

荧光标记胆固醇用于测定人单核巨噬细胞脂质外流

宋 玮, 王 伟, 王 雨, 窦 丽 阳, 陈 连 凤, 严 晓 伟

(北京协和医院心内科, 北京市 100730)

[关键词] 胆固醇外流; 巨噬细胞; 荧光标记的胆固醇; 高密度脂蛋白; 载脂蛋白 A1

[摘要] **目的** 利用荧光标记的胆固醇(NBD-胆固醇)建立测定人巨噬细胞胆固醇外流的新方法,并与传统同位素标记胆固醇的测定方法进行比较。**方法** 提取受试者外周血单核细胞分化为人巨噬细胞。体外培养人单核细胞系 THP-1 及鼠单核细胞系 J774。以不同浓度的 NBD-胆固醇孵育 THP-1 细胞,观察胆固醇浓度和孵育时间对细胞摄取的影响。用荧光酶标仪测定荧光信号强度以反映胆固醇摄取和外流。分别在三种细胞中测量 NBD-胆固醇外流率,并在原代人巨噬细胞中观察与同位素标记胆固醇外流率的相关性。**结果** NBD-胆固醇孵育细胞后迅速分布于细胞器中,但不进入细胞核。细胞对 NBD-胆固醇的摄取有浓度依赖性,但达峰时间不受浓度影响。NBD-胆固醇外流率在各种巨噬细胞中呈现相似趋势,由载脂蛋白 A1 和高密度脂蛋白诱导的外流率在诱导外流 4 h 达到平台期。³H-胆固醇外流率在人巨噬细胞中与 NBD-胆固醇外流率显著相关($r=0.968, P<0.001$)。**结论** NBD-胆固醇是一种有效的、敏感且环保的探针,可替代同位素标记的胆固醇用于巨噬细胞外流率的测定。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

A New Assay of Cholesterol Efflux Rate in Human Peripheral Blood Monocyte Cells by Fluorescent Labeled Cholesterol

SONG Wei, WANG Wei, WANG Yu, DOU Li-Yang, CHEN Lian-Feng, and YAN Xiao-Wei

(Department of Cardiology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Cholesterol Efflux; Macrophages; NBD-cholesterol; High Density Lipoprotein; Apolipoprotein A1

[ABSTRACT] **Aim** In this study, fluorescence labeled cholesterol (NBD-cholesterol) was used to establish a new method to evaluate the cholesterol efflux, and compared NBD-cholesterol with ³H-cholesterol in assay of cholesterol efflux. **Methods** Isolated human peripheral blood monocyte cells from volunteers were differentiated into human macrophages. Human monocyte line THP-1 and mouse monocyte line J774 cells were cultured in vitro. THP-1 macrophages were incubated with different concentrations of NBD-cholesterol to choose an optimistic concentration and incubation time. NBD-cholesterol efflux rate was evaluated from three different kinds of macrophages. NBD-cholesterol uptake and efflux rate were reflected by fluorescent intensity measurement by multi-label counter. The NBD-cholesterol efflux capacity in human macrophages was estimated by the correlation to ³H-cholesterol efflux in human macrophages. **Results** NBD-cholesterol distributed rapidly into cells organelles except nucleus. Uptake of NBD-cholesterol in THP-1 macrophages was concentration dependent, but time to plateau was not dependent on concentration. NBD-cholesterol efflux rate reflected an appropriate cholesterol efflux rate in human macrophages, THP-1 macrophages and mouse macrophages. Both apolipoprotein A1 mediated and HDL mediated ³H-cholesterol efflux rates were significant correlated to NBD-cholesterol efflux rate in human macrophages ($r=0.968, P<0.001$). **Conclusion** NBD-cholesterol was a useful, sensitive and environmental protective probe for assay of human macrophage cholesterol efflux rate.

胆固醇逆转运(RCT)是将外周组织中过剩的胆固醇经由高密度脂蛋白(HDL)转运至肝组织的

过程。巨噬细胞胆固醇外流是胆固醇逆转运的起始步骤^[1]。Ross^[2]提出动脉粥样硬化(As)与脂质

[收稿日期] 2011-12-15

[作者简介] 宋玮,博士,主要从事动脉粥样硬化、血脂代谢研究,E-mail为 songwei8124@yahoo.com.cn。通讯作者严晓伟,教授,博士研究生导师,主要从事脂质代谢异常、代谢综合征及动脉粥样硬化的发病机制及预防研究,E-mail为 xsxy_pumc@yahoo.com.cn。

沉积有关。脂质过量沉积的巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块中的主要细胞成分。有证据表明,游离胆固醇能够引起细胞凋亡^[3],巨噬细胞胆固醇外流率和颈动脉内膜厚度相关^[4]。因此,在As中评价巨噬细胞的胆固醇外流功能局部代表了胆固醇逆转能力,有助于进一步了解As的发展过程。

人单核巨噬细胞系 THP-1 和鼠巨噬细胞系 J774 常用于巨噬细胞体外功能研究。细胞吞噬同位素标记的胆固醇,以不同的接受体诱导外流是测定胆固醇外流的常用方法。同位素气标记的胆固醇(³H-胆固醇)是目前测量胆固醇外流率的金标准,但由于核废弃物的处理和繁琐的步骤限制了广泛应用。荧光标记的胆固醇(NBD-胆固醇)是将NBD荧光基团标记于胆固醇烷基基团,根据连接位置不同目前有三种商品化的NBD-胆固醇,分别为NBD荧光基团连接于胆固醇第22位碳侧链上(22-NBD-胆固醇)、NBD荧光基团通过不同长度的碳链(C6和C12)连接于胆固醇的3 β 羟基端及NBD荧光基团连接于胆固醇第25位碳侧链上(25-NBD-胆固醇)。其共同特点为在波长为激发光469 nm和发射光537 nm处发出绿色荧光,荧光强度和胆固醇浓度成正比^[5,6]。NBD-胆固醇为环境敏感物质,微溶于水,溶于非极性液体。目前多用于固醇载体蛋白和类固醇生成急性期调节蛋白的研究中^[7,8],也有用于研究细胞对脂质的胞吞作用中^[9],在测量胆固醇外流中尚无报道。因此,本研究选取与天然胆固醇结构和分子量最为接近的22-NBD-胆固醇,以期建立测定巨噬细胞胆固醇外流的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

人单核细胞系 THP-1 和鼠单核细胞系 J774 购自中国医学科学院基础所;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;佛波酯(PMA)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、NBD-胆固醇、载脂蛋白 A1(ApoA1)及 HDL 购自 Sigma 公司;人单核细胞分离液购自天津灏阳公司。

1.2 THP-1 和 J774 细胞培养

以含20%胎牛血清的RPMI1640培养基体外培养THP-1和J774细胞。以 2×10^6 个细胞接种于12孔板,100 $\mu\text{g/L}$ PMA诱导THP-1细胞分化为巨噬细胞。以不同浓度的NBD-胆固醇(0.1、1、5及10 $\mu\text{mol/L}$)溶解于无酚红的RPMI1640培养基中干预细胞。THP-1分化为巨噬细胞后,以5 $\mu\text{mol/L}$

NBD-胆固醇孵育液干预50 mg/L ox-LDL或ac-LDL负载的细胞。以清道夫受体B1(SR-B1)抑制剂BLT-1预孵育细胞2 h后,与NBD-胆固醇共孵育。在不同时间点收集细胞,以0.1% Triton-X100裂解细胞,测定荧光强度(FI)。

NBD-胆固醇测定细胞胆固醇外流,以5 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇孵育细胞4 h后,以PBS缓冲液洗涤细胞3次,分别以含有ApoA1和HDL的诱导外流液干预细胞。在不同时间点(30 min、1 h、2 h、4 h、6 h和8 h)收集诱导外流液和细胞裂解液,测定FI。

1.3 原代人外周血单核细胞的分离及培养

受试者签订知情同意后,留取30 mL肝素抗凝外周血,密度梯度离心法提取人外周血单核细胞,流式细胞仪CD14抗体鉴定细胞活力并确保纯度大于85%。10 $\mu\text{g/L}$ M-CSF诱导分化为巨噬细胞用于胆固醇外流的测定。

1.4 FI的测定

NBD-胆固醇浓度与其荧光信号强度成正比。以细胞裂解液FI反映细胞对NBD-胆固醇的摄取。以诱导外流液和细胞裂解液的FI计算外流率。将细胞裂解液和诱导外流液12000 g离心10 min,除去细胞碎片,以96孔黑色酶标板在荧光酶标仪激发光469 nm和发射光537 nm处测定FI。胆固醇外流率 = 诱导外流液 FI / (诱导外流液 FI + 细胞裂解液 FI) $\times 100\%$ 。

1.5 ³H-胆固醇外流率的测定

以含有1 mCi/L ³H-胆固醇和10% FBS的培养基孵育细胞12 h。弃胆固醇孵育液,PBS洗涤细胞3次,用0.2% FBS的培养基同步化2 h。分别以含有ApoA1和HDL接受体的诱导外流液孵育细胞4 h。收集外流液和细胞裂解液与闪烁液避光共孵育24 h后,于Beckman液闪计数器进行液闪计数。胆固醇外流率 = 外流液计数 / (外流液计数 + 裂解液计数) $\times 100\%$ 。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,GraphPad prism 4软件用于统计分析及绘图。组间比较用单因素方差分析,相关分析用Deming regression法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各组数据重复3次。

2 结果

2.1 THP-1 巨噬细胞对 NBD-胆固醇的摄取

在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组,20 min后FI值升高($P = 0.039$),30 min后FI值显著增加($P < 0.01$);摄

入曲线表明,胆固醇浓度越高,FI 值越高,巨噬细胞对胆固醇的摄入有浓度依赖性。在各浓度组中,胆固醇摄入曲线呈 S 型,FI 值在胆固醇孵育细胞 6 h 后不再增高,NBD-胆固醇摄入达平台期时间不受胆固醇浓度的影响(图 1A)。细胞吞噬 NBD-胆固醇后均匀分布于细胞器,而 NBD-胆固醇并不进入细胞核(图 1B 和 1C)。根据上述结果,本研究采用 5 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇、孵育时间 4 h,测定人巨噬细胞胆固醇外流率。

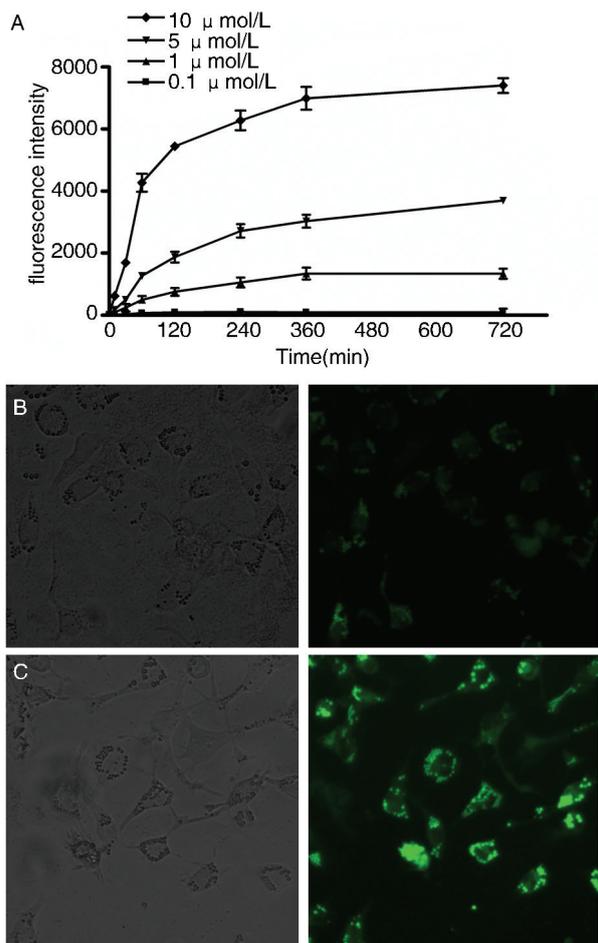


图 1. THP-1 巨噬细胞对 NBD-胆固醇的摄取 图 1A 分别以 0.1、1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇孵育液作用细胞,在不同时间点收集细胞裂解液测定 FI 值。图 1B 和 1C 分别以 0.1 和 1 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇孵育液作用细胞,30 min 后荧光显微镜拍照($\times 200$)。

Figure 1. THP-1 macrophages on the uptake of NBD-cholesterol

2.2 修饰的 LDL 和 BLT-1 对巨噬细胞 NBD-胆固醇摄取的影响

5 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇孵育细胞 30 min 后,负载 ac-LDL 的巨噬细胞 FI 值显著高于无负载组($P < 0.01$)。负载 ox-LDL 的巨噬细胞对 NBD-胆固醇的

摄取与无负载的细胞相比明显受抑制($P < 0.01$; 图 2A)。巨噬细胞与 BLT-1 预孵育 2 h,以 0.1 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇孵育液作用细胞,BLT-1 在各个时间点显著抑制 NBD-胆固醇的摄入(图 2B),提示巨噬细胞对 NBD-胆固醇的摄取可能主要通过 SR-B1 调节。

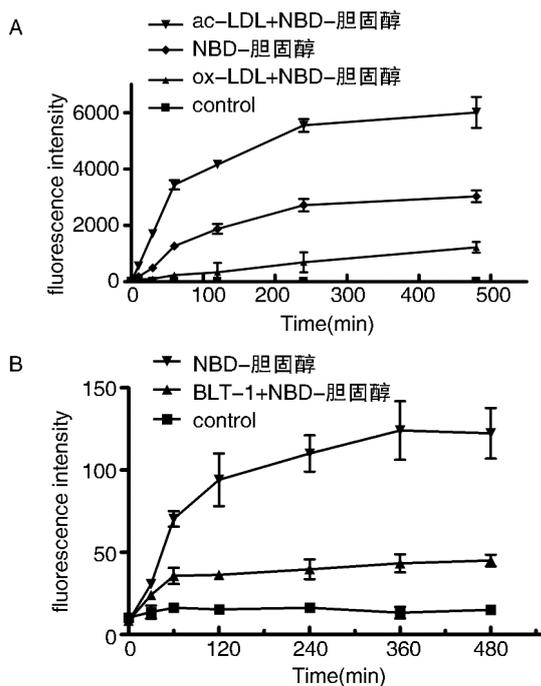


图 2. 修饰的 LDL 和 BLT-1 对巨噬细胞摄取 NBD-胆固醇的影响 图 2A 以 50 mg/L ac-LDL 或 ox-LDL 预孵育 THP-1 诱导的巨噬细胞 2 h,再以 5 $\mu\text{mol/L}$ 胆固醇干预细胞,在不同的时间点测定 FI 值。图 2B 以 100 $\mu\text{mol/L}$ BLT-1 预孵育细胞 2 h,加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ NBD-胆固醇共孵育细胞,不同时间点收集细胞裂解液测定 FI 值。

Figure 2. The effects of modified LDL and BLT-1 on the uptake of NBD-cholesterol of macrophages

2.3 NBD-胆固醇在人原代巨噬细胞、人单核细胞系 THP-1 和鼠巨噬细胞系 J774 中的外流率

在三种不同细胞中,以 ApoA1 为接受体的 NBD-胆固醇外流率曲线形态一致,胆固醇外流率 1 h 内快速增高,2 h ~ 4 h 随诱导外流时间延长而增加,4 h 达到平台期,人巨噬细胞的外流率高于单核细胞系的外流率(图 3A)。HDL 诱导的胆固醇外流率在人原代巨噬细胞的外流率仍然高于巨噬细胞系,HDL 诱导胆固醇外流曲线在 1 h 内快速增加,2h ~ 4 h 曲线平缓上升,4 h 后达平台期(图 3B)。

2.4 ^3H -胆固醇和 NBD-胆固醇在人原代巨噬细胞中外流率的相关性

用 Deming 回归分析相同个体的 ^3H -胆固醇和 NBD-胆固醇外流率的相关性,结果显示 ApoA1 诱导

的³H-胆固醇和NBD-胆固醇外流率有显著相关性($r = 0.939, P < 0.001$; 图4A)。在人巨噬细胞中,由HDL诱导的³H-胆固醇和NBD-胆固醇外流率也表现为显著相关($r = 0.942, P < 0.001$; 图4B)。NBD-胆固醇可作为³H-胆固醇的替代物用于研究巨噬细胞胆固醇外流。

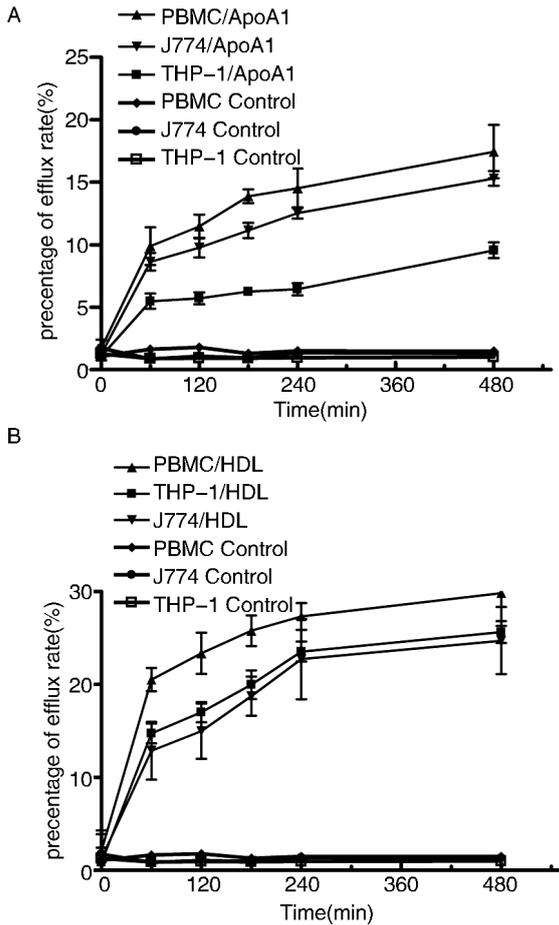


图3. 测定NBD-胆固醇在不同细胞系以ApoA1和HDL为接受体的胆固醇外流率 图3A以含50 mg/L ApoA1诱导外流液孵育细胞,计算不同时间点外流率。图3B将含20 mg/L HDL诱导外流液孵育细胞,计算不同时间点外流率。

Figure 3. Determination of NBD-cholesterol to ApoA1 and HDL-cholesterol efflux rate of receptor in the different cell lines

3 讨论

本研究中,细胞对NBD-胆固醇的摄取虽然有浓度依赖性,但摄入平衡不受饱和浓度的影响,各浓度组在孵育6 h达到平台期。这和文献报道在小鼠肝脏细胞对NBD-胆固醇的摄取相类似,但肝细胞在孵育10 min后即达到平台期,这可能是由于各种细胞对胆固醇摄取能力的不同^[8]。细胞对³H-胆固醇

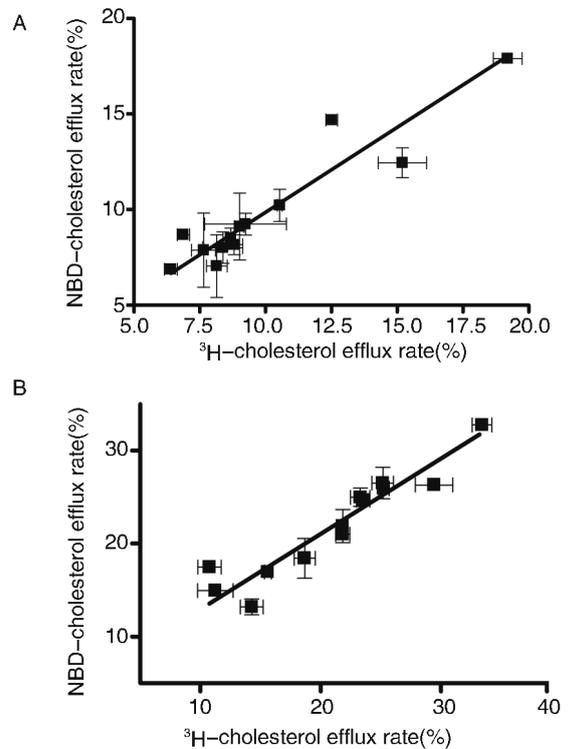


图4. NBD-胆固醇和³H-胆固醇在人原代巨噬细胞中的相关性 图4A以50 mg/L ApoA1诱导外流液作用细胞,分别测定胆固醇外流率($n = 13$)。图4B以20 mg/L HDL诱导外流液作用细胞,分别测定胆固醇外流率($n = 13$)。

的摄入至少需要12 h^[10]。在测定外流率时,还需要同步化使之均匀分布于细胞器中。在THP-1细胞中,NBD-胆固醇孵育细胞30 min后,显微镜下可见NBD荧光分布于除细胞核以外的细胞器中。NBD-胆固醇与³H-胆固醇跨膜转运动力学机制不同可能是由于NBD标签连于胆固醇的亲水末端。这种快速分布易于高通量评价细胞胆固醇外流功能。NBD-胆固醇在THP-1巨噬细胞的摄取主要通过SR-B1途径,这一结果与在小鼠肝细胞的结论一致,但本研究发现负载ox-LDL和ac-LDL的巨噬细胞对NBD-胆固醇的摄取能力不同;Storey等^[8]研究发现负载LDL和HDL的细胞对NBD-胆固醇的摄取不同,这说明同种细胞的不同状态也会影响NBD-胆固醇的摄取。另有研究证实,ox-LDL可能抑制SR-B1的表达,因此ox-LDL也可能通过抑制SR-B1降低对NBD-胆固醇的摄取^[11]。

长时间的胆固醇孵育,在细胞的酶类作用下,胆固醇转化为胆固醇酯。文献报道,在NBD-胆固醇孵育24 h后,只有7.8%被酯化,且不影响荧光信号强度^[12]。另有研究指出,摄入细胞的胆固醇中96%以上的NBD-胆固醇以非酯化的形式存在^[13]。因此,在测定细胞胆固醇外流研究中,短时间的

NBD-胆固醇孵育不需要抑制胆固醇酯化,减少了测定胆固醇外流的冗繁步骤。

在荧光光密度值测定中,值得注意的问题是自发荧光的干扰。酚红试剂是培养基中的一种酸碱指示剂,它干扰荧光光谱测量。NBD-胆固醇的摄取和外流测定是基于荧光值的测定,因此我们以无酚红的培养基降低背景荧光值。有研究指出,影响荧光强度测定干扰物质的荧光信号需要被淬灭后才能进行荧光值的测定^[14,15]。因此,我们认为培养基中某些成份的自发荧光光谱可能与 NBD 荧光光谱相重叠,在进行荧光检测前需除外这些干扰因素的影响。

细胞内胆固醇外流通路主要包括 ATP 结合盒转运子、SR-B1 和水相扩散^[16]。ATP 结合盒转运子中,ATP 结合盒转运子 A1 (ABCA1) 和 G1 (ABCG1) 在巨噬细胞胆固醇外流中具有重要的调节作用^[17]。ABCA1 主要介导胆固醇外流至乏脂的脂蛋白 A1 接受体 ApoA1^[18], ABCG1 主要参与以 HDL 为接受体的胆固醇外流^[19],而 SR-B1 作用微弱^[20]。虽然巨噬细胞胆固醇外流在胆固醇逆转运中所占比例并不大,但许多研究表明,ABCA1 和 ABCG1 在胆固醇逆转运中对 As 的发生发展起到保护作用^[21-24]。因此,本研究以 ApoA1 和 HDL 为接受体,测定 NBD-胆固醇外流率,能够很好的评价细胞 ABCA1 和 ABCG1 的功能。在本研究中,以 50 mg/L ApoA1 作为接受体,观察 NBD-胆固醇在 THP-1 诱导的巨噬细胞中有适当的外流率,并发现在人巨噬细胞中由 ABCA1 介导的 NBD-胆固醇和³H-胆固醇测定的外流率显著相关,这一结果与 Zhang 等^[14]的研究结论不一致,Zhang 等认为在 THP-1 细胞中 NBD-胆固醇不能用于测定 ABCA1 介导的胆固醇外流。分析其原因:①在 THP-1 中,细胞摄取 NBD-胆固醇的平台期较长,可能由于孵育时间不足导致 NBD-胆固醇在细胞内没有达到饱和,影响了外流率的测定;② ApoA1 作为胆固醇外流的接受体,其浓度过低会影响外流率的测定;③比较重要的问题,我们在前文提到要排除其他物质自发荧光的干扰,Zhang 等的研究中选用的细胞裂解液成分中含有十二烷硫酸钠,有研究指出后者能淬灭荧光信号^[15]。虽然目前在动物实验和人体研究中对 ABCG1 是否是 As 的保护因子产生了争论^[25,26],但联合敲除 ABCA1 和 ABCG1 会导致过量脂质沉积在组织中的巨噬细胞内^[21,27]。在人巨噬细胞中,观察 ABCG1 介导 NBD-胆固醇外流至 HDL 接受体与³H-胆固醇的外流率也有显著的关联。因此我们得出结论,NBD-胆固醇可

用于反映 ABCA1 及 ABCG1 介导巨噬细胞外流的功能,替代放射性物质标记的胆固醇测定细胞外流率。近年来,出现了其他荧光标记的胆固醇用于胆固醇与细胞相互作用的研究中,如 DHE、BODITY 和绿色荧光蛋白标记物等^[14,28,29],这些新的荧光标记胆固醇在不同的细胞内均表现出良好的潜质,替代放射性物质标记的胆固醇用于脂质的细胞间相互作用的研究。

近期研究证实巨噬细胞的胆固醇外流功能与心血管疾病相关,胆固醇外流功能以及颈动脉内膜厚度是冠心病的预测因子^[4];糖尿病患者巨噬细胞胆固醇外流率明显下降^[30],巨噬细胞胆固醇外流功能有可能成为 As 相关疾病的独立预测因子。NBD-胆固醇可作为一种高通量,环保且能模拟天然胆固醇的物质,用于巨噬细胞胆固醇外流功能测定,有助于了解 As 疾病的发展过程。

[参考文献]

- [1] Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis[J]? *Circulation*, 2006, 113 (21): 2 548-555.
- [2] Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis [J]. *Science*, 1973, 180 (4093): 1 332-339.
- [3] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (45): 42 468-476.
- [4] Khera AV, Cuchel M, de L-M et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (2): 127-135.
- [5] Rader DJ. Mechanisms of disease: HDL metabolism as a target for novel therapies[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4 (2): 102-109.
- [6] 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.
- [7] Petrescu AD, Gallegos AM, Okamura Y, et al. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (40): 36 970-982.
- [8] Storey SM, Atshaves BP, McIntosh AL, et al. Effect of sterol carrier protein-2 gene ablation on HDL-mediated cholesterol efflux from cultured primary mouse hepatocytes [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299

- (1): G244-G254.
- [9] Takahashi M, Murate M, Fukuda M, et al. Cholesterol controls lipid endocytosis through Rab11 [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18 (7): 2 667-677.
- [10] Falchi AM, Battetta B, Sanna F, et al. Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53 (2): 318-329.
- [11] Guan S, Wang B, Li W, et al. Effects of berberine on expression of LOX-1 and SR-BI in human macrophage-derived foam cells induced by ox-LDL [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38 (6): 1 161-169.
- [12] Frolov A, Petrescu A, Atshaves BP, et al. High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (17): 12 769-780.
- [13] Atshaves BP, Starodub O, McIntosh A, et al. Sterol carrier protein-2 alters high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (47): 36 852-861.
- [14] Zhang J, Cai S, Peterson BR, et al. Development of a cell-based, high-throughput screening assay for cholesterol efflux using a fluorescent mimic of cholesterol [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2011, 9 (2): 136-146.
- [15] Zhu C, Zheng H, Li D, et al. Fluorescence quenching method for the determination of sodium dodecyl sulphate with near-infrared hydrophobic dye in the presence of Triton X-100 [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2004, 60 (13): 3 173-179.
- [16] Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48 (11): 2 453-462.
- [17] 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 (8): 2 216-224.
- [18] Mulya A, Lee JY, Gebre AK, et al. Minimal lipidation of pre-beta HDL by ABCA1 results in reduced ability to interact with ABCA1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (8): 1 828-836.
- [19] Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins [J]. *J Intern Med*, 2008, 263 (3): 256-273.
- [20] Zhao Y, Van Berkel TJ, Van EM. Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2010, 21 (5): 441-453.
- [21] Out R, Hoekstra M, Habets K, et al. Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28 (2): 258-264.
- [22] Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (2): 139-143.
- [23] Parathath S, Mick SL, Feig JE, et al. Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism [J]. *Circ Res*, 2011, 109 (10): 1 141-152.
- [24] Patel DC, Albrecht C, Pavitt D, et al. Type 2 diabetes is associated with reduced ATP-binding cassette transporter A1 gene expression, protein and function [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (7): e22142.
- [25] Burgess B, Naus K, Chan J, et al. Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28 (10): 1 731-737.
- [26] Xu Y, Wang W, Zhang L, et al. A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population [J]. *Atherosclerosis*, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.043.
- [27] Out R, Jessup W, Le GW, et al. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1 [J]. *Circ Res*, 2008, 102 (1): 113-120.
- [28] Holtta-Vuori M, Uronen RL, Repakova J, et al. BODIPY-cholesterol: a new tool to visualize sterol trafficking in living cells and organisms [J]. *Traffic*, 2008, 9 (11): 1 839-849.
- [29] Lee TS, Pan CC, Peng CC, et al. Anti-atherogenic effect of berberine on LXRA α -ABCA1-dependent cholesterol efflux in macrophages [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111 (1): 104-110.
- [30] Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, 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): 2 785-792.

(此文编辑 文玉珊)