胞源泡沫细胞是 As 斑块的主要组成成分,说明在动物体内,雌激素对 As 斑块内巨噬细胞中 ABCA1 的表达可能也存在正向的调节关系。研究表明 ABCA1 介导的外排是调节 As 严重程度的重要外排方式^[254]。此外,在 HDL-c 水平相似的人中,巨噬细胞特异性胆固醇外流的差异仅由 ABCA1 介导的外排引起,而不是由其他转运蛋白引起^[255]。本研究中小鼠腹腔巨噬细胞中,三组小鼠的 ABCA1 蛋白也表现出差异,OVX 组低于 sham 以及 OVX+E2 组,这表明在体内环境下,雌激素对巨噬细胞 ABCA1 依然存在正向的调节作用。

ABCA1 被广泛地表达在全身,在巨噬细胞中具有特别重要的作用,它能促进过量胆固醇的清除,从而抑制其转化为泡沫细胞并防止 As 的进展^[256]。此外有研究表明,与 WT 巨噬细胞对 LPS 的反应相比,ABCA1^{-/-}的巨噬细胞在 LPS 的刺激下,炎症和趋化因子的基因表达增强,表明 ABCA1 还具有减轻巨噬细胞的炎症刺激反应^[257]。这可能与 FC 的含量相关,胆固醇结晶可以激活 NLRP3 炎性小体,激活内质网途径的炎症反应。也有研究认为,NLRP3 炎症体诱导的 IL-1 β 通过下调控制 ABCA1 表达的 Gpr109a 受体来抑制 ABCA1 介导的胆固醇外流^[258]。通过在卵巢切除在小鼠体内达到最大程度降低雌激素作用,我们的结果证实即使在体内,雌激素对巨噬细胞中 ABCA1 的表达也是存在正向调节的,同时雌激素的缺失会导致主动脉内斑块增加,冠状动脉内 ABCA1 表达减少。

3.6 雌激素对肝脏胆固醇代谢的作用及机制

肝脏在脂肪酸和胆固醇代谢的调节中起着独特的核心作用。肝脏是雌激素的主要靶标之一,ER 的转录活性与生殖周期密切相关。研究表明雌激素通过减少肝脏脂质合成并增加 TG 的转运参与了肝脏脂肪沉积的预防^[259]。但绝经和卵巢切除术后与 CVD 的关系仍不清楚。一项针对雌激素在肝脏脂质代谢的特异性功能研究,通过条件性敲除小鼠肝脏 ER α 发现,卵巢雌激素可以周期性的调节肝脏胆固醇代谢,这是雌激素与 ER α 对参与胆固醇流出的 HDL 颗粒大小和功能的周期性调节的作用;此外,研究表明 LXR α 与 ER α 之间存在功能性相互作用,可能是为了更好地使肝脏脂质代谢适应生殖功能的需要^[208]。

目前的研究表明,在肝脏中 ER α 是 LXR α 发挥转录活性的重要因素,这是通过 LXR α 靶基因启动子/增强子区的两个受体的相互作用实现的。在小鼠体内实验中,体内高内源性雌激素时期时,ER α 与 LXR α 的相互作用,促进 LXR α 的转录活性,同时产生小的 HDL 颗粒;在体内低雌激素时期时,ER α 与 DNA 的结合能力显著减弱,导致 LXR α 的转录活性降低,同时产生大的 HDL 颗粒^[208]。虽然在另外一些体外实验中结果并不完全一致,比如,有研究结果显示肝 ER α 通过与 SREBP-1c 启动子上的

LXR α 的功能性相互作用抑制脂质合成^[260]。但这种调节是取决于雌激素化合物的性质、浓度和给药方式^[261, 262]。但这正说明了这两种核受体间存在多种可能的相互作用模式，这与配体雌激素的浓度是存在关联性的。体内研究中更能体现完整的生理过程导致的结果，尤其是对于女性存在长期和短期的雌激素水平的规律或不规律的变动，因为在发育、怀孕和哺乳期间，肝脏脂质代谢适应生殖系统的需要所必需的变异程度。先前的研究表明，ER α 转录效率对激素剂量非常敏感，并且，取决于其浓度，相同的配体可以诱导相反的效应^[263, 264]。有生育能力的雌性小鼠中，HDL 周期性地经历显著的结构和功能重塑，这是肝脏 ER α 依赖性的，并导致 HDL 颗粒的大小改变和促进 CH 流出的能力增加，这种效应可能是由编码 HDL 重塑酶或特异性载脂蛋白的基因的 ER α 依赖性调节引起的^[208]。卵巢活性的降低，雌激素对 HDL 的功能及大小的调节被破坏，可以导致肝脏和外周胆固醇的沉积，这也可能解释了 50 岁以下人群中肝脏和 CVD 的性别差异。男性在肝脏中表达极少量的 ER α ，与女性不同，他们不会定期合成超高效的 HDL，从而增加男性对与脂质代谢相关的疾病的易感性。肝脏对卵巢分泌雌激素的强烈依赖性的 CH 和脂蛋白代谢受到雌激素丢失的严重影响，以及为什么妇女在生育期似乎对脂肪肝疾病/NAFLD 和 CVD 有保护作用，绝经后早期这些疾病的发病率增加^[208]。

3.7 巨噬细胞胆固醇代谢在 AS 发展中的作用机制

AS 斑块是由循环中驻留在损伤内皮部位的单核巨噬细胞，吞噬过多的修饰的 LDL 后衍生为泡沫细胞，大量泡沫细胞在内皮细胞下聚集形成的。巨噬细胞的炎症、凋亡影响着斑块的进展和稳定性，而巨噬细胞内过载的胆固醇是触发细胞炎症、凋亡的重要因素之一。

首先 ox-LDL 作为胆固醇的主要载体，可以诱导巨噬细胞向促炎型巨噬细胞转化，引起局部血管的炎症。一方面巨噬细胞通过 SR（主要是 CD36）摄取 ox-LDL 后，在溶酶体中水解后形成胆固醇结晶，胆固醇结晶可破坏溶酶体稳定性，使其释放内容物，最终激活 NLRP3 炎症小体；另一方面，Toll 样受体 4-6（TLR4-TLR6）异二聚体与配体结合后，在 CD36 的协同作用下激活 NF- κ B，并上调 NLRP3 的表达和刺激 IL-1 β 前体合成，NLRP3 炎症小体形成后激活 caspase-1，促进 IL-1 β 前体的成熟和分泌，参与炎症反应^[265, 266]。以上途径构成了巨噬细胞参与 AS 炎症的主要机制，但并不限于此。引起炎症发生的因素会促进 AS 病变的进展，相反，抑制炎症过程也可有效的预防或逆转 AS 斑块。例如参与胆固醇代谢的 LXR 被证明可通过提高 ABCA1、ABCG1 的表达和抑制 NF- κ B 的磷酸化，促进促炎的 M1 巨噬细胞转化为抗炎的 M2 巨噬细胞，增强脂质代谢的同时减轻 AS 斑块的炎症反应^[267]。

其次，内质网是胆固醇诱导巨噬细胞毒性的部位，而内质网应激（主要是未折叠蛋白反应，UPR）是巨噬细胞凋亡的关键程序。UPR 在正常生理学中起到纠正 ER

功能不平衡的作用，但当 ER 应激长期存在时，UPR 的效应器 C/EBP 同源蛋白表达上调，随后其下游的钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMKII) 作为触发细胞凋亡的关键分子，可激活 Fas、线粒体凋亡、STAT1 来实现细胞凋亡^[268, 269]。虽然在体外研究的细胞模型中，内质网应激会导致细胞凋亡的发生，但在体内复杂环境中，单独的内质网应激不能引发细胞凋亡，但明显的增加了巨噬细胞对其他凋亡刺激的易感性。在胆固醇负荷模型中，内质网应激被确定为驱动 FC 诱导的细胞死亡的机制^[270]。研究表明，内质网应激反应途径的激活是小鼠和人类 As 病变中富含脂质的巨噬细胞的特征，并被认为在斑块易损性和急性心源性死亡中起作用^[271, 272]。尚不清楚巨噬细胞中过量胆固醇的积累如何参与内质网应激反应途径，有研究认为，细胞内的脂质伴侣脂肪酸结合蛋白-4 (aP2) 是脂质诱导巨噬细胞内质网应激的主要调节因子^[273]。因此，内质网是一种重要的靶器官，可感知细胞内脂质状态的应激^[274]。然而，连接内质网功能、脂质代谢和生理结果的具体机制尚不清楚。

在 As 晚期斑块内，巨噬细胞的凋亡是引起稳定斑块向易损斑块转变、诱发斑块破裂的主要原因。易损斑块破裂是冠状动脉血栓形成的主要原因，常包含大的富含脂质的坏死核心，其表面覆盖的纤维帽变薄，这些斑块微结构特征是导致急性冠脉综合征的易损病变的重要标志。巨噬细胞凋亡在 AS 的全程均会发生，但在斑块形成的早期阶段，细胞凋亡可以在有效的清除作用下，延缓斑块病变的进展；在晚期斑块中，坏死核心源于巨噬细胞的凋亡以及凋亡细胞的吞噬清除功能不全的共同存在作用。通过对巨噬细胞凋亡的调控可作为一种治疗策略，旨在防止斑块向易损斑块进展，而不是预防 AS 本身。

4 小结

4.1 内源性雌激素缺失会导致雌性小鼠体重增加；

4.2 内源性雌激素缺失可以增加雌性小鼠主动脉内动脉粥样硬化斑块面积，同时减少冠状动脉内 ABCA1 的表达，补充雌二醇可以在一定程度上延缓因内源性雌激素缺失引起的动脉粥样硬化，上调 ABCA1 的表达；

4.3 内源性雌激素缺失的雌性小鼠巨噬细胞内 ABCA1、ABCG1、ER α 表达下降，补充雌二醇可以改善这种作用，但不能完全矫正。

结 论

本研究通过对年轻女性冠心病人群数据分析及相关指标检测，随后在细胞和动物水平研究雌激素对胆固醇外流的影响及作用机制，总结结果如下：

1. 年轻女性 CHD 表现出高 BMI、高血压和糖尿病合并率；以及高 TG，低 HDL-c，这在未绝经的年轻女性中更为明显。ESR1 和 ABCA1 mRNA 具有良好的相关性，且在年轻女性 CHD 患者中两者表达均降低。年龄、高血压、糖尿病、TC、BMI 是年轻女性 CHD 的独立危险因素。

2. 雌二醇能促进小鼠单核巨噬细胞 J774A.1 胆固醇外流，减少巨噬细胞源泡沫细胞内脂滴的形成；这是通过雌二醇与 ER α 结合后对 ABCA1 的正向调控实现的，独立于 LXR α 对 ABCA1 的调控作用。

3. 内源性雌激素缺失会导致雌性小鼠体重增加，主动脉粥样硬化斑块面积增加，冠状动脉内 ABCA1 减少；补充雌二醇可以在一定程度上延缓小鼠因内源性雌激素缺失引起的动脉粥样硬化，这部分原因是通过上调 ABCA1 实现的。

4. 内源性雌激素缺失的雌性小鼠巨噬细胞内 ABCA1、ABCG1、ER α 表达下降，补充雌二醇可以改善这种作用，但不能完全矫正。

本研究的创新之处：

目前对年轻女性冠心病的研究较少，本课题从临床问题出发，检测年轻女性冠心病 ER、RCT 相关基因差异性；通过体内、体外实验的机制研究，证实了雌激素/ER α 对胆固醇外流基因的调节作用。

ER α 在巨噬细胞的胆固醇流出中的功能尚不明确，作为雌激素依赖的核受体超家族成员，通过对 ER 功能作用的研究，可进一步明确雌激素在 As 形成和发展中的作用机制，为女性冠心病的诊疗提供新的可能策略，达到精准治疗的效果。

本研究的不足之处：

本研究选用的 J774A.1 细胞已被证明有 ABCA1 的表达，因此实验中选择其作为主要的研究对象，此外单核巨噬细胞还有 THP-1、RAW264.7 以及原代细胞，由于细胞来源不同，也会存在不同的功能差异，在不同细胞中平行验证也是必要的。

ER α 作为核受体转录因子，如考虑其对 ABCA1 的转录调控，需进一步行 EMSA、Luciferase 或 ChIP 实验进一步验证两者的直接结合，本研究中并未证明两者的直接结合位点。

参考文献

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2015,131:e29-e322.
- [2] Semachew A. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019[J]. *The American Journal of Cardiology*, 2020, 76(25):2982-3021.
- [3] Kyle JF, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories[J]. *The Lancet*, 2018, 392(10159):0140-6736.
- [4] Haijiang D, Abu M A, Elad M, et al. Global, regional, and national burden of ischaemic heart disease and its attributable risk factors, 1990-2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *European Heart Journal-Quality of Care and Clinical Outcomes*, 2020, 10(0):1-11.
- [5] 中国心血管健康与疾病报告编写组, 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. *中国循环杂志* 2020, 35(09): 833-854.
- [6] Zhang Q, Zhao D, Xie W, et al. Recent trends in hospitalization for acute myocardial infarction in Beijing: increasing overall burden and a transition from ST-segment elevation to non-ST-segment elevation myocardial infarction in a population-based study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(5): e2677.
- [7] Eliasson B, Cederholm J, Eeg-Olofsson K, et al. Clinical Usefulness of Different Lipid Measures for Prediction of Coronary Heart Disease in Type 2 Diabetes A report from the Swedish National Diabetes Register[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(9):2095-100.
- [8] Heresi G A, Aytakin M, Newman J, et al. Plasma Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol and Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010,182(5):661-668.
- [9] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [10] Zhang X, Liu J, Wang M, et al. Twenty-year epidemiologic study on LDL-C levels

- in relation to the risks of atherosclerotic event, hemorrhagic stroke, and cancer death among young and middle-aged population in China[J]. *J Clin Lipidol*, 2018, 12(5): 1179-1189 e4.
- [11] Zhang M, Deng Q, Wang L, et al. Prevalence of dyslipidemia and achievement of low-density lipoprotein cholesterol targets in Chinese adults: a nationally representative survey of 163, 641 adults[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 260: 196-203.
- [12] Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(15):5374-5379.
- [13] Kunjathoor V V, Febbraio M, Podrez E A, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51):49982-49988.
- [14] Hashimoto R, Kakigi R, Miyamoto Y, et al. JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 871:172940.
- [15] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma[J]. *Cell*, 1998, 93:229-240.
- [16] Manning-Tobin J J, Moore K J, Seimon T A, et al. Loss of SR-A and CD36 Activity Reduces Atherosclerotic Lesion Complexity Without Abrogating Foam Cell Formation in Hyperlipidemic Mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(1):19-26.
- [17] Yang L, Yang JB, Chen J, et al. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone[J]. *Cell Res*, 2004, 14(4): 315-323.
- [18] Nguyen T M, Sawyer J K, Kelley K L, et al. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(1): 95-104.
- [19] Yang JB, Duan ZJ, Yao W, et al. Synergistic transcriptional activation of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 gene by interferon-gamma and all-trans-retinoic acid THP-1 cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 20989-20998.
- [20] Patel P J, Khera A V, Wilensky R L, et al. Anti-oxidative and cholesterol efflux capacities of high-density lipoprotein are reduced in ischaemic cardiomyopathy[J]. *European Journal of Heart Failure*, 2013, 15(11):1215-1219.

- [21] Moreno P R, Sanz J, Fuster V, et al. Promoting mechanisms of vascular health: circulating progenitor cells, angiogenesis, and reverse cholesterol transport[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, 53(25):2315-2323.
- [22] Rohatgi A, Khera A, Berry J D, et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events[J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(25): 1871-1872.
- [23] Lake N J, Taylor R L, Hugh T, et al. TRAK2, a novel regulator of ABCA1 expression, cholesterol efflux and HDL biogenesis[J]. *EUR HEART J*, 2017, 38(48):3579-3587.
- [24] Sallam T, Jones M, Thomas B J, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA[J]. *Nat Med*, 2018, 24(3): 304-312.
- [25] Towfighi A, Zheng L, Ovbiagele B. Sex-specific trends in midlife coronary heart disease risk and prevalence[J]. *Arch Intern Med*, 2009, 169:1762-6.
- [26] Kalin MF, Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies[J]. *Steroids*. 1990, 55(8):330-52.
- [27] Crandall CJ, Barrett CE. Endogenous sex steroid levels and cardiovascular disease in relation to the menopause: a systematic review[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013, 42:227-53.
- [28] Andromachi V, Athanasios P, Anna T, et al. Association of Hyperandrogenemic and Metabolic Phenotype with Carotid Intima-Media Thickness in Young Women with Polycystic Ovary Syndrome[J]. *Clin Endocrinol Metab*. 2005,90(5):2740-2746.
- [29] Legro R S. Polycystic Ovary Syndrome and Cardiovascular Disease: A Premature Association[J]. *Endocrine Reviews*. 2003, 24(3):302-312.
- [30] Maturana M A, Breda V, Lhullier F, et al. Relationship between endogenous testosterone and cardiovascular risk in early postmenopausal women[J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2008, 57(7):961-965.
- [31] Fowkes FG, Pell JP, Donnan PT, et al. Sex differences in susceptibility to etiologic factors for peripheral atherosclerosis. Importance of plasma fibrinogen and blood viscosity[J]. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(6):862-868.
- [32] Wingard DL, Suarez L, Barrett-Connor E. The sex differential in mortality from all causes and ischemic heart disease[J]. *Am J Epidemiol*. 1983; 117(2):165-172.
- [33] Isles CG, Hole DJ, Hawthorne VM, et al. Relation between coronary risk and

- coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men[J]. *Lancet*. 1992;339(8795):702-706.
- [34] Olson MB, Kelsey SF, Matthews K, et al. Symptoms, myocardial ischaemia and quality of life in women: Results from the NHLBI-sponsored WISE Study[J]. *Eur. Heart J*. 2003; 24:1506-1514.
- [35] Berger JS, Elliott L, Gallup D, et al. Sex differences in mortality following acute coronary syndromes[J]. *JAMA*. 2009, 302: 874-882.
- [36] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarctions[J]. *Circulation*, 2012, 126: 2020-2035.
- [37] Robinson J G, Wallace R, Limacher M, et al. Cardiovascular Risk in Women With Non-Specific Chest Pain (from the Women's Health Initiative Hormone Trials)[J]. *American Journal of Cardiology*. 2008, 102(6):693-699.
- [38] Wedekind H, Mller K, Scholz K H. Tako-tsubo cardiomyopathy. Incidence in patients with acute coronary syndrome[J]. *Herz*, 2006, 31(4):339-346.
- [39] Vaccarino V, Parsons L, Every NR, et al. Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. National Registry of Myocardial Infarction 2 Participants[J]. *N Engl J Med*. 1999, 341: 217-225.
- [40] Wong SC, Sleeper LA, Monrad ES, et al. Absence of gender differences in clinical outcomes in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. A report from the SHOCK Trial Registry[J]. *J Am Coll Cardiol*. 2001, 38: 1395-1401.
- [41] Miric L, Miric D, Duplancic D, et al. Specific and gender differences between hospitalized and out of hospital mortality due to myocardial infarction[J]. *Coll Antropol*. 2008, 32(2): 361-367.
- [42] Honda S, Asaumi Y, Yamane T, et al. Trends in the Clinical and Pathological Characteristics of Cardiac Rupture in Patients With Acute Myocardial Infarction Over 35 Years[J]. *Journal of Cardiac Failure*. 2014, 3(5): e000984.
- [43] Chandra NC, Ziegelstein RC, Rogers WJ, et al. Observations of the treatment of women in the United States with myocardial infarction: a report from the National Registry of Myocardial Infarction-I[J]. *Archives of Internal Medicine*, 1998, 158(9): 981-988.
- [44] Lam CS, McEntegart M, Claggett B, et al. Sex differences in clinical characteristics and outcomes after myocardial infarction: insights from the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT)[J]. *Eur J Heart Fail*.

- 2015, 17: 301-312.
- [45] Madhavan M, Friedman PA, Lennon R J, et al. Implantable Cardioverter-Defibrillator Therapy in Patients With Ventricular Fibrillation out of Hospital Cardiac Arrest Secondary to Acute Coronary Syndrome[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2015. 4(2): 1-9.
- [46] Kyto V, Sipila J, Rautava P. Gender and In-hospital Mortality of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (from a Multihospital Nationwide Registry Study of 31, 689 Patients)[J]. *American Journal of Cardiology*, 2015, 115(3):303-306.
- [47] Kwon Y, Duprez D A, Jacobs D R, et al. Obstructive Sleep Apnea and Progression of Coronary Artery Calcium: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Study[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2014, 3(5):e001241-e001241.
- [48] Shufelt, C L. Sex-Specific Physiology and Cardiovascular Disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 018, 1065: 433-454.
- [49] Mnatzaganian G, Hiller JE, Braitberg G, et al. Sex disparities in the assessment and outcomes of chest pain presentations in emergency departments[J]. *Heart*, 2019, 25:1355-6037.
- [50] Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts[J]. *Nat. Genet*, 2009; 41:47-55.
- [51] Liu X, Chen Y, Boucher N L, et al. Prevalence and change of central obesity among US Asian adults: NHANES 2011-2014[J]. *BMC Public Health*, 2017, 17(1):678.
- [52] Zhang X, Cheng Q, Wang Y, et al. Hedgehog signaling in bone regulates whole-body energy metabolism through a bone-adipose endocrine relay mediated by PTHrP and adiponectin[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2017. 24(2): 225-237.
- [53] Semenkovich C F, Ostlund R E. Estrogens induce low-density lipoprotein receptor activity and decrease intracellular cholesterol in human hepatoma cell line Hep G2[J]. *Biochemistry*, 1987, 26(16):4987-4992.
- [54] De Marinis E, Martini C, Trentalance A, Pallottini V. Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Endocrinol*, 2008, 198(3):635-643.
- [55] Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, et al. Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling[J]. *Science Signaling*, 2013, 6(276):ra36.
- [56] Kushwaha R S, Hazzard W R, Gagne C, et al. Type III hyperlipoproteinemia:

- paradoxical hypolipidemic response to estrogen[J]. *Annals of internal medicine*, 1977, 87(5):517-125.
- [57] Ma P T, Yamamoto T, Goldstein J L, et al. Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 alpha-ethinyl estradiol[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83(3):792-796.
- [58] Croce L D, Bruscalupi G, Trentalance A. Independent Behavior of Rat Liver LDL Receptor and HMGCoA Reductase under Estrogen Treatment[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1996, 224(2):345.
- [59] Starr A E, Lemieux, Valérie, Noad J, et al. β - Estradiol results in a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 - dependent increase in low - density lipoprotein receptor levels in human hepatic HuH7 cells[J]. *Febs Journal*, 2015,282(14):2682-2696.
- [60] Sharma G, Mauvais-Jarvis F, Prossnitz ER. Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation[J]. *Steroid Biochem Mol Biol*. 2018,2(176): 31-37.
- [61] Nilsson B O, Olde B, Leeb-Lundberg L M F. G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30: A new player in cardiovascular and metabolic oestrogenic signalling[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 163(6):1131-1139.
- [62] Meyer M R, Fredette N C, Howard T A, et al. G Protein-coupled Estrogen Receptor Protects from Atherosclerosis[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:7564.
- [63] Badeau R M, Metso J, Kovanen P T, et al. The impact of gender and serum estradiol levels on HDL - mediated reverse cholesterol transport[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2013, 43(4):317-323.
- [64] Andrea R, Jennifer H, Samantha B, et al. Decreased cholesterol efflux capacity and atherogenic lipid profile in young women with PCOS[J]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014, 99(5):841-7.
- [65] Ulloa N, Arteaga E, Bustos P, et al. Sequential estrogen-progestin replacement therapy in healthy postmenopausal women: effects on cholesterol efflux capacity and key proteins regulating high-density lipoprotein levels[J]. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2002, 51(11):1410-1417.
- [66] Lopez D, McLean MP. Estrogen regulation of the scavenger receptor class B gene: Anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 247(1):22-33.
- [67] Fukata Y, Y u X, Imachi H, et al. 17beta-Estradiol regulates scavenger receptor

- class BI gene expression via protein kinase C in vascular endothelial cells[J]. *Endocrine*, 2014, 46(3):644-650.
- [68] Wilmot KA, O'Flaherty M, Capewell S, et al. Coronary heart disease mortality declines in the united states from 1979 through 2011:evidence for stagnation in young adults, especially women[J]. *Circulation*, 2015, 132(11):997-1002.
- [69] Dolor RJ, Patel MR, Melloni C, et al. Treatment strategies for women with coronary artery disease:future research needs:identification of future research needs from comparative effectiveness review No. 66[internet]. 2013.
- [70] Anderson M L, Peterson E D, Brennan J M, et al. Short-and long-term outcomes of coronary stenting in women versus men: results from the National Cardiovascular Data Registry Centers for Medicare & Medicaid services cohort[J]. *Circulation*, 2012, 126(18):2190.
- [71] Price J F, Lee A J, Fowkes F G R, et al. Influence of High-Density Lipoprotein Cholesterol and Rheological Factors on the Sex Difference in Cardiovascular Disease[J]. *European Journal of Cardiovascular Risk*, 2000, 7(1):49-56.
- [72] Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto j, et al. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease:a prospective follow-up study of 14786 middle-aged men and women in Finland[J]. *Circulation*, 1999, (99) : 1165-1172.
- [73] Yancey, P. G. Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2003, 23(5):712.
- [74] Ilaria, Zanotti, Matteo, et al. Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo[J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011, 31(1):74-80.
- [75] Bartelt A, John C, Schaltenberg N, et al. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport[J]. *Nature Communications*, 2017, 8:15010.
- [76] Anna V. Mathew, Lei Li, Jaeman Byun, et al. Therapeutic Lifestyle Changes Improve HDL Function by Inhibiting Myeloperoxidase-Mediated Oxidation in Patients With Metabolic Syndrome[J]. *Diabetes Care*. 2018, 41(11): 2431-2437.
- [77] Benjamin EJ, Muntner, Alonso A, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2019, 139: e56-528.
- [78] 刘明波, 王文, 周脉耕. 2004-2010年中国心血管病死亡流行趋势分析[J]. *中华*

- 流行病学杂志, 2013, 034(010):985-988.
- [79] Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, 57(12):1404-1423.
- [80] 中国女性心血管疾病预防专家共识组. 中国女性心血管疾病预防专家共识[J]. *中国心血管病研究*, 2012, 10(5):321-328.
- [81] 中国医师协会心血管内科医师分会女医师工作委员会, 中华医学会心血管病学分会女性心脏健康学组. 中国女性心血管疾病预防专家共识[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(6):472-476.
- [82] Cho L, Davis M, Elgendy I, et al. Summary of Updated Recommendations for Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Women[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2020, 75(20):2602-2618.
- [83] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952.
- [84] Rosano GM, Vitale C, Marazzi G, et al. Menopause and cardiovascular disease: the evidence[J]. *Climacteric*, 2007, 10 (1):19-24.
- [85] B Cassou L, Mandereau P, Aegerter A, et al. Work-related Factors Associated with Age at Natural Menopause in a Generation of French Gainfully Employed Women[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2007, 166(4):429-438.
- [86] Minissian MB, Kilpatrick S, Eastwood J-A, et al. Association of spontaneous preterm delivery and future maternal cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2018;137:865-71.
- [87] Bellamy L, Casas J P, Hingorani A D, et al. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis[J]. *Bmj British Medical Journal*, 2007, 335(7627):974-977.
- [88] Haas DM, Parker CB, Marsh DJ, et al. Association of adverse pregnancy outcomes with hypertension 2 to 7 years postpartum[J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8:e013092.
- [89] ACOG Practice Bulletin No. 212: Pregnancy and Heart Disease[J]. *Obstetrics & Gynecology*, 2019.
- [90] Tooher J, Thornton C, Makris A, et al. All hypertensive disorders of pregnancy increase the risk of future cardiovascular disease[J]. *Hypertension*, 2017, 70(4):798-803.

- [91] Black MH, Zhou H, Sacks DA, et al. Hypertensive disorders first identified in pregnancy increase risk for incident prehypertension and hypertension in the year after delivery[J]. *Hypertens*, 2016, 34(4):728-35.
- [92] Jarvie JL, Metz TD, Davis MB, et al. Short-term risk of cardiovascular readmission following a hypertensive disorder of pregnancy[J]. *Heart*, 2018, 104:1187-94.
- [93] Grundy S M, Stone N J, Bailey A L, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 73(24): e285-e350.
- [94] Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: executive summary:a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol* 2019;74(10):1376-414.
- [95] Lidegaard Ø, Løkkegaard E, Jensen A, et al. Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception[J]. *N Engl J Med*, 2012,366(24):2257-2266.
- [96] Wang Z, Chen Z, Zhang L, et al. Status of hypertension in China: results from the China Hypertension Survey, 2012-2015[J]. *Circulation*, 2018, 137(22): 2344-2356.
- [97] Ji H, Kim A, Ebinger JE, et al. Sex differences in blood pressure trajectories over the life course. *JAMA Cardiol* 2020;5:19-26.
- [98] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. for the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report[J]. *JAMA*. 2003, 289: 2560-2571.
- [99] Hsia J, Margolis K L, Eaton C B, et al. Prehypertension and cardiovascular disease risk in the Women's Health Initiative[J]. *Circulation*, 2007, 115(7):855.
- [100] Routledge F S, Mcfetridge-Durdle J A, Dean C R. Stress, menopausal status and nocturnal blood pressure dipping patterns among hypertensive women[J]. *Canadian Journal of Cardiology*, 2009, 25(6):e157-e163.
- [101] Boggia J, Thijs L, Hansen TW, et al. Ambulatory blood pressure monitoring in 9357 subjects from 11 populations highlights missed opportunities for cardiovascular prevention in women[J]. *Hypertension*, 2011, 57:397-405.
- [102] Wenger N K. Adverse Cardiovascular Outcomes for Women—Biology, Bias, or

- Both[J]. *JAMA Cardiology*, 2020, 5(3):253-254.
- [103] Huebschmann AG, Huxley RR, Kohrt WM, et al. Sex differences in the burden of type 2 diabetes and cardiovascular risk across the life course[J]. *Diabetologia*, 2019, 62:1761-72.
- [104] Peters SA, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohort, including 775, 385 individuals and 12, 539 strokes[J]. *Lancet*, 2014,383(10):1973-80.
- [105] Prospective Studies Collaboration, Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Sex-specific relevance of diabetes to occlusive vascular and other mortality: a collaborative meta-analysis of individual data from 980, 793 adults from 68 prospective studies[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6:538-46.
- [106] Wang Y, O'Neil A, Jiao Y, et al. Sex differences in the association between diabetes and risk of cardiovascular disease, cancer, and all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and meta-analysis of 5, 162, 654 participants[J]. *BMC Med*, 2019, 17:136.
- [107] George KM, Selvin E, Pankow JS, et al. Sex differences in the associations of diabetes with cardiovascular disease outcomes among African-American and white participants in the Athero-sclerosis Risk In Communities Study[J]. *Am J Epidemiol*, 2018, 187:403-10.
- [108] Daly B, Toulis KA, Thomas N, et al. Increased risk of ischemic heart disease, hypertension, and type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus, a target group in general practice for preventive interventions: a population-based cohort study[J]. *PLOS Medicine*, 2018, 15:e1002488.
- [109] Shah B R, Retnakaran R, Booth G L. Increased Risk of Cardiovascular Disease in Young Women Following Gestational Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(8):1668-1669.
- [110] Shostrom D C V, Yangbo S, Oleson J J, et al. History of Gestational Diabetes Mellitus in Relation to Cardiovascular Disease and Cardiovascular Risk Factors in US Women[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2017, 8:144.
- [111] Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women-2011 update: a guideline from the American Heart Association[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(12):1404-23.
- [112] Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, et al. Effect of thiazolidinedione treatment on

- progression of subclinical atherosclerosis in premenopausal women at high risk for type 2 diabetes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90:1986-1991.
- [113] Calle E, Thun MJ, Petrelli JM, et al. Body mass index and mortality in a prospective cohort of U. S. adults[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341:1097-1105.
- [114] Khan S S, Ning H, Wilkins J T, et al. Association of Body Mass Index With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Compression of Morbidity[J]. *JAMA Cardiology*, 2018, 3(4):280-287.
- [115] Oreopoulos A, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, et al. The relationship between body mass index, treatment, and mortality in patients with established coronary artery disease: a report from APPROACH[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(21): 2584-2592.
- [116] Ghayda R A, Park D Y, Lee J Y, et al. Body mass index and mortality in patients with cardiovascular disease: an umbrella review of meta-analyses[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, 25(1):24393.
- [117] Barter PJ. The causes and consequences of low levels of high density lipoproteins in patients with diabetes[J]. *Diabetes Metab*, 2011, 35(2):101-106.
- [118] Chakraborty S, Ganti A K, Marr A, et al. Lung cancer in women: role of estrogens[J]. *Expert review of respiratory medicine*, 2010, 4(4):509-518.
- [119] Lukanova A, Lundin, E, Zeleniuch-Jacquotte A, et al. Body mass index, circulating levels of sex-steroid hormones, IGF-I and IGF-binding protein-3:a cross-sectional study in healthy women[J]. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societie*, 2004, 150(2): 161-171.
- [120] 孙莹, 韩雅玲, 李毅, 等. 吸烟, 超重及肥胖对女性早发冠心病影响[J]. *临床军医杂志*, 2019, 47(10):1041-1043.
- [121] Michael VH, Folkert WA, Tom MP, et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(9): 539-550.
- [122] Nordestgaard B G, Stender S, Kjeldsen K. Reduced atherogenesis in cholesterol-fed diabetic rabbits. Giant lipoproteins do not enter the arterial wall[J]. *Arteriosclerosis*, 1988, 8(4):421-428.
- [123] Ulrich L, Parhofer K G, Ginsberg H N, et al. Clinical review on triglycerides[J]. *European Heart Journal*, 2020, 41(1): 99-109c.
- [124] Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, et al. Association of triglyceride-lowering LPL variants and LDL-C-lowering LDLR variants with risk of coronary heart disease[J]. *JAMA*, 2019, 321(4):364-373.

- [125] Jeppesen J O, Hein H O, Suadicani P, et al. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study[J]. *Circulation*, 1998, 97(11):1029-1036.
- [126] Gotto AM. high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides as therapeutic targets for preventing and treating coronary artery diseases[J]. *Am Heart*, 2002, 144(6):S33-S42.
- [127] Austin M A, Hokanson J E. Epidemiology of triglycerides, small dense low-density lipoprotein, and lipoprotein(a) as risk factors for coronary heart disease[J]. *Medical Clinics of North America*, 1994, 78(1):99-115.
- [128] Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014 2:655-666.
- [129] Sone H, Tanaka S, Tanaka S, et al. Comparison of Various Lipid Variables as Predictors of Coronary Heart Disease in Japanese Men and Women With Type 2 Diabetes: Subanalysis of the Japan Diabetes Complications Study[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(5):1150-1157.
- [130] Noh H L, Okajima K, Molkentin J D, et al. Acute lipoprotein lipase deletion in adult mice leads to dyslipidemia and cardiac dysfunction[J]. *American Journal of Physiology*, 2006, 291(4):755-760.
- [131] Niccoli G, Calvieri C, Minelli S, et al. Permanent polymer of drug eluting stents increases eosinophil cationic protein levels following percutaneous coronary intervention independently of C-reactive protein[J]. *Atherosclerosis*, 2014,237(2): 816-820.
- [132] International Atherosclerosis Society. An international atherosclerosis society position paper:global recommendations for the management of dyslipidemia[J]. *Journal of Clinical Lipidology*, 014, 8(1):29-60.
- [133] Jacobson T A, Ito M K, Maki K C, et al. National Lipid Association Recommendations for Patient-Centered Management of Dyslipidemia: Part 2[J]. *Journal of Clinical Lipidology*, 2014, 8(5):473-488.
- [134] Frost, P H; Havel, R J. Rationale for use of non-high-density lipoprotein cholesterol rather than low-density lipoprotein[J]. *American Journal of Cardiology*, 1998, 81(4A):26-31B.
- [135] Gallagher C J, Langefeld C D, Gordon C J, et al. Association of the Estrogen

- Receptor- α Gene With the Metabolic Syndrome and Its Component Traits in African-American Families[J]. *Diabetes*, 2007, 56(8):2135-41.
- [136] Kikuchi, T. Association of serum low-density lipoprotein metabolism with oestrogen receptor gene polymorphisms in healthy children[J]. *Acta Pdiatrica*, 2010, 89(1):42-45.
- [137] Otero YF, Stafford JM, McGuinness OP. Pathway-selective insulin resistance and metabolic disease: the importance of nutrient flux[J]. *Biol Chem*, 2014,289(30): 20462-20469.
- [138] Daniel S Ory. Getting a "Hold" on NPC2[J]*Cell Metab*, 2009, 10(3):161-162.
- [139] Dimitry A, Chistiakov, Alexandra A, et al. Role of lipids and intraplaque hypoxia in the formation of neovascularization in atherosclerosis[J]. *Annals of medicine*, 2017. 49(8):661-677.
- [140] Abed J, Shamoun F E, Kalavakunta J K, et al. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque[J]. *European Heart Journal*, 2016, 37(25):1959-1974.
- [141] Cuchel M, Rohatgi A, Sacks F M, et al. JCL roundtable: High-density lipoprotein function and reverse cholesterol transport[J]. *Journal of Clinical Lipidology*, 2018, 12(5):1086-1094.
- [142] Khera AV, Cuchel M, Llera-Moya MDL. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 54(1):0-281.
- [143] Ishikawa T, Ayaori M, Uto-Kondo H, et al. High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity as a relevant predictor of atherosclerotic coronary disease[J]. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):318-22.
- [144] Bauer M, Caviezel S, Teynor A, et al. Carotid intima-media thickness as a biomarker of subclinical atherosclerosis[J]. *Swiss Medical Weekly*, 2012, 142(43):736-736.
- [145] Taylor A J, Bindeman J, Le T P, et al. Progression of calcified coronary atherosclerosis: relationship to coronary risk factors and carotid intima-media thickness[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197(1):339-345.
- [146] Mauldin J P, Nagelin M H, Wojcik A J, et al. Reduced Expression of ATP-Binding Cassette Transporter G1 Increases Cholesterol Accumulation in Macrophages of Patients With Type 2 Diabetes Mellitus[J]. *Circulation*, 2008, 117(21):2785-2792.
- [147] Liu C, Zhang Y, Ding D, et al. Cholesterol efflux capacity is an independent

- predictor of all-cause and cardiovascular mortality in patients with coronary artery disease: a prospective cohort study[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 249:116-124.
- [148] Lu Y, Liu Y, Li Y, et al. Association of ATP-binding cassette transporter A1 gene polymorphisms with plasma lipid variability and coronary heart disease risk[J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2015, 8(10):13441.
- [149] Vedhachalam C, Ghering A B, Davidson W S, et al. ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2007, 27(7):1603-1609.
- [150] Nanna MG, Wang TY, Xiang Q, et al. Sex differences in the use of statins in community practice[J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2019, 12:e005562.
- [151] Bukkapatnam RN, Gabler NB, Lewis WR. Statins for primary prevention of cardiovascular mortality in women: a systematic review and meta-analysis[J]. *Prev Cardiol*, 2010, 13:84-90.
- [152] Mortensen MB, Nordestgaard BG, Afzal S, et al. ACC/AHA guidelines superior to ESC/EAS guidelines for primary prevention with statins in non-diabetic Europeans: the Copenhagen General Population Study[J]. *Eur Heart J* 2017;38:586-594.
- [153] Zhao D, Guallar E, Ouyang P, et al. Endogenous Sex Hormones and Incident Cardiovascular Disease in Post-Menopausal Women[J]. *Am Coll Cardiol*, 2018, 71(22): 2555-2566.
- [154] Murthy VL, Naya M, Taqueti VR, et al. Effects of sex on coronary microvascular dysfunction and cardiac outcomes[J]. *Circulation*, 2014, 129(24):2518-2527.
- [155] Ouyang P, Michos E D, Karas R H. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System. Lessons Learned and Unanswered Questions[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006, 47(9):1741-1753.
- [156] Mendelsohn M. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences[J]. *Science*, 2005, 308:1583-1587.
- [157] Egan K M, Lawson J A, Fries S, et al. COX-2-Derived Prostacyclin Confers Atheroprotection on Female Mice[J]. *Science*, 2004, 306(5703):1954-1957.
- [158] Herrington, David, M, et al. Effects of Estrogen Replacement on the Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2000, 343:522-529.
- [159] Herrington D M, Howard T D, Hawkins G A, et al. Estrogen-receptor polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease[J]. *New England Journal of Medicine*,

- 2002, 346(13):967.
- [160] Shearman A M, Cupples L A, Demissie S, et al. Association Between Estrogen Receptor[alpha]Gene Variation and Cardiovascular Disease[J]. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2004, 59(6):444-445.
- [161] Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995, 91:2488-2496.
- [162] Oger E, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, et al. Association of circulating cellular adhesion molecules with menopausal status and hormone replacement therapy. Time-dependent change in transdermal, but not oral estrogen users. *Thromb Res* 2001;101:35-43.
- [163] Ding Q, Hussain Y, Chorazyczewski J, et al. GPER-independent effects of estrogen in rat aortic vascular endothelial cells[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2015, 399(C):60-68.
- [164] Russell K S, Haynes M P, Sinha D. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(11):5930-5935.
- [165] Chakrabarti S, Lekontseva O, Peters A, et al. 17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium[J]. *Cardiovascular Research*, 2010,85(4):796-805.
- [166] Cristiana C, Giorgio A, Micaela P, et al. 17β-Estradiol Enhances Signalling Mediated by VEGF-A-Delta-Like Ligand 4-Notch1 Axis in Human Endothelial Cells[J]. *Plos One*, 2013, 8(8):e71440.
- [167] Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard, et al. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2009, 120(25), 2567-2576.
- [168] Christian R C, Liu P Y, Harrington S, et al. Intimal estrogen receptor (ER)beta, but not ERalpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre-and postmenopausal women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(7):2713-20.
- [169] Patel S K, Janjic J M. Macrophage Targeted Theranostics as Personalized Nanomedicine Strategies for Inflammatory Diseases[J]. *Theranostics*, 2015, 5(2):150-172.
- [170] Patel P J, Khera A V, Jafri K, et al. The Anti-Oxidative Capacity of High-Density

- Lipoprotein Is Reduced in Acute Coronary Syndrome But Not in Stable Coronary Artery Disease[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, 58(20):2068-2075.
- [171] Mody P, Joshi P H, Khera A, et al. Beyond Coronary Calcification, FamilyHistory, and C-Reactive Protein: Cholesterol Efflux Capacity and Cardiovascular Risk Prediction[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016,67(21):2480-2487.
- [172] Wang X, Collins HL, Ranalletta M, et, al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR - BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117: 2216-2224.
- [173] Gerrity R G, Naito H K, Richardson M, et al. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages[J]. *American Journal of Pathology*, 1979, 95(3):775-792.
- [174] Chistiakov D A, Kashirskikh D A, Khotina V A, et al. Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis: The Role of Myeloid Cells[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8(11):1798.
- [175] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization-ScienceDirect[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(12):677-686.
- [176] Frolov A, Petrescu A, Atshaves BP, et al. High densitylipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting tolipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single-andmultiphoton fluorescence approach[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (17) :12 769-780.
- [177] Atshaves BP, Starodub O, McIntosh A, et al. Sterol car-rier protein-2 alters high density lipoprotein-mediated cho-lesterol efflux[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (47) :36852-861.
- [178] Sengupta B, Narasimhulu C A, Parthasarathy S. Novel technique for generating macrophage foam cells for in vitro reverse cholesterol transport studies[J]. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54(12):3358-3372.
- [179] Atshaves B P, Starodub O, Mcintosh A, et al. Sterol Carrier Protein-2 Alters High Density Lipoprotein-mediated Cholesterol Efflux[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(47):36852-36861.
- [180] Adams M R, Konaniah E, Cash J G, et al. Use of NBD-cholesterol to identify a minor but NPC1L1-independent cholesterol absorption pathway in mouse

- intestine[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011, 300(1):G164-G169.
- [181] Portioli Silva EP, Peres CM, Roberto MJ, et al. NBD-cholesterol incorporation by rat macrophages and lymphocytes:a process dependent on the activation state of the cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2004, 22 (1) :23-28.
- [182] Daniel Wüstner. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology[J]. *Chemistry & Physics of Lipids*, 2007, 146(1):1-25.
- [183] Luo J, Yang H, Song B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020. 21(4):225-245.
- [184] Yokoyama S, Arakawa R, Wu C A, et al. Calpain-mediated ABCA1 degradation: post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2012, 1821(3):547-551.
- [185] Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, et al. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,104(38):15093-15098.
- [186] Graf G A, Yu L, Li W P, et al. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(48):48275-48282.
- [187] Laurent YC; Carrie W; Tamara PA, et. al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via Toll-like receptors and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions[J]. *Circulation*, 2008, 118(18):1837-1847.
- [188] Rosenson R S, Brewer H B, Davidson W S, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport[J]. *Circulation*, 2012, 125(15):1905-1919.
- [189] Gelissen I C, Harris M, Rye K A, et al. ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2006, 7(3):541-541.
- [190] Qian H, Zhao X, Cao P, et al. Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1[J]. *Cell*, 2017, 169(7):1228.
- [191] Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, et al. Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding

- cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly[J]. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(48):47890-47897.
- [192] Kolovou GD; Mikhailidis DP; Anagnostopoulou KK, et al. Tangier Disease Four Decades of Research: A Reflection of the Importance of HDL[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13(7):771-782.
- [193] Fitzgerald M L, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2):361.
- [194] Attie A D. ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(4):172-179.
- [195] Ogata M, Tsujita M, Hossain M A, et al. On the mechanism for PPAR agonists to enhance ABCA1 gene expression[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(2):413-419.
- [196] Chawla A, Boisvert W A, Lee C H, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis[J]. *Molecular Cell*, 2001, 7(1):161-171.
- [197] Marinozzi M, Castro Navas F F, Maggioni D, et al. Side-Chain Modified Ergosterol and Stigmasterol Derivatives as Liver X Receptor Agonists[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60: 6548-6562.
- [198] Rastinejad F, Ollendorff V, Polikarpov I. Nuclear receptor full-length architectures: confronting myth and illusion with high resolution[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40(1):16-24.
- [199] Fuentes, N.; Silveyra, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2019, 116, 135-170.
- [200] Klinge C M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors[J]. *Steroids*, 2000, 65(5):227-251.
- [201] Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, et al. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells[J]. *Cell*, 1986, 46:1053-1061.
- [202] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(14): 2905-2919.
- [203] Tremblay G B, André T, Copeland N G, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta[J]. *Molecular Endocrinology*, 1997, 11(3):353-365.
- [204] Kladde M P, Xu M, Simpson R T. Direct study of DNA-protein interactions in repressed and active chromatin in living cells[J]. *Embo Journal*, 1996,15(22):6290-

- 6300.
- [205] Hinrich G. Transcription Activation by Estrogen and Progesterone Receptors[J]. Annual Review of Genetics, 1991, 25(1):89-123.
- [206] Della Torre S, Benedusi V, Fontana R, et al. Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014;10(1):13-23.
- [207] Villa A, Della T S, Stell A, et al. Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(29):11806-11811.
- [208] Sara D T, Nico M, Roberta F, et al. An Essential Role for Liver ER α in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle[J]. cell reports. 2016,15(2):360-371.
- [209] Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243: 122-126.
- [210] Kidani Y, Bensinger S J. LXR and PPAR as integrators of lipid homeostasis and immunity[J]. Immunological Reviews, 2012, 249(1):72-83.
- [211] Harmon G S, Lam M T, Glass C K. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism[J]. Chemical Reviews, 2011, 111(10):6321-6340.
- [212] Huan W, Yan L, Ling Z, et al. 17 β -estradiol promotes cholesterol efflux from vascular smooth muscle cells through a liver X receptor α -dependent pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2014, 33(3):550-558.
- [213] Liang X, He M, Chen T, et al: 17 β -estradiol suppresses the macrophage foam cell formation associated with SOCS3[J]. Horm Metab Res, 2013, 45: 423-429.
- [214] Ribas V, Drew BG, Le JA, et al. Myeloid-specific estrogen receptor α deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16457-16462.
- [215] Zhu L, Shi J, Luu T N, et al. Hepatocyte estrogen receptor alpha mediates estrogen action to promote reverse cholesterol transport during Western-type diet feeding[J]. Mol Metab, 2017, 8, 106-116.
- [216] Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics[J]. Annual Review of Physiology, 2010, 72(1):247-272.
- [217] Ma X, Li SF, Qin ZS, et al. Propofol up-regulates expression of ABCA1, ABCG1, and SR-B1 through the PPAR γ /LXR α signaling pathway in THP-1

- macrophage-derived foam cells[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24: 230-235.
- [218] Srivastava R A K. Estrogen-induced regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in mice: A possible mechanism of atheroprotection by estrogen[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 240(1):67-73.
- [219] Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2[J]. *Immunity*, 2013, 38(4):754-768.
- [220] Kathryn J, Moore, Edward A, et al. High-Density Lipoproteins Put Out the Fire[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 19(2):175-176.
- [221] Nikolaos S. Invited Commentary: Lipoproteins and Dementia—Is It the Apolipoprotein A-I[J]. *American Journal of Epidemiology*, 2007, 165(9):993-997.
- [222] Barter P, Kastelein J, Nunn A, et al. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions[J]. *Atherosclerosis*, 2003,168(2):195-211.
- [223] Karalis I, Jukema J W. HDL Mimetics Infusion and Regression of Atherosclerosis: Is It Still Considered a Valid Therapeutic Option[J]. *Current Cardiology Reports*, 2018, 20(8):66.
- [224] Kirchgessner TG, Martin R, Sleph P, et al. Pharmacological Characterization of a Novel Liver X Receptor Agonist with Partial LXR Activity and a Favorable Window in Nonhuman Primates[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 2015, 352(2):305-14.
- [225] Purnell JQ, Urbanski HF, Kievit P, et al. Estradiol Replacement Timing and Obesogenic Diet Effects on Body Composition and Metabolism in Postmenopausal Macaques[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(4):899-914.
- [226] Choi H Y, Ruel I, Malina A, et al. Desmocollin 1 is abundantly expressed in atherosclerosis and impairs high-density lipoprotein biogenesis[J]. *European Heart Journal*, 2018, 39(14): 1194-1202.
- [227] Terasaka N, Wang N, LYvan-Charvet, et al. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(38):15093-15108.
- [228] Meyer M R, Haas E, Prossnitz E R, et al. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen[J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2009, 308(1-2):9-16.

- [229] Cullen A E, Centner A M, Deitado R, et al. The Impact of Dietary Supplementation of Whole Foods and Polyphenols on Atherosclerosis[J]. *Nutrients*, 2020, 12(7):2069.
- [230] Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression[J]. *Journal of Atherosclerosis & Thrombosis*, 2018, 25(4):294-303.
- [231] Virmani R, Kolodgie F D, Burke A P, et al. Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2000,20(5):1262-1275.
- [232] A, Kontush. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis[J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58(3):342.
- [233] Wolpe S D, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1989,3(14):2565-2573.
- [234] Luo Y R, Zheng S, Ding Y, et al. Preventive effects of kudzu root on bone loss and cartilage degradation in ovariectomized rat[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(7):3517.
- [235] Shimazu - Kuwahara S, Kanemaru Y, Harada N, et al. Glucose - dependent insulinotropic polypeptide deficiency reduced fat accumulation and insulin resistance, but deteriorated bone loss in ovariectomized mice[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2019, 10(4):909-914.
- [236] Mauvais-Jarvis F, Clegg D J, Hevener A L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis[J]. *Endocr Rev*, 2013, 34(3):309-338.
- [237] Barros R P, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors and the metabolic network[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(3), 289-299.
- [238] Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue[J]. *Annu Rev Pathol*, 2007, 2(1):31-56.
- [239] Schulz T J, Tseng Y H. Brown adipose tissue: Development, metabolism and beyond[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 453(2):167-178.
- [240] Berry D C, Stenesen D, Zeve D, et al. The developmental origins of adipose tissue[J]. *Development*, 2013, 140(19):3939-3949.
- [241] Ellen B. Gender differences in fat metabolism[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2001, 4(6):499-502.

- [242] Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert M O. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease[J]. *Clinical Research in Cardiology*, 2006, 95(3):136-147.
- [243] Goldman S, Zhang Y, Jin S V. Autophagy and adipogenesis: Implications in obesity and type II diabetes[J]. *Autophagy*, 2010, 6(1):179-181.
- [244] Ekihiro S. Microbiome-Obesity-Liver Cancer Interaction: Senescence of Hepatic Stellate Cells and Bile Acids Play New Roles[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3):860-861.
- [245] Camporez João Paulo G, Jornayvaz François R, Hui-Young L, et al. Cellular mechanism by which estradiol protects female ovariectomized mice from high-fat diet-induced hepatic and muscle insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2013(3):1021-1028.
- [246] Y, Cui, X, et al. The pattern of lipids and lipoproteins during the menopausal transition in Chinese women[J]. *Climacteric the Journal of the International Menopause Society*, 2016. 19(3) :292-298.
- [247] Lapid K, Lim A, Clegg D J, et al. Oestrogen signalling in white adipose progenitor cells inhibits differentiation into brown adipose and smooth muscle cells[J]. *Nature Communications*, 2014, 5:5196.
- [248] Fatma K B, Garip S, Heise S, et al. FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation[J]. *Analyst*, 2015, 140(7):2205-2214.
- [249] Brufau G, Groen A K, Kuipers F. Reverse Cholesterol Transport Revisited Contribution of Biliary Versus Intestinal Cholesterol Excretion[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2011, 31(8):1726-1733.
- [250] Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, et al. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,104(38):15093-15098.
- [251] Qiu X, Mistry A, Ammirati M J, et al. Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2007, 14:106-113.
- [252] Le May C, Berger J M, Lespine A, et al. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1[J].

- Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2013, 33(7):1484-1493.
- [253] Badeau R M, Metso J, Kovanen P T, et al. The impact of gender and serum estradiol levels on HDL - mediated reverse cholesterol transport[J]. European Journal of Clinical Investigation, 2013, 43(4):317-323.
- [254] Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis[J]. Lipid Res, 2009, 50:S189-S194.
- [255] De L M, Drazul-Schrader D, Asztalos B F, et al. The Ability to Promote Efflux Via ABCA1 Determines the Capacity of Serum Specimens With Similar High-Density Lipoprotein Cholesterol to Remove Cholesterol From Macrophages[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2010, 30(4):796.
- [256] Frambach S J C M, Haas R D, Smeitink J A M, et al. Brothers in Arms: ABCA1-and ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux as Promising Targets in Cardiovascular Disease Treatment[J]. Pharmacological Reviews, 2020, 72(1):152-190.
- [257] Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler A T, et al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions[J]. Circulation. 2008, 118(18):1837-47.
- [258] Gantsetseg T, Jargalsaikhan D, Porritt R A, et al. Chlamydia pneumoniae Hijacks a Host Autoregulatory IL-1 β Loop to Drive Foam Cell Formation and Accelerate Atherosclerosis[J]. Cell Metabolism, 2018, 28(3):432-448.
- [259] Nagler J J, Davis T L, Modi N, et al. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout[J]. General & Comparative Endocrinology, 2010, 167(2):326-330.
- [260] Song-iee H, Komatsu Y, Murayama A, et al. Estrogen receptor ligands ameliorate fatty liver through a nonclassical estrogen receptor/Liver X receptor pathway in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(5):1791-1802.
- [261] Brinton E A. Oral Estrogen Replacement Therapy in Postmenopausal Women Selectively Raises Levels and Production Rates of Lipoprotein A-I and Lowers Hepatic Lipase Activity Without Lowering the Fractional Catabolic Rate[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 1996, 16(3):431.
- [262] Tilly-Kiesi M, Kahri J, Pyrl T, et al. Responses of HDL subclasses, Lp(A-I) and Lp(A-I:A-II) levels and lipolytic enzyme activities to continuous oral

- estrogen-progestin and transdermal estrogen with cyclic progestin regimens in postmenopausal women[J]. *Atherosclerosis*, 1997, 129(2):249-259.
- [263] Calabrese, Edward J. Estrogen and Related Compounds: Biphasic Dose Responses[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2001, 31(4-5):503-515.
- [264] Li L, Andersen M E, Heber S, et al. Non-monotonic dose-response relationship in steroid hormone receptor-mediated gene expression[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, 38(5):569-585.
- [265] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717):198-203.
- [266] Kagan JC, Horng T. NLRP3 inflammasome activation: CD36 serves double duty[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8):772-774.
- [267] Dou F, Chen J, Cao H, et al. Anti-atherosclerotic effects of LXR α agonist through induced conversion of M1 macrophage to M2[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6):3825-3840.
- [268] Tabas I, Ron D. Molecular mechanisms integrating pathways of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190.
- [269] Timmins J, Ozcan L, Seimon T A, et al. Calcium / calmodulin-dependent protein kinase II links endoplasmic reticulum stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(10):2925-2941.
- [270] Feng B, Yao P M, Li Y, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages[J]. *Nature Cell Biology*, 2003, 5(9):781-792.
- [271] Tabas, I. Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(11):2255-2264.
- [272] Myoishi M, Hao H, Minamino T, et al. Increased Endoplasmic Reticulum Stress in Atherosclerotic Plaques Associated With Acute Coronary Syndrome[J]. *Circulation*, 2007, 116(11):1226-1233.
- [273] Ebru, Erbay, Vladimir R, Jared R M, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis[J]. *Nature medicine*, 2009, 15(12):1383-1391.
- [274] Hotamisligil G S, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(12):923-934.

综述

巨噬细胞在动脉粥样硬化中的作用及机制研究进展

包针 综述 木胡牙提 校审

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 所致的心脑血管疾病是导致 2017 年全球死亡人数最多的原因, 估计死亡人数为 1780 万^[1]。中国心血管病 (CVD) 的患病率目前呈现不断上升趋势, 据估计 CVD 患病人数已达到 2.9 亿, 其中脑卒中患者有 1,300 万, 冠心病患者有 1,100 万^[2]。巨噬细胞作为重要的天然免疫效应细胞, 是慢性炎症疾病发展的关键因子, 其在 AS 中的作用机制逐渐被发现。巨噬细胞作为 AS 斑块的主要成分, 参与 AS 的起始、进展和破裂全过程。动脉壁在 AS 形成过程中积累的巨噬细胞, 大多是由循环中的单核细胞在局部驻留后转化而来。这些单核源性巨噬细胞又在不同细胞因子和微环境的刺激下可极化为不同分型 (如 M1、M2 等), 发挥不同的功能特性。巨噬细胞作为 AS 的关键参与者, 是心脑血管疾病诊断及治疗的有效候选靶点。本文以 AS 形成及进展的关键节点为讨论点, 概述单核源性巨噬细胞在 AS 中的功能特点及作用机制, 为靶向巨噬细胞的诊断和治疗提供理论依据。

1 单核细胞分化在 AS 形成过程中的作用机制

1.1 单核细胞的迁移和分化

单核细胞属于髓系细胞, 是循环及组织驻留巨噬细胞的直接前体。当存在促炎性刺激时, 它们迅速迁移到炎症部位, 在那里它们主要分化为巨噬细胞。血管内皮活化及功能障碍被认为是 AS 的最早表现, 也是必要起始阶段。内皮细胞活化后获得促炎表型并开始表达促炎分子, 如集落刺激因子-1 (CSF-1)、趋化因子配体 2 (CCL2)、细胞间粘附分子 1 (ICAM-1) 和血管细胞粘附分子 1 (VCAM-1), 这些细胞因子与单核细胞上的同源受体相互作用, 可促进循环中单核细胞向内皮细胞的定向迁移和黏附^[3]。聚集在内皮细胞间隙下的单核细胞在 CSF-1 的作用下分化为巨噬细胞, 这些 M0 巨噬细胞随后在微环境中的特定细胞因子刺激下, 进一步极化为不同亚型。除了通过向巨噬细胞分化, 单核细胞自身也参与了 AS 的发生。在小鼠的实验研究中, 高胆固醇血症会导致 Ly6C^{high} 单核细胞 (一种炎症性单核细胞亚群) 增加, 而且 Ly6C^{high} 单核细胞比 Ly6C^{low} 单核细胞更加有可能驻留在 AS 病变部位^[4]。最新研究表明, 纤溶酶原受体 Plg-RKT 在 Ly6C^{high} 单核细胞、促炎型巨噬细胞中高表达, 且更多的结合纤溶酶^[5]。根据促炎性单核细胞和促炎巨噬细胞的定向迁移依赖于纤溶酶可知, Plg-RKT 的表达影响着单核细胞和巨噬细胞的迁移能力。单核细胞的迁移和向巨噬

细胞转化作为 AS 形成的早期阶段的必要条件, 可以作为预防 AS 的有效调控途径, 正如阿司匹林的抗血小板聚集在 AS 的预防原理。

1.2 巨噬细胞的极化

巨噬细胞具有相当大的功能异质性, 可根据所处的各种微环境及脏器发挥不同的功能, 迁移在内皮细胞间隙下的单核细胞在 CSF-1 的作用下分化为 M0 巨噬细胞, 并伴随着一系列基因表达谱的改变, 随后 M0 巨噬细胞可被环境中的其他细胞因子或趋化因子诱导极化为不同亚型。

在 AS 中巨噬细胞主要暴露于炎症环境, M0 巨噬细胞在脂多糖 (LPS)、干扰素- γ (IFN- γ) 的刺激下可以极化为 M1 型, 主要表达诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 以及促炎细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6, 以及趋化因子 CXCL9、CXCL10 和 CXCL11, 表现出促炎特性^[6]。巨噬细胞的 M2 亚群可根据它们不同的作用, 接受不同刺激再次分为几种亚型。M2a 亚群受 IL-4 和 IL-13 信号的刺激, 表达抗炎细胞因子 (IL-10 和 TGF- β) 和 C-C 基序趋化因子 (CCL17 和 CCL22), 参与组织重塑^[7]。M2b 亚群由免疫复合物、TLR 激动剂或 IL-1R 配体诱导。这些巨噬细胞高表达 IL-10 和少量的促炎性细胞因子 (如: IL-1b、IL-6、IL-12 和 TNF- α), 参与免疫调节^[8]。M2c 亚群是在 IL-10、TGF- β 或糖皮质激素的诱导下发生极化产生的, 并继续高表达 pentraxin-3、IL-10 和 TGF- β , 以及 Mer 受体激酶 (MERTK), 具有抗炎特性, 并负责清除凋亡细胞和碎片^[9]。M4 巨噬细胞是人类特有的。这种亚型在对血小板源性趋化因子 CXCL4 的反应中分化, 并释放 IL-6、TNF- α 和基质金属蛋白酶 MMP12, 因此具有促炎作用^[10]。此外, 新发现的 HA-mac、M (Hb) 和 Mhem 巨噬细胞存在于不稳定病变的出血区, 它们吞噬并利用红细胞残余物和血红蛋白沉积, 且具有抗 AS 和抗泡沫细胞转化的能力^[11]。巨噬细胞表型是一种动态的而不是终末分化的状态, 可以根据各种信号改变。由此可知, 对巨噬细胞极化过程调节的研究, 为 AS 斑块形成及稳定性的靶向治疗提供了可靠的机制基础。

2 巨噬细胞的胆固醇代谢在 AS 中的作用机制

巨噬细胞无限制的摄取修饰后的低密度脂蛋白 (LDL), 导致细胞内的胆固醇稳态失衡, 这是 AS 发生和进展的关键环节。对单核细胞和巨噬细胞中发生显著变化的基因进行功能聚类分析发现, 主要是参与脂质代谢的基因表达发生了显著的变化。AS 病变中巨噬细胞的胆固醇代谢主要包括胆固醇的摄取、酯化和外流, 三者构成了巨噬细胞内的胆固醇稳态。

2.1 胆固醇的摄取

在正常情况下, 外周组织的细胞主要通过低密度脂蛋白受体 (LDLR) 摄取 LDL (主要含脂蛋白 ApoB)。但 AS 病变中巨噬细胞衍生的泡沫细胞过程中, 胆固醇的

摄取主要是依赖于清道夫受体。一方面,当细胞内胆固醇水平过高时,LDLR通过SCAP-SREBP-2-PCSK9途径的负反馈调节作用,不能发挥摄取LDL的作用^[12]。另一方面,泡沫细胞的形成是修饰的LDL(主要是ox-LDL)过度积累的结果,而LDLR主要摄取天然的LDL。

在AS中,巨噬细胞负责摄取清除修饰的LDL,以防止其引起的细胞毒性、组织损伤、炎症和代谢紊乱。修饰后的LDL可以被巨噬细胞质膜SRs受体吸收,其中SR-A、CD36起主要作用,在AS中可清除75-90%的修饰后LDL^[13]。不同于LDLR,清道夫受体在吞噬ox-LDL的过程是不存在负反馈途径的。因此在AS中,胆固醇平衡被打破,导致巨噬细胞不能完全消化摄入的LDL,最终脂质沉积、巨噬细胞转化为泡沫细胞。最近的一项研究表明,JAK-STAT通路参与巨噬细胞SRs介导的修饰后LDL摄取的调节,JAK-STAT通路的抑制剂可以抑制修饰后LDL的摄取以及LPS激活的巨噬细胞中CD36、SR-A的表达^[14]。CD36是一种B类SR的膜糖蛋白,受多种转录因子的调控。PPAR γ 可与CD36启动子结合参与其转录水平的正向调控,增加巨噬细胞摄取ox-LDL;而胞内ox-LDL可持续激活巨噬细胞中PPAR γ ,诱导CD36的表达而使巨噬细胞更多摄取ox-LDL,形成胆固醇摄取的恶性循环^[15]。然而体内研究表明,两种清道夫受体(SR-A和CD36)的缺失并不影响AS病变的大小和泡沫细胞的生成,而是导致斑块坏死核心、巨噬细胞凋亡和炎症的减少^[16]。巨噬细胞胆固醇的代谢是受基因水平、转录水平、转录后调控以及微环境的多种因素共同调节的,体内研究较体外研究更难控制非研究因素的干扰。

2.2 胆固醇的酯化

含有胆固醇的脂蛋白被吞噬进入巨噬细胞,可以在溶酶体内ox-LDL水解为游离胆固醇(FC)和游离脂肪酸(FA)。FC转移至内质网后,在酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶(ACATs)的作用下酯化为胆固醇酯,并以脂滴的形式储存在胞质的中,最终形成泡沫细胞的“泡沫”。FC具有细胞毒性,ACATs诱导的酯化是防止FC在细胞内聚集产生细胞毒性的重要途径。ACATs家族是参与细胞内胆固醇酯化的唯一酶,包括两个成员ACAT1、ACAT2。ACAT1广泛分布在外周细胞中,在AS斑块中形成泡沫细胞的巨噬细胞中高度表达^[17],是巨噬细胞中胆固醇酯化的主要酶。因此,调节AS病变中巨噬细胞衍生泡沫细胞形成中胆固醇酯化途径的主要分子是ACAT1。ACAT2主要在肠细胞和肝细胞中高表达,ACAT2酯化作用可以增强肠上皮细胞的胆固醇吸收作用,阻断ACAT2的作用可降低饮食来源导致的高胆固醇血症^[18]。

与许多其他参与细胞脂质代谢的酶或蛋白质不同,ACATs的表达不受转录因子甾醇调节元件结合蛋白(SREBP)的转录调控。在转录水平的研究表明,干扰素- γ (IFN- γ)在人血单核细胞源性巨噬细胞中引起ACAT-1 mRNA上调^[19]。此外,胰岛素在转录水平以MAPK依赖的方式,上调了人THP-1细胞及其衍生巨噬细胞ACAT1

的 mRNA、蛋白和酶活性^[20]。在转录后水平上, miR-9 可以靶向人类 ACAT1 mRNA 的 3'-非翻译区, 特异性地减少人 ACAT1 蛋白, 并且在功能上减少 THP-1 巨噬细胞衍生泡沫细胞的形成^[21]。巨噬细胞内 ACAT1 作为泡沫细胞形成的重要酶, 是 AS 早期治疗的关键之一, 但同时不能忽视抑制 ACAT1 后引起的胞内 FC 增多, 引起细胞毒性作用, 这也是脂代谢基础研究向临床应用转化的难点。

2.3 胆固醇的外流

储存在胞质中的脂滴在细胞自噬作用下转移至溶酶体, 在这里胆固醇酯可以经过酸性脂肪酶的催化下再次水解为 FC, 这些 FC 与其他 FC 在特殊膜蛋白的作用下从胞内排出。巨噬细胞的细胞膜上存在 ATP 结合盒转运蛋白 A1/G1 (ABCA1、ABCG1)、清道夫受体 B-1 (SR-B1) 三种膜蛋白, 他们参与了 FC 由胞内向胞外脂蛋白的转运作用。其中 SR-B1 介导的 FC 转运是双向运动, 而其余两者是单向的, 故在巨噬细胞中主要以 ABCA1、ABCG1 调节胆固醇的外流作用。巨噬细胞内胆固醇外流是体内胆固醇逆向转运 (Reverse cholesterol transport, RCT) 的关键起始步骤, 也是 AS 的斑块稳态及进展的有效保护机制。ABCA1、ABCG1 均为多重跨膜蛋白, 分别将胞内多余的 FC 转运至胞外的贫脂的 apo-A1 和 HDL, 以达到细胞内的胆固醇稳态。目前 FC 通过 ABCA1、ABCG1 转运至胞外脂蛋白的具体方式仍是存在争议的。

ABCA1、ABCG1 两者在转录水平上接受肝 X 受体 (LXRs) 的正向调节, LXRs-ATP 结合盒转运蛋白轴一直是 RCT 研究的热点。Nicole 等的研究发现转运驱动蛋白结合 2 (Trafficking Kinesin Protein 2, TRAK2) 可参与 LXRs 介导的 ABCA1 转录, 负性调节巨噬细胞内胆固醇外流和 HDL 颗粒的生物合成^[22]。非编码 RNA 作为转录后水平调控的主要分子, 也被发现参与巨噬细胞胆固醇外流。最新研究发现 lncRNA MeXis, 在巨噬细胞内表达诱导 LXRs 的序列, 增强 LXRs 途径诱导的 ABCA1 表达^[23]。此外, lncRNA CDKN2B-AS1 在 AS 斑块组织和 THP-1 巨噬细胞衍生泡沫细胞中高表达, 通过在 CDKN2B 启动子中形成 RNA-DNA 三倍体, 抑制 CDKN2B 的转录、促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的脂质摄取和积累, 抑制巨噬细胞的 RCT, 参与 AS 斑块的形成^[24]。

3 巨噬细胞参与 AS 的慢性炎症反应

巨噬细胞是参与和调节各种炎症反应的关键细胞之一, 包括 AS 病变中的慢性炎症反应。内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞间协调的复杂免疫炎症过程是 AS 的重要病理生理基础。Ox-LDL 是 AS 斑块中的重要炎症触发因子, 其可激活血管内皮细胞, 使其增加趋化因子、黏附分子的表达。随后受招募的单核细胞在激活的内皮细胞间隙下转化为促炎型巨噬细胞, 其可分泌白介素等促炎细胞因子, 引起局部的慢性炎症反应。同时, 促炎细胞因子又可继续刺激内皮细胞活化, 以此形成炎症的闭

环形式。

免疫细胞的模式识别受体 (Pattern recognition receptors, PRRs) 作为感知细胞微环境中细胞因子、趋化因子等刺激的第一哨所, 在炎症的发生和消退过程起着关键作用。清道夫受体 (SRs) 和 Toll 样受体 (TLR) 作为巨噬细胞主要的 PRRs, 参与先天性免疫和适应性免疫。一方面, 巨噬细胞通过 SRs (主要是 CD36) 摄取 ox-LDL 后, 在溶酶体中水解后形成胆固醇结晶, 胆固醇结晶可以破坏溶酶体稳定性, 导致溶酶体释放内容物, 最终激活 NLRP3 炎症小体; 另一方面, TLR4-TLR6 异二聚体与配体结合后, 在 CD36 的协同作用下激活 NF- κ B, 并上调 NLRP3 表达水平同时刺激 IL-1 β 前体合成, NLRP3 炎症小体形成后还可以激活 caspase-1, 并促使 IL-1 β 前体的成熟和分泌, 然后参与炎症反应^[25, 26]。除了 PRRs 参与的炎症反应, 巨噬细胞移动抑制因子 (migration inhibitory factor, MIF) 作为 NLRP3 与中间丝蛋白波形蛋白相互作用的必需分子, 可在巨噬细胞中激活 NLRP3 炎症小体, 诱导 TNF、IL-6 和 IL-1 家族细胞因子的释放以及促进炎症^[27]。以上途径构成了巨噬细胞参与 AS 炎症的主要机制, 但并不限于此。

引起炎症发生的因素会促进 AS 病变的进展, 相反, 抑制炎症过程也可有效的预防或逆转 AS 斑块。转录因子 NF- κ B 在 AS 和炎症之间承担桥梁作用, 是控制 AS 炎症反应的重要靶点^[28]。因此, 如能在 AS 病变中有效的参与调控 NF- κ B, 就能对 AS 炎症起到很好控制作用。主要穹窿蛋白 (major vault protein, MVP) 属于核糖体蛋白, 在先天免疫方面有着重要的作用。最新研究发现, 沉默巨噬细胞中 MVP 后强烈触发 IKK 和 p65 的磷酸化以及 I κ B α 的降解, 导致 NF- κ B 复合物进入细胞核启动转录; MVP 还可通过阻止 TRAF6 泛素化, 从而抑制 NF- κ B 途径相关的代谢^[29]。此外, 参与胆固醇代谢的 LXRs 被证明也有控制 AS 炎症的作用。LXR α 可通过提高 ABCA1、ABCG1 的表达和抑制 NF- κ B 的磷酸化, 诱导促炎的 M1 巨噬细胞极化为抗炎的 M2 巨噬细胞, 增强脂质代谢的同时减轻 AS 斑块的炎症反应^[30]。

在 AS 相关的巨噬细胞中也发现了广泛的其他细胞因子, 特别是趋化因子 CCL2、CCL5, 以及 IL-1 α 、IL-6、IL-18 和 TNF α , 即使是天然 LDL 也会从巨噬细胞中诱导 IL-6 和 TNF α ^[31]。AS 病变中的炎症反应是细胞间以及促炎因子间的交错纵横的作用, 很难将其独立考虑。目前研究中多选择这些通路中关键交点作为调节靶点, 以达到对其下游炎症反应的总体控制。

4 巨噬细胞凋亡对斑块进展的影响

在 AS 晚期斑块, 巨噬细胞的凋亡是引起稳定斑块向易损斑块转变、斑块破裂的主要原因, 这包括内质网应激和激活其他促凋亡通路的共同作用。易损斑块破裂是冠状动脉血栓形成的主要原因, 常包含大的富含脂质的坏死核心, 其表面覆盖的纤

维帽变薄，这些斑块微结构特征是导致急性冠脉综合征的易损病变的重要标志。巨噬细胞凋亡发生在 AS 的全程，但在早期阶段，凋亡的细胞可以在有效的清除作用下，致使斑块病变的进展，而不是坏死核心的增加^[4]；在晚期斑块中，坏死核心源于巨噬细胞的凋亡以及凋亡细胞的吞噬清除功能不全的共同存在作用。通过对巨噬细胞凋亡的调控可作为一种治疗策略，旨在防止斑块向易损斑块进展，而不是预防 AS 本身。

巨噬细胞凋亡的关键程序是内质网激活（主要是未折叠蛋白反应，UPR），UPR 在正常生理学中起到纠正 ER 功能不平衡的作用，但当 ER 应激长期存在时，UPR 的效应器 CHOP（C/EBP 同源蛋白）表达上调，其下游的钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II（CaMKII）作为触发细胞凋亡的关键分子，可激活 Fas、线粒体凋亡、STAT1 来实现细胞凋亡^[32,33]。虽然在体外研究的细胞模型中，内质网应激会导致细胞凋亡的发生，但在体内复杂环境中，单独的内质网应激不能引发细胞凋亡，但明显的增加了巨噬细胞对其他凋亡刺激的易感性。以 SRs 和 TLRs 为主的 PRR 途径，可抑制由长期内质网应激诱导的代偿性细胞生存途径和增加氧化应激，触发巨噬细胞凋亡，即内质网应激途径和 PRR 途径形成的“两次打击”模式，在体内环境中导致巨噬细胞凋亡，例如，缺乏 SR-A 和 CD36，或 TLR4 和 TLR2 的 AS 小鼠模型能够部分防止晚期损伤性巨噬细胞死亡和斑块坏死^[4,34]。在外周血中的脂蛋白 a 作为氧化磷脂的载体，作用于 CD36/TLR2 途径，是内质网应激下巨噬细胞凋亡的有力触发因素^[34]。

除了巨噬细胞的凋亡，其凋亡后清除吞噬功能在斑块坏死核心的形成中也是至关重要的。对于 AS 晚期斑块巨噬细胞对胞外脂质及蛋白的清除能力减弱，有研究认为，自噬-溶酶体系统功能的紊乱是导致这一现象的主要原因。该研究发现 AS 晚期斑块中自噬功能发生障碍，通过增强巨噬细胞自噬-溶酶体生物发生的主要转录调节因子（TFEB），可以逆转斑块的自噬功能障碍，增强 p62（自噬伴侣蛋白）富集蛋白聚集体的聚集吞噬作用，减缓巨噬细胞凋亡和促炎性 IL-1 β 的产生，最终导致斑块巨噬细胞凋亡和坏死核心减少^[35]。因此，巨噬细胞自噬-溶酶体生物发生的诱导剂，能够重现以上 AS 保护特性，可以作为 AS 相关血管疾病的治疗方法。

5 小结与展望

AS 严重影响着全球的疾病负担，巨噬细胞作为 AS 病变过程中胆固醇代谢和炎症反应的共同参与者，在 AS 的预防和治疗研究中发挥不可替代的作用。巨噬细胞存在的多种不同作用的功能表型是目前研究的热点，可通过调节巨噬细胞向抗 AS 表型的转化，预防或抑制 AS 斑块的发生和进展。但巨噬细胞对复杂微环境的敏感性是体内研究的难点，靶向性治疗的有效性需要在体内实验中得到验证。本文系统的阐述巨噬细胞在 AS 斑块形成中的作用机制以及最新研究进展，以期为后期的研究提供理论依据及研究方向。

参考文献

- [1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017:a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2018, 392(10159):1684-1735.
- [2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(03), 209-220.
- [3] Bian T, Li H, Zhou Q, et al. Human β -Defensin 3 Reduces TNF- α -Induced Inflammation and Monocyte Adhesion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017(9):8529542.
- [4] Kathryn J. Moore, Ira Tabas. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3):341-355.
- [5] Thaler B, Baik N, Hohensinner PJ, et al. Differential expression of Plg-RKT and its effects on migration of proinflammatory monocyte and macrophage subsets[J]. Blood. 2019;134(6):561-567.
- [6] Yu H C, Bai L, Yang Z X, et al. Blocking Notch signal in myeloid cells alleviates hepatic ischemia reperfusion injury by repressing the activation of NF- κ B through CYLD[J]. entific Reports, 2016, 6:32226.
- [7] Chistiakov D A, Bobryshev Y V, Orekhov A N. Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis[J]. J CELL MOL MED, 2015, 19(6):1163-1173.
- [8] Martinez F O, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization[J]. Frontiers in Bioence, 2008, 13(13):453-461.
- [9] Zizzo G, Guerrieri J, Dittman LM, et al. Circulating levels of soluble MER in lupus reflect M2c activation of monocytes/macrophages, autoantibody specificities and disease activity[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(6):R212. 3508-3520.
- [10] Erbel C, Tyka M, Helmes C M, et al. CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo[J]. Innate Immun, 2015, 21(3):255-265.
- [11] Boyle JJ, Johns M, Kampfer T, et al. Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection[J]. Circ Res. 2012;110(1):20-33.

- [12] Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(15):5374-5379.
- [13] Kunjathoor V V, Febbraio M, Podrez E A, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51):49982-49988.
- [14] Hashimoto R, Kakigi R, Miyamoto Y, et al. JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 871:172940.
- [15] Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, et al. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma[J]. *Cell*, 1998, 93:229-240.
- [16] Manning-Tobin J J, Moore K J, Seimon T A, et al. Loss of SR-A and CD36 Activity Reduces Atherosclerotic Lesion Complexity Without Abrogating Foam Cell Formation in Hyperlipidemic Mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(1):19-26.
- [17] Yang L, Yang JB, Chen J, et al. Enhancement of human ACAT1 gene expression to promote the macrophage-derived foam cell formation by dexamethasone[J]. *Cell Res*, 2004, 14(4):315-323.
- [18] Nguyen T M, Sawyer J K, Kelley K L, et al. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption:evidence from thoracic lymph duct cannulation[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(1), 95-104.
- [19] Yang JB, Duan ZJ, Yao W, et al. Synergistic transcriptional activation of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 gene by interferon-gamma and all-trans-retinoic acid THP-1 cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24):20989-20998.
- [20] Ge J, Zhai W, Cheng B, et al. Insulin induces human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase1 gene expression via MAP kinases and CCAAT/enhancer-binding protein α [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(9):2188-2198.
- [21] Xu J, Hu G, Lu M, et al. MiR-9 reduces human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 to decrease THP-1 macrophage-derived foam cell formation[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2013, 45:953-962.
- [22] Lake N J, Taylor R L, Hugh T, et al. TRAK2, a novel regulator of ABCA1 expression, cholesterol efflux and HDL biogenesis[J]. *EUR HEART J*, 2017, 38(48):3579-3587.

- [23] Sallam T, Jones M, Thomas B J, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA[J]. *Nat Med*, 2018, 24(3), 304-312.
- [24] Ou M, Li X, Zhao S, et al. Long non-coding RNA CDKN2B-AS1 contributes to atherosclerotic plaque formation by forming RNA-DNA triplex in the CDKN2B promoter[J]. *EBioMedicine*, 2020, 55:102694.
- [25] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2018, 560(7717):198-203.
- [26] Kagan JC, Horng T. NLRP3 inflammasome activation:CD36 serves double duty[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8):772-774.
- [27] Lang T, Lee JPW, Elgass K, et al. Macrophage migration inhibitory factor is required for NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2223.
- [28] Sorriento D, Iaccarino G. Inflammation and Cardiovascular Diseases:The Most Recent Findings[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(16):3879.
- [29] Ben J, Jiang B, Wang D, et al. Major vault protein suppresses obesity and atherosclerosis through inhibiting IKK-NF- κ B signaling mediated inflammation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1801.
- [30] Dou F, Chen J, Cao H, et al. Anti-atherosclerotic effects of LXR α agonist through induced conversion of M1 macrophage to M2[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6):3825-3840.
- [31] Poston R N. Atherosclerosis:integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation:a review[J]. *Cardiovasc Endocrinol Metab*, 2019, 8(2):51-61.
- [32] Tabas I, Ron D. Molecular mechanisms integrating pathways of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3):184-190.
- [33] Timmins J, Ozcan L, Seimon T A, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links endoplasmic reticulum stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(10):2925-2941.
- [34] Seimon TA, Nadolski MJ, Liao X, et al. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Metab*, 2010, 12(5):467-482.
- [35] Sergin I, Evans TD, Zhang X, et al. Exploiting macrophage autophagy-lysosomal biogenesis as a therapy for atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15750.