



Universiteit
Leiden
The Netherlands

ABC-transporters and lipid transfer proteins : important players in macrophage cholesterol homeostasis and atherosclerosis

Ye, D.

Citation

Ye, D. (2008, November 4). *ABC-transporters and lipid transfer proteins : important players in macrophage cholesterol homeostasis and atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13220>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13220>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 10

SUMMARIES AND PERSPECTIVES

Contents

- 10.1 English summary
- 10.2 Nederlandse samenvatting
- 10.3 中文综述

10.1 English summary

Pathologic changes caused by atherosclerosis in the cardiovascular system, such as coronary heart disease, aneurysms of the aorta, and infarction/ischemia of the brain or limbs, are nowadays the most profound threat to the quality and expectancy of life in developed countries.¹ A pathological hallmark of atherosclerosis is the excessive accumulation of cholesterol by macrophages leading to their transformation into foam cells.² Macrophages are present in all stages of atherosclerotic lesion development from fatty streak to complicated atherosclerotic plaque. Especially in the initiation of atherosclerosis, cholesterol homeostasis in macrophages is of prime importance, as dysregulation of the balance of cholesterol influx and cholesterol efflux will lead to excessive accumulation of cholesterol in the macrophage and their transformation into foam cells. Macrophages in atherosclerotic lesions primarily depend on infiltration of bone marrow-derived monocytes into the arterial wall. In this thesis, we used bone marrow transplantation (BMT) to modulate genes in hematopoietic cells, including macrophages. Using this technique and several available knockout and transgenic mice, the role of some important players involved in cellular cholesterol homeostasis, inflammation, and atherogenesis were evaluated.

10.1.1 The role of ABC-transporters in macrophage cholesterol homeostasis and atherogenesis

As scavenger cells, macrophages ingest modified lipoproteins and damaged cell membranes and thus can accumulate large amounts of cholesterol and oxysterols. Interestingly, cholesterol and oxysterols are inducers for several ATP-binding cassette (ABC) transporters, which constitute a group of evolutionary highly conserved cellular transmembrane transport proteins that use ATP to generate the energy needed to transport metabolites across membranes.³ It is thus conceivable that a significant portion of the cholesterol-responsive ABC-transporters may be involved in macrophage lipid homeostasis. In the “classical” concept of reverse cholesterol transport, a process by which excess cholesterol from peripheral tissues is transferred via the plasma to the liver for elimination via the bile, the liver is often referred to as being the major organ capable to eliminate

cholesterol, and therefore is essential for the protection against excessive accumulation of lipids in macrophages and the prevention of atherosclerosis. The liver contains several different cell types, including parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. After the general introduction, in **chapter 2**, we provided comprehensive data of ABC-transporter expression profiles in various cell types of the mouse liver, including parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. Our findings underscore the importance of cellular localization for studying the regulation of key ABC-transporters in liver cholesterol homeostasis. Furthermore, several novel ABC-transporters, including ABCA5, B9, D3, and D4 were identified as putative novel candidates involved in liver macrophage cholesterol homeostasis.

Macrophages cannot limit their uptake of cholesterol via scavenger receptors.⁴ Therefore, cholesterol efflux is an important mechanism to maintain cholesterol homeostasis in macrophages. A key transporter involved in the efflux of cholesterol and phospholipids from macrophages is ABCA1.^{5,6} In **chapter 3**, we used the BMT technique to investigate the therapeutic potential of specific up-regulation of macrophage ABCA1 on atherogenesis in low-density lipoprotein (LDL) receptor knockout (LDLr^{-/-}) mice, which represent an established model for the development of atherosclerosis. Our data reveal that macrophage ABCA1 overexpression inhibits the progression of atherosclerosis and thus is an attractive therapeutic target for the prevention of atherosclerotic lesion development.

In addition to the inhibition of atherosclerotic lesion development, atherosclerosis regression is another important clinical goal, since most patients enter the clinic with established atherosclerotic lesions. It is thus highly important not simply to inhibit atherosclerosis progression, but to treat this disease by regressing established atherosclerosis. In **chapter 4**, the possibly therapeutic effect of macrophage ABCA1 overexpression on atherosclerosis regression was investigated in LDLr^{-/-} mice with established lesions. Our data indicate that specific up-regulation of macrophage ABCA1 inhibits the progression of small atherosclerotic lesions, but not of more advanced lesions. Furthermore, macrophage ABCA1 overexpression does not induce the regression of established lesions, either in the early or in the later stages of atherosclerosis. An important conclusion from these studies is that BMT is not a good technique to sufficiently modulate the expression of genes in macrophages which are already inside established lesions. However, our findings do point out that the BMT technique is very useful to study the dynamics of macrophage infiltration in different stages of atherosclerosis. This is important for the development of therapies that may potentially prevent infiltration of new macrophages into established plaques, thereby preventing further growth of lesions. Combined with therapeutic approaches that increase cholesterol efflux from macrophages inside established plaques, atherosclerosis regression can possibly be achieved.

In the studies described in **chapter 2**, ABCA5 was identified as a new transporter relevant for lipid homeostasis in the liver. Interestingly, ABCA5 and ABCA1 in macrophages show similar up-regulation during *in vitro* cholesterol loading and down-regulation during cholesterol unloading.⁷ It is thus conceivable that ABCA5 may play a potential role in macrophage cholesterol homeostasis. However, the *in vivo* effects of macrophage

ABCA5 expression are largely unknown. To assess the biological role of macrophage ABCA5 in lipoprotein metabolism and atherosclerotic lesion development, in **chapter 5** we used the BMT technique to specifically disrupt ABCA5 function in hematopoietic cells, including macrophages, by transferring bone marrow from ABCA5 knockout mice into LDLr^{-/-} mice. Our data demonstrate that ABCA5 potentially affects macrophage cholesterol homeostasis. Disruption of macrophage ABCA5 function did not affect initial lesion development in male LDLr^{-/-} mice. Atherosclerosis in female LDLr^{-/-} mice, which are more susceptible to lesion development, however, was increased in the absence of functional ABCA5 in macrophages. Furthermore, our *in vitro* data indicated that ABCA1 may functionally compensate for the lack of ABCA5 in macrophages. Therefore, the generation of ABCA1 and ABCA5 double knockout mice is worth exploiting to clarify the exact role of macrophage ABCA5 in atherosclerosis.

10.1.2 The role of lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis

High-density lipoprotein (HDL) has been identified as a potential target for the treatment of atherosclerosis. HDL consists of a heterogeneous population of lipid-bearing particles that vary in size, structure, composition and activity. Small, discoidal, lipid-poor HDL particles (called pre β -HDL) are effective acceptors of free cholesterol from cells to initiate reverse cholesterol transport. The formed large, spherical, cholesterol ester-rich HDL particles (α -HDL) subsequently serve as preferred substrates for the scavenger receptor type BI to facilitate delivery of cholesterol esters to the liver and steroidogenic tissues. The genes encoding two HDL-associated proteins that are essential for the conversion or 'remodeling' of HDL between its various subtypes have been identified as phospholipid transfer protein (PLTP) and cholesterol ester transfer protein (CETP). In human homozygous CETP deficiency, HDL levels are massively elevated, while LDL levels are moderately decreased.⁸ Plasma PLTP activity was recently reported to be related to cardiovascular diseases (CVD) in humans.⁹ However, no human PLTP deficiency state has been described until now. Interestingly, both PLTP and CETP were demonstrated in lipid-laden macrophage-derived foam cells in human atherosclerotic lesions.¹⁰⁻¹⁴ These findings raised the question whether PLTP or CETP has a direct role in cholesterol retention or removal from foam cells present in atherosclerotic lesions. In order to study the role of macrophage-derived PLTP in lipoprotein metabolism and atherogenesis, bone marrow from PLTP knockout mice was transplanted into LDLr^{-/-} mice (**chapter 6**). Our findings indicate that macrophage PLTP is a significant contributor to plasma PLTP activity and that deficiency of PLTP in macrophages results in increased apoA-I and decreased VLDL/LDL levels, which may explain why deficiency of PLTP in macrophages leads to a decrease in atherosclerotic lesion development in LDLr^{-/-} mice. In order to study the role of macrophage-derived CETP in lipoprotein cholesterol redistribution and atherogenesis, bone marrow from CETP transgenic mice, which express the human CETP transgene under control of its natural promoter and major regulatory elements, was transplanted into LDLr^{-/-} mice (**chapter 7**). We showed for

the first time that bone marrow-derived CETP is an important contributor to total serum CETP activity and mass. Furthermore, bone marrow-derived CETP was found to modulate lipoprotein metabolism by mediating the redistribution of cholesteryl esters from HDL to apoB-containing lipoproteins, and thus promoting the development of atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice with impaired clearance of apoB-containing lipoproteins.

Macrophage foam cells are primarily restricted to atherosclerosis, whereas activated macrophages are a common feature of many inflammatory diseases. Importantly, CETP belongs to the family of lipid transfer/lipopolysaccharide-binding proteins, together with PLTP, bactericidal permeability increasing protein (BPI) and LPS-binding protein (LBP).¹⁵ LPS administration to hamsters with endogenous CETP expression or to transgenic mice expressing human CETP induced a rapid decrease in serum CETP concentration,^{16,17} suggesting that CETP with its molecular mimicry to LBP might be able to modulate the LPS response and thus can play a role in innate immunity in addition to its role in HDL metabolism. In **chapter 8**, we assessed leukocyte CETP production in acute coronary syndromes both in humans and in transgenic mice. Our data reveal a strong correlation between diminished leukocyte CETP expression and episodes of unstable angina pectoris in humans. Furthermore, induction of acute myocardial infarction by coronary artery ligation in CETP transgenic mice also resulted in a rapid down-regulation of leukocyte CETP mRNA expression. Both unstable angina pectoris in patients and coronary artery ligation in our mouse model coincided with an increased inflammatory status. Taken together, our data strongly suggest that the reduced leukocyte CETP expression might be common to different inflammatory stimuli, and that leukocyte CETP might serve an important function in the inflammatory/immune response. In **chapter 9**, the possible role for CETP in host defense against systemic inflammation was investigated. As the bioactive component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, LPS stimulates monocytes and macrophages to produce high amounts of pro-inflammatory cytokines, which, in turn, can evoke cytotoxic effects, organ failure and eventually death.^{18,19} To determine the effect of CETP on induction of the pro-inflammatory cytokine TNF- α in the circulation, we challenged CETP transgenic and wild-type mice with a sublethal dose of LPS. Our data demonstrate that CETP lowers TNF- α production induced by LPS. Furthermore, we provided evidence that plasma CETP inhibits the removal of LPS from the blood circulation, and thus modulates the toxicity of LPS, suggesting that CETP is an endogenous component involved in the first line of defense against systemic inflammation. Finally, by using the BMT technique, we evaluated the role of bone marrow-derived CETP in the response to LPS challenge in wild-type mice transplanted with bone marrow from CETP transgenic mice (CETP Tg \rightarrow WT) and nontransgenic littermates (WT \rightarrow WT). Our findings indicate that bone-marrow derived CETP does not contribute to the resistance of CETP transgenic mice to LPS.

10.1.3 Concluding remarks and future perspectives

Over the past decade, clinical trials using LDL-lowering drugs have clearly established that reductions in LDL cholesterol are associated with a 30% to

45% reduction in clinical events.²⁰⁻²³ However, despite lowered LDL, many patients continue to have cardiac events, indicating that there is an important need for new therapeutic strategies.

Since cholesterol efflux from macrophage foam cells in atheromatous blood vessels represents the first step in the overall process of reverse cholesterol transport (RCT), enhancement of macrophage efflux capacity is considered to be an attractive approach to diminish the risk for development of CVD. The focus of the work discussed here has been on the regulation of macrophage cholesterol homeostasis in the microenvironment of the developing atherosclerotic lesion. Using the technique of bone marrow transplantation, we highlighted the potential role of several ABCA-transporters (i.e. ABCA1 and ABCA5) in macrophage cholesterol biology and the onset of atherosclerosis. Our findings indicate that macrophage ABCA1 is an attractive therapeutic target for preventing the development of atherosclerosis. Additionally, ABCA5 can be considered a promising new candidate relevant for cholesterol accumulation in macrophages and thus foam cell formation. Our studies have provided important new insights for the possible therapeutic applicability of specific upregulation of ABCA1 and/or ABCA5 in lesional macrophages, in order to facilitate cholesterol efflux locally in the arterial wall, which is likely to be beneficial in the treatment of atherosclerosis. Further research is needed to find out whether up-regulation of both ABCA1 and ABCA5 in macrophages can exert even better anti-atherogenic effects than single up-regulation of ABCA1.

A therapeutic strategy to up-regulate ABCA1 in macrophages in atherosclerotic lesions is the pharmacological activation of the liver X receptors (LXRs).²⁴⁻²⁷ Two LXR isoforms, LXR α and LXR β , have been identified.^{28,29} Upon stimulation by oxysterols, activated LXR α or LXR β forms a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR), binds to DNA, and influences gene expression. It has been proposed that a high dietary cholesterol intake (via subsequent formation of oxysterols) activates LXRs, which, in turn, induces expression of genes involved in cholesterol disposal.^{30,31} Pharmacological activation of LXRs is considered a promising approach to improve macrophage RCT, and thereby to prevent the development of atherosclerosis. Treatment with LXR agonists leads to elevated plasma HDL-cholesterol levels, reduced intestinal cholesterol absorption, increased hepatobiliary cholesterol secretion, and increased sterol loss via the feces in rodent models.³² However, besides these beneficial effects, pharmacological LXR activation is also associated with increased lipogenesis and production of triglycerides in the liver with resultant hypertriglyceridemia, an independent risk factor for atherosclerosis.^{33,34} These adverse side-effects render the current LXR agonists unsuitable for therapeutic interventions. Two strategies exist to circumvent these problems: targeting to specific tissues or reducing the side-effects in all tissues by designing gene-specific agonists. For example, restricting LXR activation to the small intestine might result in an increase in intestinal HDL formation via ABCA1, without producing fatty liver.³⁵ Furthermore, if one could target an LXR agonist specifically to macrophages, expression of ABCA1 and other genes involved in cellular cholesterol efflux (e.g. ABCG1) could theoretically be enhanced.³⁶ This

would promote RCT in the artery wall, and thereby exert atheroprotective functions without undesirable side-effects.

Low HDL is often present in high-risk patients with CVD.³⁷ HDL-raising therapies have therefore been identified as important new future treatments for CVD. PLTP and CETP are two key genes involved in HDL metabolism, and thus they are promising target genes for pharmaceutical interventions to raise HDL. Using the technique of bone marrow transplantation, we provided evidence that macrophage-derived PLTP or CETP is an important contributor to total plasma activity of these proteins, and that their effects on atherosclerotic lesion development are primarily the consequence of systemic effects on lipoprotein concentrations. CETP production by macrophages, under conditions of impaired clearance of apoB-containing lipoproteins, is highly atherogenic because of its significant contribution to the serum cholesteryl ester transfer capacity. It is thus conceivable that specific inhibition of CETP in macrophages might be an attractive approach to reduce plasma CETP activity and thereby to raise HDL cholesterol levels. The effects of PLTP on lipoprotein metabolism and atherosclerosis are still complex and far from resolved. In this thesis, our findings demonstrate that macrophages PLTP deficiency, under conditions of impaired clearance of apoB-containing lipoproteins, might be anti-atherogenic. Further research, however, is needed to find out whether targeting macrophage-derived PLTP would be a possible therapeutic approach to diminish the risk for development of atherosclerosis.

Since inhibition of CETP reduces apoB lipoproteins and elevates HDL cholesterol levels,³⁸ the inhibition of CETP is considered a potential new mechanism for treatment of dyslipidaemia. Several CETP inhibitors are now in clinical trials, awaiting demonstration of efficacy on atherosclerosis. Torcetrapib, a potent CETP inhibitor, has been shown to increase HDL cholesterol (>3-fold) and inhibit the development of atherosclerosis in rabbits.³⁹ In early-phase studies in humans, the drug increased HDL cholesterol (>60%) and moderately lowered LDL cholesterol.^{40,41} Studies on cardiovascular endpoints, however, were largely disappointing. They confirmed the change in lipid levels, but most also reported an increase in blood pressure, no change in atherosclerosis,^{42,43} and (in a trial of a combination of torcetrapib and atorvastatin) an increase in cardiovascular events and mortality.^{44,45} Of note, significantly more Torcetrapib/Atorvastatin than Atorvastatin-only treated patients died from cancer and infectious disease,⁴⁵ implying that pharmacological inhibition of the CETP activity by Torcetrapib could possibly affect the immune system. The studies described in this thesis suggest a clear association between the expression of CETP in leukocytes and inflammation caused by coronary artery diseases (e.g. angina and ischemia/infarction). The question arises whether reduced leukocyte CETP production is also causal in the negative effects of Torcetrapib treatment. Additionally, some preliminary studies in this thesis indicate that CETP might be important for a general host defense mechanism against LPS-induced systemic inflammation. Taken together, these findings are very important for the continued development of other CETP inhibitors, such as Roche's JTT-705 (R1658), which increases HDL levels by 30% as compared to 60% by Torcetrapib,^{46,47} and Merck's

Anacetrapib (MK-0859), which increases HDL levels by 129% and shows no increase in blood pressure in initial studies.^{48,49} In conclusion, local modulation of macrophage cholesterol metabolism in the arterial wall and systemic regulation of lipoprotein metabolism (LDL-lowering and/or HDL-raising) are both attractive targets for future drug design for the prevention of atherosclerosis. As described in this thesis, bone marrow transplantation can be considered a useful strategy to study the role of macrophage-expressing genes and gene products in lipoprotein metabolism and atherogenesis, which may lead to the identification of target genes for pharmaceutical interventions. Further studies are needed to identify promising targets for cholesterol-lowering therapies at a molecular level. In the future, a more complete understanding of HDL metabolism could lead to the development of drugs that enhance atheroprotection by robustly increasing levels of HDL and/or enhancing its functionality.

10.2 Nederlandse samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn doodsoorzaak nummer 1 in Nederland en andere westerse landen¹. De belangrijkste oorzaak van hart- en vaatziekten is atherosclerose, een vernauwing van de bloedvaten veroorzaakt door plaatselijke ophoping van cholesterol.² Macrofagen spelen een grote rol in alle stadia van de ontwikkeling van (gecompliceerde) atherosclerotische lesies. Macrofagen kunnen cholesterol uit het bloed opnemen. Een ontregeling van de balans tussen de opname en verwijdering van cholesterol uit de macrofagen leidt tot de transformatie van macrofagen tot zogenaamde “foam-cellen”, macrofagen gevuld met grote hoeveelheden cholesterol. Deze foam-cellen zijn een zeer belangrijke factor in het ontstaan van de atherosclerotische lesie.² Macrofagen in de atherosclerotische lesie zijn afkomstig uit beenmerg-afgeleide monocyten (de voorlopers van macrofagen) die vanuit het bloed in de bloedvatwand infiltreren. In dit proefschrift is de beenmergtransplantatie (BMT) techniek gebruikt om de expressie van genen in de hematopoïetische cellen, waaronder de macrofagen, te veranderen. Door de BMT techniek te combineren met het gebruik van beschikbare knockout en transgene (overexpressie) muizen is de rol van enkele specifieke genen in de cholesterolhuishouding, ontstekingen, en de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd. De resultaten van dit onderzoek zijn in het huidige proefschrift beschreven.

10.2.1 ABC-transporters: belangrijke moleculen in de cholesterolhuishouding van de macrofaag

Macrofagen zijn de opruimcellen van het lichaam. Zij verwijderen gemodificeerde lipoproteïnen en beschadigde celmembranen. Dit kan leiden tot de ophoping van grote hoeveelheden cholesterol en geoxideerde vetten, zogenaamde oxysterolen in deze cellen. De ATP-binding cassette (ABC) transporter familie bestaat uit evolutionair geconserveerde transmembraaneiwitten die ATP als energie nodig hebben om metabolieten over het membraan te kunnen transporteren.³ Zowel cholesterol als oxysterolen stimuleren de expressie van enkele ABC transporters. Het is waarschijnlijk dat ABC transporters, die gevoelig zijn voor cholesterol, een rol spelen in de handhaving van cholesterol homeostase in de macrofaag. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift, wordt een uitgebreide analyse van de expressie van ABC transporters in de verschillende celtypen van de lever, namelijk de parenchym-, endotheel-, en Kupffercellen, gepresenteerd. Uit onze analyses bleek dat de ABC transporters ABCA5, A9, D3, en D4 mogelijk een rol spelen in het cholesterol metabolisme van Kupffercellen, de macrofagen in de lever. Daarnaast ondersteunen de bevindingen dat het belangrijk is om de functie van ABC transporters in het cholesterol metabolisme in de verschillende cellen van de lever te bestuderen.

Macrofagen kunnen de opname van cholesterol uit het bloed via scavenger receptoren niet beperken.⁴ Export van cholesterol uit de macrofaag is dus een zeer belangrijk mechanisme om de cholesterolhuishouding in de macrofaag te reguleren. Een belangrijke transporter voor de efflux van cholesterol en fosfolipiden uit de macrofaag is ABCA1.^{5,6} In **hoofdstuk 3**

zijn studies beschreven waarin de BMT techniek is gebruikt om de effecten van specifieke verhoging van de expressie ABCA1 op macrofagen op het ontstaan van atherosclerose te bepalen. Hiervoor is gebruik gemaakt van een goed gevalideerd muismodel voor atherosclerose, de LDL receptor knockout (LDLr^{-/-}) muis. Onze studies hebben aangetoond dat overexpressie van ABCA1 in macrofagen het ontstaan van atherosclerose kan tegen gaan. ABCA1 is dus een zeer interessant therapeutische target voor het voorkomen van de ontwikkeling van atherosclerose.

Regressie van reeds bestaande atherosclerotische lesies is een belangrijk therapeutisch doel, aangezien complicaties in patiënten pas optreden als zij al atherosclerotische lesies hebben. In de studies beschreven in **hoofdstuk 4** is het effect van macrofaag ABCA1 overexpressie op de regressie van atherosclerotische lesies met een verschillende complexiteit bepaald. Macrofaag ABCA1 overexpressie kon de progressie van atherosclerose gedeeltelijk voorkomen. Echter ABCA1 overexpressie leidde in geen enkel stadium van lesie formatie tot regressie. Een verdere conclusie van deze studies is dat BMT niet de aangewezen techniek is om atherosclerose regressie te bestuderen, aangezien door BMT de expressie van genen in de bestaande atherosclerotische lesies niet kan worden veranderd. Middels beenmergtransplantatie kan echter wel goed de infiltratie van nieuwe macrofagen in bestaande atherosclerotische lesies bestudeerd worden. Deze studies zullen in belangrijke mate bijdragen aan nieuwe inzichten om de infiltratie van macrofagen in verschillende stadia van lesie vorming optimaal te remmen en daarmee de groei van de atherosclerotische lesie te stoppen. Gecombineerd met nieuwe therapieën die de efflux van cholesterol uit macrofagen in de lesie kunnen verhogen, kan mogelijk in de toekomst ook regressie van bestaande atherosclerotische lesies worden bereikt.

Uit de genexpressie studies beschreven in **hoofdstuk 2** kwam ABCA5 naar voren als een ABC transporter die betrokken is bij cholesterol metabolisme in Kupffercellen van de lever. *In vitro* studies hebben aangetoond dat zowel de expressie van ABCA5 als die van ABCA1 gevoelig is voor veranderingen in de hoeveelheid cholesterol binnen in de cel.⁷ Dit impliceert dat ABCA5, naast ABCA1, mogelijk ook een rol speelt in het macrofaag cholesterol metabolisme. Data over de rol van ABCA5 in macrofagen *in vivo* ontbreken echter tot op heden. In **hoofdstuk 5** worden studies gepresenteerd waarin de biologische rol van macrofaag ABCA5 in het lipoproteïnen metabolisme en de ontwikkeling van atherosclerotische lesies is bestudeerd. Hiervoor is met behulp van de BMT techniek beenmerg van ABCA5 knockout muizen getransplanteerd naar LDLr^{-/-} muizen om zodoende ABCA5 specifiek in de hematopoïetische cellen uit te schakelen. Uit deze studies is gebleken dat ABCA5 een rol speelt in de cholesterol huishouding van de macrofaag. Afwezigheid van ABCA5 in macrofagen had geen effect op de initiële vorming van atherosclerotische lesies in LDLr^{-/-} mannetjes muizen. Echter in vrouwtjes muizen, die gevoeliger zijn voor de ontwikkeling van atherosclerotische lesies, leidde afwezigheid van ABCA5 in macrofagen tot een verhoogde gevoeligheid voor het ontstaan van atherosclerose. Aanvullende *in vitro* studies hebben laten zien dat ABCA1 mogelijk kan compenseren voor de afwezigheid van ABCA5 in macrofagen. Dit zou kunnen verklaren waarom slechts een klein effect op atherosclerose

ontwikkeling als gevolg van de afwezigheid van macrofaag ABCA5 is gevonden. Om hier uitsluitel over te geven is het nodig om muizen die zowel ABCA5 als ABCA1 missen te genereren.

10.2.2 Lipiden-transfer eiwitten: factoren die de HDL compositie moduleren

Het hoge-dichtheids-lipoproteïne (HDL) wordt beschouwd als een interessante target voor de behandeling van atherosclerose. De HDL fractie in het bloed bestaat uit een heterogene populatie lipiden-bevattende deeltjes, die verschillen in grootte, structuur, en activiteit. Kleine discoïdale lipiden-arme HDL deeltjes (ook wel pre- β -HDL genoemd) kunnen zeer effectief vrij cholesterol uit cellen onttrekken. Dit is de 1^e stap van het zogenaamde “reverse cholesterol transport” proces. De gevormde grote, sferische, cholesterol-rijke HDL deeltjes (α -HDL) zijn op hun beurt een goed substraat voor herkenning door de scavenger receptor BI (SR-BI). SR-BI zorgt voor de selectieve opname van cholesteryl esters uit HDL in de lever en steroïd hormoon producerende organen. Phospholipid transfer protein (PLTP) en cholesterol ester transfer protein (CETP) zijn de twee genen die hoofdzakelijk verantwoordelijk zijn voor de modulatie van de HDL compositie. Mensen die geen CETP kunnen produceren hebben een sterk verhoogde concentratie HDL in het bloed, terwijl de hoeveelheid LDL is verlaagd.⁸ Verder is er een correlatie aangetoond tussen de PLTP activiteit in het bloed en het risico op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten.⁹ Zowel PLTP als CETP worden ook geproduceerd door foam-cellen in humane atherosclerotische lesies.¹⁰⁻¹⁴ Het is echter de vraag of PLTP of CETP een directe rol hebben in de opslag in of verwijdering van cholesterol uit foam-cellen in de atherosclerotische lesies. In de studies van **hoofdstuk 6** is de rol van macrofaag PLTP in het lipoproteïnen metabolisme en atherosclerose onderzocht met behulp van PLTP knockout beenmerg dat werd getransplanteerd naar LDLr^{-/-} muizen. Deze studies hebben aangetoond dat PLTP productie door macrofagen significant bijdraagt aan de totale PLTP activiteit in het plasma. Afwezigheid van PLTP in macrofagen leidde tot verhoogde concentraties apoA-I en verlaagde concentraties apoB-bevattende lipoproteïnen in het plasma. Deze veranderingen in het plasma kunnen verklaren waarom uitschakeling van PLTP productie door macrofagen gepaard ging met een geremde ontwikkeling van atherosclerose in LDLr^{-/-} muizen. Om de rol van CETP geproduceerd door macrofagen op de lipiden distributie en de ontwikkeling van atherosclerose te bepalen zijn LDLr^{-/-} muizen getransplanteerd met beenmerg van muizen die humane CETP tot expressie brengen onder invloed van de eigen humane promotor (**hoofdstuk 7**). CETP geproduceerd door beenmerg-afgeleide cellen induceerde een onverwacht groot effect op het lipoproteïnen metabolisme door cholesteryl esters van HDL naar apoB-bevattende lipoproteïnen te verplaatsen. Deze bevinding vormt het eerste bewijs dat beenmerg-afgeleid CETP van belang is voor de totale hoeveelheid CETP activiteit die circuleert in het plasma. Aangezien LDLr^{-/-} muizen de apoB-bevattende lipoproteïnen niet goed kunnen verwijderen uit het bloed, leidde de transfer van cholesterol van HDL naar de apoB-

bevattende lipoproteïnen door macrofaag CETP direct ook tot een toename in atherosclerose.

Macrofaag foam-cellen komen voornamelijk voor in atherosclerotische lesies, terwijl de aanwezigheid van geactiveerde macrofagen geassocieerd is met verschillende inflammatoire ziekten. CETP, PLTP, bactericidal permeability increasing protein (BPI), en LPS-binding protein (LBP) behoren allen tot de familie van de lipiden-transfer/lipopolysaccharide (LPS)-bindende eiwitten.¹⁵ Blootstelling van hamsters of muizen die CETP tot expressie brengen aan LPS leidt tot een snelle afname van de CETP concentratie in serum.^{16,17} Dit suggereert dat CETP (een LBP analoog), naast haar rol in HDL metabolisme, mogelijk ook een rol speelt in de immunologische reactie tegen LPS. In **hoofdstuk 8** is de relatie tussen de CETP productie en aandoeningen van de kransslagader in zowel mensen als transgene muizen beschreven. In mensen wordt een lagere CETP expressie in leukocyten gevonden tijdens aanvallen van instabiele angina (pijn op de borst). Ook ligatie van een kransslagader in CETP transgene muizen induceert een snelle afname van de genexpressie van CETP in leukocyten. Zowel instabiele angina in patiënten als ligatie van de kransslagader in ons muismodel ging gepaard met een verhoogde inflammatoire status. Verschillende inflammatoire stimuli kunnen dus de expressie van CETP in leukocyten verlagen. In **hoofdstuk 9** is de rol van CETP in ontstekingsreacties bestudeerd. LPS is de actieve component van de membranen van Gram-negatieve bacteriën en stimuleert monocytten en macrofagen tot de productie van grote hoeveelheden pro-inflammatoire cytokines. Een hoge concentratie van deze cytokines in het bloed kan leiden tot cytotoxische effecten, orgaan falen, en eventueel de dood.^{18,19} Om het effect van CETP op de productie van het pro-inflammatoire cytokine TNF- α te onderzoeken werden CETP transgene en wild-type muizen blootgesteld aan een sub-lethale dosis LPS. Aanwezigheid van CETP in muizen remde de productie van TNF- α , mogelijk door remming van de opname door macrofagen. CETP kan daarom als een endogene beschermende factor tegen ontsteking worden gezien. Additionele studies waarin beenmerg van CETP transgene muizen (CETP Tg \rightarrow WT) of wild-type muizen (WT \rightarrow WT) werd getransplanteerd in wild-type muizen hebben uitgewezen dat door beenmergcellen geproduceerd CETP niet bijdraagt aan het beschermende effect van CETP in de circulatie.

10.2.3 Conclusies en toekomst perspectieven

De afgelopen jaren hebben klinische trials met LDL-cholesterol verlagende geneesmiddelen duidelijk aangetoond dat verlaging van het LDL cholesterol gehalte leidt tot een 30% tot 45% daling van hart- en vaatziekten.²⁰⁻²³ Echter de ontwikkeling van hart- en vaatziekten kan nog steeds niet volledig worden voorkomen en daarom is er een sterke behoefte aan nieuwe geneesmiddelen.

Export van cholesterol uit macrofagen in bloedvaten met atherosclerotische lesies is de eerste stap van het zogenaamde “reverse cholesterol transport” proces. Verhoging van de capaciteit van macrofagen om cholesterol uit te scheiden is daarom een aantrekkelijk nieuw aangrijpingspunt voor nieuwe geneesmiddelen ten einde hart- en vaatziekten te verminderen.

De in dit proefschrift beschreven studies hebben geleid tot een belangrijke vergroting van het inzicht in de regulatie van het cholesterol metabolisme in macrofagen en de effecten op de ontwikkeling van atherosclerotische lesies. Met behulp van de beenmergtransplantatie techniek is aangetoond dat enkele ABC-transporters (ABCA1 en ABCA5) een belangrijke rol spelen in het cholesterol metabolisme van macrofagen en het ontstaan van atherosclerose. De studies lieten zien dat ABCA1 op macrofagen een zeer interessant therapeutische target is voor de preventie van de ontwikkeling van atherosclerose. Daarnaast is gebleken dat ook ABCA5 een rol speelt bij de bescherming tegen de ophoping van cholesterol in macrofagen en de ontwikkeling van atherosclerose. Verder onderzoek is echter nodig om uit te vinden of middels gecombineerde regulatie van ABCA1 en ABCA5 een nog betere bescherming bereikt kan worden.

Een therapeutische strategie om de expressie van ABCA1 in macrofagen in atherosclerotische lesies te verhogen is farmacologische activatie van Lever X Receptoren (LXRs).²⁴⁻²⁷ Er bestaan 2 varianten van de Lever X Receptor, namelijk LXR α en LXR β .^{28,29} Accumulatie van oxysterolen in een cel leidt tot heterodimerisatie van LXR α of LXR β met de Retinoïde X Receptor (RXR), dat vervolgens aan DNA bindt en de expressie van genen beïnvloedt. Het eten van een dieet rijk in cholesterol leidt (via de vorming van oxysterolen) tot de activatie van de Lever X Receptoren, waardoor de expressie genen die een belangrijke rol spelen bij de uitscheiding van cholesterol uit macrofagen wordt verhoogd.^{30,31} Farmacologische activatie van Lever X receptoren kan dan ook beschouwd worden als een veelbelovende benadering om het reverse cholesterol transport uit macrofagen te verhogen en daarmee de ontwikkeling van atherosclerose te verminderen. Behandeling van diermodellen met zogenaamde LXR agonisten leidt tot een verhoging van het HDL cholesterol in het bloed, vermindert de absorptie van cholesterol in de darmen en vergroot de uitscheiding van cholesterol via de gal en de ontlasting.³² Echter naast deze gunstige effecten leidt farmacologische activatie van LXR ook tot een verhoogde productie van triglyceriden door de lever en daardoor verhoogde concentraties triglyceriden in het bloed, een belangrijke onafhankelijke risicofactor voor de ontwikkeling van atherosclerose.^{33,34} Gezien deze ernstige bijverschijnselen zijn de huidige LXR agonisten niet klinisch toepasbaar. De bijverschijnselen van LXR agonisten zouden verminderd kunnen worden door specifieke sturing naar de darmen of atherosclerotische plaques. Specifieke activatie van LXR in de darmen zou bijvoorbeeld de vorming van HDL door de darmen via ABCA1 verhogen, zonder verhoging van de triglyceriden productie in de lever.³⁵ Daarnaast zou specifieke sturing van LXR agonisten naar macrofagen in atherosclerotische lesies theoretisch kunnen leiden tot een verhoging van de expressie van ABCA1 en andere genen betrokken bij de uitscheiding van cholesterol uit macrofagen (bijvoorbeeld ABCG1).³⁶ Dit zou een verhoging van het reverse cholesterol transport vanuit macrofagen in de atherosclerotische lesies tot gevolg hebben en daarmee de ontwikkeling van atherosclerose remmen zonder ongewenste bijverschijnselen. Een lage concentratie HDL cholesterol in het bloed is een belangrijke risicofactor voor de ontwikkeling van atherosclerose.³⁷ HDL-verhogende therapieën worden daarom ook gezien als een belangrijke nieuwe

toekomstige behandelmethodes ter voorkoming van hart- en vaatziekten. PLTP en CETP zijn 2 eiwitten die een belangrijke rol spelen bij het metabolisme van HDL en zijn daarom interessante aangrijpingspunten voor farmacologische interventiestrategieën gericht op verhoging van de hoeveelheid HDL in het bloed. Middels de beenmergtransplantatie techniek hebben we aangetoond dat macrofagen in belangrijke mate bijdragen aan de totale activiteit van deze eiwitten in het bloed en dat de effecten op de ontwikkeling van atherosclerose voornamelijk worden veroorzaakt door effecten op de concentraties lipoproteïnen in het bloed. Als gevolg van de invloed van CETP productie door macrofagen op de totale CETP activiteit van het bloed, leidt expressie van CETP in macrofagen tot een vergroting van de gevoeligheid voor de ontwikkeling van atherosclerose onder condities dat de verwijdering van apoB-bevattende lipoproteïnen is verstoord. Specifieke remming van de productie van CETP door macrofagen is dus een aantrekkelijke methode om de CETP activiteit te verminderen en de HDL concentraties in het bloed te verhogen. De effecten van PLTP op het metabolisme van lipoproteïnen en de ontwikkeling van atherosclerose zijn complex. In dit proefschrift tonen we aan dat uitschakeling van de PLTP productie door macrofagen, onder condities van verstoorde verwijdering van apoB-lipoproteïnen uit het bloed, leidt tot een verlaagde gevoeligheid voor de ontwikkeling van atherosclerose. Nader onderzoek is echter noodzakelijk om aan te tonen dat nieuwe geneesmiddelen specifiek gericht op verlaging van de PLTP productie door macrofagen het risico op de ontwikkeling van hart- en vaatziekten verlagen. Remming van de CETP activiteit leidt tot een vermindering van de hoeveelheid apoB-lipoproteïnen in het bloed terwijl de concentratie HDL wordt verhoogd.³⁸ CETP inhibitie wordt daarom beschouwd als een potentieel nieuwe strategie om het lipoproteïnen metabolisme te beïnvloeden. Verschillende CETP remmers worden nu getest op hun werkzaamheid om atherosclerose te voorkomen. Torcetrapib, een zeer effectieve remmer van CETP activiteit, verhoogt de hoeveelheid HDL cholesterol in het bloed (>3-voudig) en vermindert de ontwikkeling van atherosclerose in konijnen. Ook in klinische studies met gezonde vrijwilligers bleek dit potentiële nieuwe geneesmiddel de HDL concentratie in het bloed met 60% te verhogen, terwijl LDL cholesterol licht daalde.^{40,41} Studies met patiënten met hart- en vaatziekten leverden echter teleurstellende resultaten op. Naast de gunstige effecten op het lipoproteïnen metabolisme, bleek Torcetrapib de bloeddruk te verhogen en waren er geen positieve effecten op de ontwikkeling van atherosclerose waarneembaar.^{42,43} Tevens leidde behandeling met Torcetrapib in combinatie met Atorvastatine tot een verhoogde kans op sterfgevallen door hart- en vaatziekten vergeleken met de controle groep die met alleen Atorvastatine was behandeld.^{44,45} Opzienbarend was het feit dat ook significant meer patiënten overleden aan kanker en infectieziekten in de Torcetrapib/Atorvastatine groep, vergeleken met de groep patiënten die met alleen Atorvastatine was behandeld.⁴⁵ Dit suggereert dat farmacologische inhibitie van de CETP activiteit middels Torcetrapib mogelijk het immuunsysteem van patiënten kan aantasten. In de studies beschreven in dit proefschrift is een duidelijke associatie aangetoond tussen de expressie van CETP in leukocyten en ontsteking ten gevolge van aandoeningen aan

de kransslagaders zoals angina en een hartinfarct. Het is de vraag of een verlaagde CETP productie door leukocyten ook een rol speelt in de negatieve effecten van Torcetrapib. In dit proefschrift tonen we inderdaad aan dat CETP een beschermende rol speelt tegen een infectie met LPS. Deze informatie is zeer belangrijk voor de verdere ontwikkeling van andere mogelijke toekomstige geneesmiddelen die de activiteit van CETP verminderen. Veelbelovende nieuwe kandidaat geneesmiddelen zijn JTT-705 van Roche en Anacetrapib van Merck. JTT-705 (R165) verhoogt het HDL cholesterol gehalte van het bloed met 30%^{46,47}, terwijl Torcetrapib in staat was de HDL concentraties met 60% te verhogen. Verder verhoogt Anacetrapib (MK-0859) HDL met 129% en tot nu toe zijn geen negatieve effecten op de bloeddruk aangetoond.^{48,49}

Concluderend, modulatie van het cholesterol metabolisme in macrofagen lokaal in de bloedvatwand en systemische regulatie van het lipoproteïnen metabolisme zijn belangrijke aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen om hart- en vaatziekten te verminderen. Beenmergtransplantatie is een uiterst waardevolle techniek om de rol van specifieke genen in macrofagen op het metabolisme van lipoproteïnen en de ontwikkeling van atherosclerotische lesies te bestuderen en is daarmee een belangrijk middel voor de identificatie van nieuwe aangrijpingspunten voor geneesmiddelen. Vergroting van de algemene kennis van het HDL cholesterol metabolisme zal naar verwachting in de toekomst ook leiden tot de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, die de concentraties HDL in het bloed verhogen of de eigenschappen van het circulerende HDL verbeteren zodat het zijn beschermde functie beter kan uitoefenen.

REFERENCES

1. Doelle, G.C. The clinical picture of metabolic syndrome. An update on this complex of conditions and risk factors. *Postgrad. Med.* 2004; **116**:30–38.
2. R. Ross, Atherosclerosis – an inflammatory disease, *New Engl. J. Med.* 1999; **340**:115–126.
3. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1992; **8**:67–113.
4. Graeves DR, Gough PJ, Gordon S. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in transport, atherosclerosis and host defense. *Curr Opin Lipidol.* 1998; **9**:425–432.
5. M. Van Eck, M. Pennings, M. Hoekstra, R. Out and T.J. Van Berkel, Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter A1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 2005; **16**:307–315.
6. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; **113**:2548–55.
7. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. I. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; **257**:29–33.
8. Inazu A, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990; **323**:1234–1238.
9. Schlitt, A., C. Bickel, P. Thumma, S. Blankenberg, H. J. Rupprecht, J. Meyer and X. C. Jiang. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **23**(10):1857-1862.
10. Desrumaux CM, Mak PA, Boisvert WA, Masson D, Stupack D, Jauhainen M, Ehnholm C, Curtiss LK. Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. *J Lipid Res.* 2003; **44**:1453-1461.
11. Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J, Wilpitz D, Mangelsdorf D, Tontonoz P. The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol.* 2003; **23**:2182-2191.
12. O'Brien KD, Vuletic S, McDonald TO, Wolfbauer G, Lewis K, Tu AY, Marcovina S, Wight TN, Chait A, Albers JJ. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2003; **108**:270-274.
13. Zhang Z, Yamashita S, Hirano K, Nakagawa-Toyama Y, Matsuyama A, Nishida M, Sakai N, Fukasawa M, Arai H, Miyagawa J, Matsuzawa Y. Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 2001; **159**:67–75.
14. Ishikawa Y, Ito K, Akasaka Y, Ishii T, Masuda T, Zhang L, Akishima Y, Kiguchi H, Nakajima K, Hata Y. The distribution and production of cholesteryl ester transfer protein in the human aortic wall. *Atherosclerosis.* 2001; **156**:29–37.
15. Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol.* 2005; **25**:53–55.
16. Hardardóttir I, Moser AH, Fuller J, Fielding C, Feingold K, Grünfeld C. Endotoxin and cytokines decrease serum levels and extra hepatic protein and mRNA levels of cholesteryl ester transfer protein in syrian hamsters. *J Clin Invest.* 1996; **97**:2585–2592.
17. Masucci-Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, Richardson H, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice. *J Clin Invest.* 1995; **95**:1587–1594.
18. Galanos C and Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology.* 1993; **187**:346-356.
19. Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; **216**:133-165.
20. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1995; **333**:1350–1351.
21. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMO, Wun C-C, Davis BR, Braunwald E. The effect of

- pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1996; **335**:1001–1009.
22. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AMJ. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.* 1998; **279**:1615–1622.
 23. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002; **360**:7–22.
 24. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A. R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**:28240-28245.
 25. Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., and Tontonoz, P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; **97**:12097-12102.
 26. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., and Mangelsdorf, D. J. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000; **289**:1524-1529.
 27. Schwartz, K., Lawn, R. M., and Wade, D. P. ABC1 Gene Expression and ApoA-I-mediated Cholesterol Efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; **274**:794-802.
 28. Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., and Mangelsdorf, D. J. *Genes Dev.* 1995; **9**:1033-1045.
 29. Teboul, M., Enmark, E., Li, Q., Wikstrom, A. C., Pelto-Huikko, M., and Gustafsson, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; **92**:2096-2100.
 30. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J. *Nature.* 1996; **383**:728-731.
 31. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; **96**:266-271.
 32. Plösch T, Kok T, Bloks VW, Smit MJ, Havinga R, Chimini G, Groen AK, Kuipers F. Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem.* 2002; **277**(37):33870-33877.
 33. Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A. et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000; **14**:2831–2838.
 34. Tontonoz, P. and Mangelsdorf, D.J. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.* 2003; **17**:985–993.
 35. L.R. Brunham, J.K. Kruit, T.D. Pape, J.S. Parks, F. Kuipers and M.R. Hayden, Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels, *Circ. Res.* 2006; **99**:672–674.
 36. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT, Heyman RA, Tangirala RK, Schulman IG. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**: 135–142.
 37. Genest JJ, Jr., Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Schaefer EJ. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 1993; **13**:1728–1737.
 38. Barter PJ, Brewer HB JR, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR: Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003, **23**:160–167.
 39. Morehouse LA, Sugarman ED, Bourassa PA. Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in NZW rabbits. *J Lipid Res.* 2007, **48**:1263–1272
 40. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med.* 2004, **350**:1505–1515
 41. McKenney JM, Davidson MH, Shear CL, Revkin JH. Efficacy and safety of torcetrapib, a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, in individuals with below-average high-density lipoprotein cholesterol levels on a background of atorvastatin. *J Am Coll Cardiol.* 2006, **48**:1782–1790
 42. Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, Ruzyllo W, Bachinsky WB, Lasala GP, Tuzcu EM. ILLUSTRATE Investigators. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2007; **356** (13):1304–1316.

43. Kastelein JJ, van Leuven SI, Burgess L, Evans GW, Kuivenhoven JA, Barter PJ, Revkin JH, Grobbee DE, Riley WA, Shear CL, Duggan WT, Bots ML; RADIANCE 1 Investigators. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2007; **356** (16):1620–30.
44. U.S. Food and Drug Administration (2006-12-03). Pfizer Stops All Torcetrapib Clinical Trials in Interest of Patient Safety.
45. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007; **357**:2109–2122.
46. El Harchaoui K, van der Steeg WA, Stroes ES, Kastelein JJ. The role of CETP inhibition in dyslipidemia. *Curr Atheroscler Re.* 2007; **9** (2):125–133.
47. de Grooth GJ, Kuivenhoven JA, Stalenhoef AF, de Graaf J, Zwinderman AH, Posma JL, van Tol A, Kastelein JJ. Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study". *Circulation.* 2002; **105** (18):2159–2165.
48. Reuters (2007-10-04). Merck announces its investigational CETP-Inhibitor, MK-0859, produced positive effects on lipids with no observed blood pressure changes, Reuters, Inc.
49. Krishna R, Anderson MS, Bergman AJ, Jin B, Fallon M, Cote J, Rosko K, Chavez-Eng C, Lutz R, Bloomfield DM, Gutierrez M, Doherty J, Bieberdorf F, Chodakewitz J, Gottesdiener KM, Wagner JA. Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomised placebo-controlled phase I studies. *Lancet.*

10.3 中文综述

长期以来,心血管疾病一直是发达国家的主要死因。在中国,心脏疾患是死因的第二位,脑血管病位于第三位,冠心病、脑血管病本质都是动脉粥样硬化。国人因动脉粥样硬化引发的死亡率高达 30%。动脉粥样硬化是一个复杂的病理生理过程,目前认为,初始是由于血液中单核细胞与血管内皮细胞粘附并穿过血管内皮细胞层到内皮下间隙,停留下来成为巨噬细胞。这些巨噬细胞通过其细胞表面的多种受体无限地摄取变性(氧化或乙酰化)的低密度脂蛋白(LDL)颗粒及其他配体,结果在巨噬细胞内蓄积大量的胆固醇酯和甘油三酯(TG),使巨噬细胞发展成为泡沫细胞,泡沫细胞聚集在一起形成脂质条纹,加上更多的炎性细胞参与,刺激血管平滑肌细胞增生,摄取脂质共同形成脂质斑块。动脉粥样硬斑不仅会降低血液流通,也是血凝块形成的部位,它可阻塞血管中血液的流通。在冠状动脉中形成的血凝块会导致心肌梗塞。

动脉粥样硬化是一种多因素、多阶段的退行性病变,其发病机制复杂,至今尚未完全阐明,因而缺乏有效的防治措施。在所有导致动脉粥样硬化的危险因子中当前最受重视的是血脂异常。血脂以脂蛋白的形式在血液循环中进行转运,因此高脂血症实际上是高脂蛋白症。低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)是血液中主要的胆固醇运输剂,但两者含有不同的蛋白质,具有不同的生理作用。LDL主要是将肝组织的胆固醇运向身体其他部位的细胞。而HDL则沿相反方向运输,即从身体其他部位将胆固醇运向肝组织,通过内吞作用被吸收并作为胆汁分泌出去,实现胆固醇的逆向转运。大量流行病学资料以及大规模临床试验结果已充分显示,纠正血脂异常有利于防治动脉粥样硬化。糖尿病、代谢综合征、肥胖等引起的冠心病和动脉粥样硬化,不限于LDL胆固醇(LDL-C)增高者,其血脂谱是以HDL胆固醇(HDL-C)减低为特征,此类病人日益增多。最近,对HDL的研究大大增多,已经查明HDL能通过胆固醇逆向转运、防止LDL的氧化和抗炎作用从而起到保护心血管作用。升高HDL-C水平,降低动脉粥样硬化性心血管疾病的危险,是未来新药开发的另一个潜在靶点。目前,许多研究者从各方面试图升高HDL,主要涉及以下三个方面:促进胆固醇逆向转运;提高HDL-C水平;改善HDL功能。

1. 促进胆固醇逆向转运

通过各种途径,抑制巨噬细胞的过量脂质蓄积,是促进胆固醇逆向转运到肝脏的第一步。促进胆固醇逆向转运到肝脏,通过胆汁分泌出去,可以有效起到预防和治疗动脉粥样硬化的作用。当前学术界重视三磷酸腺苷结合子(ABC)系统在胆固醇逆向转运中的作用。三磷酸腺苷结合盒转运体A1(ABCA1)是第一个用转基因小鼠发现的逆向转运胆固醇的通道;ABCA1是一种较大的膜蛋白,可促进磷脂和胆固醇转运到HDL,形成前 β -HDL微粒。ABCA1基因突变导致Tangier病(Tangier Disease, TD)。TD是一种严重的HDL缺乏综合征,该病的明显表型是组织中巨噬细胞存积大量的胆固醇,TD病人有动脉粥样硬斑形成。最近,研究者们从新生老鼠脑内克隆出了另一个三磷酸腺苷结合子基因ABCA5。ABCA5基因缺陷型老鼠心脏发育异常,而且有明显的甲状腺疾病的表型。另有研究表明,ABCA5在巨噬细胞中大量表达,并且其表达水平受胞外胆固醇水平的调节。然而,ABCA5在胆固醇逆向转运中的功能目前尚未知。有的学者还关注核受体,认为它是转录激活因子的配体,能调节基因转录水平。核受体既包括一些常见蛋白受体,如雌激素受体,也包括一些特殊受体,如肝脏X受体(LXRs)和类视黄醇X受体(RXR)。由于核受体LXR/RXR调控多种细胞内胆固醇及脂肪酸的代谢,激活这些受体可促进巨噬细胞内胆固醇的外流、肝脏中胆汁酸的合成和阻止小肠中胆固醇的吸收。近期有研究显示,合成的LXR激动剂上调

巨噬细胞 ABCA1 表达, 并增加离体的胆固醇流入到贫脂的载脂蛋白 A-1 和成熟的 HDL 中, 能减轻小鼠动脉粥样硬化的程度。有人推测, LXR 激动剂作为提高胆固醇逆向转运和抗动脉粥样硬化的新药会引起人们高度关注。

本论文的第一部分, 集中讨论了在巨噬细胞中调控 (上调或下调) 胆固醇逆向转运关键基因, 即三磷酸腺苷结合子的表达 (如 ABCA1 和 ABCA5), 对胆固醇代谢及动脉粥样硬化形成的影响。利用骨髓移植技术, 我们上调了 ABCA1 基因在巨噬细胞中的表达, 虽然血浆中脂蛋白的水平没有明显差异, 但是在巨噬细胞中过度表达 ABCA1 基因, 激动了胆固醇逆向运输的第一步, 即胆固醇从细胞外流至载脂蛋白 A-1, 能有效抑制小鼠动脉粥样硬化形成。以 ABCA1 作为提高胆固醇逆向转运和抗动脉粥样硬化的靶点, 已经引起了人们的高度关注。在另一组独立试验中, 利用同样的骨髓移植技术, 我们下调了 ABCA5 基因在巨噬细胞中的表达。结果表明, 在巨噬细胞中抑制 ABCA5 表达, 能影响胆固醇从细胞外流至载脂蛋白 A-1 和 HDL, 影响血浆中的血脂水平, 并且能促进雌性小鼠动脉粥样硬化形成。这一全新的发现显示, ABCA5 可能是另一个在胆固醇逆向转运中起重要作用的蛋白。现在的疑问是, 在巨噬细胞中过度表达 ABCA5, 是否能像 ABCA1 一样, 有效激动胆固醇逆向运输和抑制动脉粥样硬化形成。这部分的研究, 为进一步探索以巨噬细胞为靶点, 促进胆固醇逆向转运到肝脏, 为研制抗动脉粥样硬化的药物提供了新的思路。

2. 提高血浆 HDL 胆固醇水平

HDL 有抗氧化作用, 防止 LDL 氧化, 并可通过竞争机制抑制 LDL 与血管内皮细胞受体结合而减少其摄取。HDL 抗动脉粥样硬化的能力最近被转基因小鼠证实, 在实验动物脂蛋白升高时, 载脂蛋白 A-1, 即 HDL 优势的脂蛋白过度表达, 使动脉粥样硬化的形成明显受抑制。

磷脂转运蛋白 (PLTP) 和胆固醇酯转运蛋白 (CETP) 是 HDL 代谢过程中关键的两个酶。PLTP 是细胞内胆固醇 (前 β -HDL) 产生的有效受体。在此过程中, PLTP 将过多的脂蛋白表面磷脂 (表面残体) 转移至载脂蛋白 A-1, 这些表面磷脂残体是脂蛋白酯酶 (LPL) 水解含 TG 丰富的脂蛋白 [如极低密度脂蛋白 (VLDL) 和 LDL] 时形成的。而且, PLTP 通过改造循环中的 HDL 微粒生成前 β -HDL。CETP 从 HDL 微粒到含脂蛋白微粒的载脂蛋白 B-100 (VLDL, LDL 和 HDL) 依次转运胆固醇酯。在 CETP 介导下, HDL 中的胆固醇酯与 LDL 和 VLDL 的 TG 相互交换, 调节血浆 HDL 组成和颗粒大小, 提高血浆 HDL-C 水平。

鉴于 CETP 缺陷可提高 HDL-C 水平, 研发 CETP 抑制剂给人们带来了新希望。Torcetrapib 是 CETP 抑制剂的代表药物, 可有效地提高 HDL-C 水平。研究发现, 在 CETP 基因缺陷人群中, HDL-C 水平较高者冠心病风险较低。但 Torcetrapib 在临床上可否抑制动脉粥样硬化的发生和发展? 目前, 国际上进行了多中心随机对照临床试验, 利用冠脉血管内超声或高分辨率超声检测 Torcetrapib 单用或与阿托伐他汀合用对冠状动脉或颈动脉粥样硬化斑块的影响。2007 年, ILLUSTRATE 研究显示, 1188 例冠脉狭窄程度为 20%~50% 的患者分别接受阿托伐他汀 10~80 mg/d 治疗 4~10 周, LDL-C 达到 (100 \pm 15) mg/dl 后, 将患者随机分入 Torcetrapib 60 mg/dl+阿托伐他汀组或阿托伐他汀单药组, 通过 IVUS 测量冠脉斑块体积的变化。结果显示, 随访 24 个月, 与阿托伐他汀单药组相比, 联合治疗组 HDL-C 水平升高 61%, LDL-C 水平降低 20%。但出人意料的是, 冠脉斑块的体积变化两组无显著差异。更让人震惊的是, 联合治疗组死亡率显著高于阿托伐他汀单药组, 并且心肌梗死、心绞痛、血管重建术和心衰的发病危险均高于阿托伐他汀单药组。所以, 该试验于 2006 年 12 月提前终止。目前, Torcetrapib 治疗未能达到预期的抗动脉粥样硬化的效果。临床试验发现,

Torcetrapib 使患者收缩压升高 4.6 mmHg, 这种变化可能会影响 Torcetrapib 的抗动脉粥样硬化作用。另外, Torcetrapib 带来的问题是否与 CETP 被抑制有关, 还是仅仅为药物自身的严重副作用所致, 目前还不清楚。如果与其分子结构有关, 而与其机制无关, 那么其他 CETP 抑制剂是否能回避这样严重的副作用还需深入研究。

3. 提高血浆 HDL 的功能

从 CETP 抑制剂的临床试验结果也可看出胆固醇逆向转运的复杂性, HDL 在胆固醇逆向转运及动脉粥样硬化过程中的作用涉及多条途径和多种机制, 难以以某种机制来解释和反映其复杂作用。况且, HDL-C 仅反映 HDL 中胆固醇的含量, 不能反映 HDL 功能。因此, 不仅需要研究改变 HDL 代谢中相关因素变化引发的 HDL-C 水平的变化, 更重要的是研究这种变化带来的临床结果。Torcetrapib 的研究者 Daniel Rader 撰文指出: 发展以 HDL 为目标的治疗方法时, 应更多关注 HDL 的功能, 而不单纯是 HDL-C 水平。

本论文的第二部分, 集中讨论了在巨噬细胞中调控(上调或下调) HDL 代谢过程中关键基因, 即酯转运蛋白的表达(如 PLTP 和 CETP), 对胆固醇代谢及动脉粥样硬化形成的影响。利用骨髓移植技术, 我们下调了 PLTP 基因在巨噬细胞中的表达, 血浆中载脂蛋白 A-1 的水平明显升高, 同时 VLDL/LDL-C 水平明显降低。在我们的动物模型中, 抑制 PLTP 在巨噬细胞中的表达, 能有效抑制小鼠动脉粥样硬化形成。但是, 巨噬细胞 PLTP 基因表达在脂蛋白代谢及动脉粥样硬化形成中的作用, 目前尚存争议, 还需要进一步深入研究。另一方面, 以 CETP 作为提高 HDL-C 和抗动脉粥样硬化的靶点, 已经引起了人们的高度关注。在另一组独立试验中, 利用同样的骨髓移植技术, 我们上调了 CETP 基因在巨噬细胞中的表达。结果表明, 血浆中前 β -HDL 及 VLDL/LDL-C 水平明显升高。在我们的动物模型中, 在巨噬细胞中过度表达 CETP, 能促进小鼠动脉粥样硬化形成。这一发现为进一步探索以巨噬细胞为靶点, 抑制 CETP 的表达, 为研制抗动脉粥样硬化的药物提供了新的方向。此外, 鉴于 CETP 抑制剂 Torcetrapib 在临床上的副作用, 即导致免疫疾病引发高死亡率, 并且心肌梗死、心绞痛、血管重建术和心衰的高发病率, 在本论文的最后两个章节, 我们着重讨论了 CETP 基因在机体免疫反应中的表达调控和作用, 为进一步探究 CETP 在免疫疾病发病机理中的功能提供了体内实验的依据。

综上, 通过各种途径抑制巨噬细胞的过量脂质蓄积, 促进胆固醇逆向转运到肝脏, 通过胆汁分泌出去, 可以有效起到预防和治疗动脉粥样硬化的作用。以 LDL 胆固醇为靶点的时代并未过去, 以 HDL 胆固醇为靶点的时代即将到来。人们期望, 一方面促进巨噬细胞的脂质外流, 另一方面尽可能降低 LDL 胆固醇和升高 HDL 胆固醇, 双管齐下, 动脉粥样硬化受制之日即将来临。

