

[文章编号] 1000-4718(2008)05-0833-10

· 论 著 ·

脂肪分化相关蛋白通过蛋白激酶 C 和酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 促进 THP-1 巨噬细胞蓄积脂质*

袁中华¹, 刘晓辉¹, 王中群², 贾 薇³, Niu Xi-lin⁴, 黄谱非¹, 刘录山¹,
易光辉¹, 王 佐¹, 任 重¹, 唐朝克¹, 田国平^{5△}, 杨永宗¹

(¹南华大学医学院心血管病研究所,动脉硬化湖南省重点实验室,湖南 衡阳 421001;

²新乡医学院病理学教研室,河南 新乡 453003;³吉首大学医学院基础医学部,湖南 吉首 416000;

⁴美国北卡罗来纳大学医学院卡罗来纳心血管生物学中心,教堂山 27599, USA;

⁵南华大学第二附属医院心血管内科,湖南 衡阳 421001)

[摘 要] **目的:** 探讨脂肪分化相关蛋白促进 THP-1 巨噬细胞蓄积脂质的机制。**方法:** 使用高胆固醇饲料喂养新西兰兔 12 周,复制动脉粥样硬化动物模型。然后用 Western blotting 和免疫组织化学染色观察兔主动脉脂肪分化相关蛋白及蛋白激酶 C 的表达。THP-1 巨噬细胞与氧化低密度脂蛋白孵育不同的时间,使细胞负荷胆固醇后,用 RT-PCR 的方法观察脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 的表达,用 PepTag[®] assay 琼脂糖凝胶电泳及分光光度法观察蛋白激酶 C 的活性。在负荷胆固醇的 THP-1 巨噬细胞中分别加入蛋白激酶 C 的激动剂佛波酯和抑制剂钙磷酸结合蛋白,观察脂肪分化相关蛋白的表达,同时使用油红 O 染色和高效液相色谱法测定细胞内脂质的变化。瞬时转染 pcDNA3.1-HA-adi 表达载体到 THP-1 巨噬细胞,复制高表达脂肪分化相关蛋白的细胞模型。在负荷、不负荷胆固醇或 ACAT 抑制剂存在的状态下,观察酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达及细胞内胆固醇酯的改变。**结果:** 与对照组相比,兔主动脉病变处脂肪分化相关蛋白及蛋白激酶 C 表达均显著增加。负荷胆固醇的 THP-1 巨噬细胞中脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达上调,蛋白激酶 C 的活性升高。荷脂细胞与蛋白激酶 C 激动剂共孵育后,可以协同增强上调脂肪分化相关蛋白的效应,细胞内脂质增多;如果荷脂细胞同时与蛋白激酶 C 抑制剂共孵育,可以有效抑制荷脂所致的脂肪分化相关蛋白高表达,细胞内脂质减少。高表达脂肪分化相关蛋白的 THP-1 巨噬细胞能够使酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达增加,促进细胞内胆固醇酯蓄积。加入酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶抑制剂后,这些作用被减弱。**结论:** 脂肪分化相关蛋白可能是通过蛋白激酶 C 活性的改变影响酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 的活性,从而影响细胞内脂质的蓄积。

[关键词] 脂肪分化相关蛋白;蛋白激酶 C;酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶;THP-1 细胞;动脉硬化

[中图分类号] R363.1 **[文献标识码]** A

Adipophilin accumulates cellular cholesteryl ester by PKC and ACAT1 in THP-1 macrophages

YUAN Zhong-hua¹, LIU Xiao-hui¹, WANG Zhong-qun², JIA Wei³, NIU Xi-lin⁴,
HUANG An-fei¹, LIU Lu-shan¹, YI Guang-hui¹, WANG Zuo¹, REN Zhong¹, TANG
Chao-ke¹, TIAN Guo-ping⁵, YANG Yong-zong¹

(¹Institute of Cardiovascular Research, Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; ²Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; ³Department of Basic Medicine, Medical School, Jishou University, Jishou 416000, China; ⁴Carolina Cardiovascular Biology Center, Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA; ⁵Department of Cardiovascular Medicine, The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China. E-mail: pgtian555@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the mechanism of adipophilin accumulating cellular cholesteryl ester in THP-1 macrophages. **METHODS:** New Zealand rabbit atherosclerotic model was made with high cholesterol diet for 12 weeks.

[收稿日期] 2007-08-18 **[修回日期]** 2008-03-07

*[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目 (No. 05JJ40039)

△通讯作者 Tel: 0734-8288951; E-mail: pgtian555@hotmail.com

The expressions of adipophilin and PKC α were determined by Western blotting and immunochemical staining in aortic arteries. Cholesteryl ester - loading cells (CE - loading cells) were made from THP - 1 macrophages incubated with oxidized low density lipoprotein. In CE - loading cells, expressions of adipophilin and ACAT1 were analyzed by RT - PCR, and the activity of PKC was determined by PepTag[®] assay and spectrophotometry. When the CE - loading cells were incubated with PKC activator PMA and inhibitor calphostin C, expression of adipophilin was observed with RT - PCR, and cellular lipid was measured with oil red O staining and HPLC. The pcDNA3.1 - HA - adi vector was transfected to THP - 1 macrophage for making adipophilin over expression cells. After the CE - loading adipophilin over expression cells were incubated with or without ACAT inhibitor, the ACAT1 expression and cellular cholesteryl ester were analyzed. **RESULTS:** Compared with control, both adipophilin and PKC α expression increased in aortic arteries of atherosclerotic animal. In CE - loading THP - 1 macrophages, adipophilin and ACAT1 highly were expressed and PKC activity was augmented also. PMA enhanced the high expression of adipophilin and cellular cholesteryl ester in CE - loading THP - 1 macrophages, but calphostin C inhibited the effect. ACAT1 expression and cellular cholesteryl ester increased in adipophilin over expression cells, the effect was impaired by incubating with ACAT inhibitor. **CONCLUSION:** The results suggest that adipophilin increases ACAT1 activity through enhancing PKC activity, resulting in cellular cholesteryl ester accumulation in THP - 1 macrophages.

[**KEY WORDS**] Adipophilin; Protein kinase C; Acyl - coenzyme A; cholesterol acyltransferase; THP - 1 cells; Arteriosclerosis

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发病机制的核心环节是泡沫细胞形成, 泡沫细胞来源于血管平滑肌细胞和单核 - 巨噬细胞, 它的主要特征是, 吞噬修饰脂蛋白后, 细胞内积聚大量的胆固醇酯^[1,2]。泡沫细胞蓄积的脂质主要以脂滴的形式储存于细胞质, 脂肪分化相关蛋白就是脂滴外周含量最高的一种不完全包被蛋白^[3,4]。脂肪分化相关蛋白又称 adipophilin (adipose differentiation - related protein, AD-RP, ADFP)。研究显示, adipophilin 在富含巨噬细胞源性泡沫细胞的动脉粥样硬化斑块区高表达^[5]。Shiffman 等^[6]发现, 巨噬细胞与氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox - LDL) 孵育后, adipophilin 基因表达最早, 表达量最高。

研究发现^[7], 泡沫细胞形成过程中, 当修饰脂蛋白被细胞吞噬时, 往往伴有蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活。抑制 PKC 的活性, 能够减少由载脂蛋白所诱导的细胞内胆固醇外流^[8]。酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 (acyl - coenzyme A: cholesterol acyltransferase, ACAT) 能够催化游离胆固醇和长链脂肪酸形成胆固醇酯, 是细胞内主要合成胆固醇酯的酶。ACAT 有二种亚型: ACAT1 和 ACAT2。ACAT1 在几乎各种组织和细胞中都有表达, 主要作用是维持细胞内胆固醇的代谢平衡; ACAT2 则只在肝脏和小肠细胞中表达, 主要参与胆固醇的吸收和脂蛋白的装配。大量研究表明^[9], 在动脉粥样硬化发病过程中, ACAT 起到了至关重要的作用。Forcheron 等^[10]在动脉粥样硬化斑块中同时检测了 adipophilin 与 ACAT1, 与斑块周围组织相比, adipophilin 与 ACAT1 均高表达, 表明在动脉粥样硬化病变处 adipophilin 与 ACAT1 存在定位一致性。此外 Gao 等^[11]发现, adipophilin 能够促进细胞对脂肪酸的吸收与结合, 反之, 脂肪酸也能够诱导 adipophilin 的

表达。在细胞内, 脂肪酰 CoA 是 ACAT1 的底物。这些结果显示两者在功能上也密切相关。由此看来, adipophilin 和 ACAT1 均与细胞内胆固醇酯积聚, 病理状态下形成泡沫细胞有关。

本实验室已经发现^[12,13], 在兔动脉粥样硬化模型上增厚的主动脉内膜 adipophilin 表达增高, ox - LDL 在使巨噬细胞转变为泡沫细胞过程中, 也使 adipophilin 表达增加, adipophilin 反义寡核苷酸能使细胞内胆固醇酯减少, adipophilin 的高表达与 ACAT 的活性呈正相关。因此, 本文使用 PKC 激动剂、PKC 抑制剂、ACAT 抑制剂及高表达 adipophilin 的 THP - 1 巨噬细胞, 进一步研究 adipophilin 是否通过 PKC 引起 ACAT1 活性的改变, 使细胞内胆固醇酯蓄积, 寻找 adipophilin 促进动脉粥样硬化发生发展的机制。

材 料 和 方 法

1 材料

THP - 1 人单核巨噬细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。RPMI - 1640 培养基购自 Gibco 公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, BSA) 购自杭州四季青公司。

丙泮尼地 (Sandoz 58035, S - 58035, 3 - [de-cyldimethylsilyl] - N - [2 - (4 - methylphenyl) - 1 - phenylethyl]propanamide) 购自 Sigma 公司 (5 mg S - 58035 中加入 1 mL DMSO 配成 5 g/L 的贮存浓度, 滤菌, 密闭 4 ℃ 保存)。佛波酯 (phorbol 12 - myristate 13 - acetate, PMA) 购自 Sigma 公司 [1 mg PMA 加入 1 mL 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)], 滤菌, 用无血清 RPMI - 1640 培养基配成 0.1 g/L 的贮存浓度, 分装后 - 20 ℃ 储存。钙磷酸结合蛋白 (calphostin C, CAL) 购自 Biomol 公司 (100 μ g CAL 中加入 1.25 mL DMSO 构成 100 μ mol/L 的贮存浓度, 滤

菌, -20 °C 避光保存)。

Adipophilin 抗体购自 Research Diagnostic Inc.。PKC α 抗体、血球凝集素(hemagglutinin, HA) 抗体和 β -actin 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。PepTag[®] Non-Radioactive PKC Assay Kit 购自 Promega 公司。MasterMix 一管便捷式 PCR 扩增试剂盒购自北京天为时代公司。油红 O 购自 Ameresco 公司。Trizol 试剂、dNTP、oligo(dT)18 购自上海 Sangon 公司。ImProm-ITM Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司; 所有引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。其它试剂均为进口或国产分析纯。

2 动物分组及饲养

新西兰白兔(购自南华大学实验动物部)共 24 只, 体重 1.8 - 2.2 kg, 雌雄各半。随机分为对照组(control)和实验组(HCD), 每组 12 只。分笼饲养, 每天每只 150 g 定量喂食, 自由饮水。每月测体重 1 次。对照组喂普通饲料, 实验组喂高胆固醇饲料, 实验共进行 12 周。高胆固醇饲料由普通饲料 + 2% 胆固醇配制。饲喂高胆固醇饲料的动物每天每只 75 g 高胆固醇饲料 + 75 g 普通饲料, 即每天每只动物 1.5 g 胆固醇。

3 细胞培养、传代及处理

THP-1 单核细胞生长于含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液中, 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中静置培养。培养液中加入 10 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid, Hepes]。每 48 - 72 h 传代一次。取对数生长期细胞进行实验, 在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。待其贴壁生长融合至 80% 左右, 用含 2 g/L BSA 的培养基培养 3 h 后, 加入不同处理试剂, 包括 ox-LDL、S-58035、PMA、CAL(细胞需在距 20 W Philip 荧光灯 10 cm 处照射 30 min, 以激活 CAL 的药物活性), 孵育不同的时间后收集细胞。

4 Western blotting

取新西兰兔主动脉组织或处理结束后的细胞, 参考文献^[14]方法裂解组织或细胞提取蛋白, BCA(bicinchoninic acid)法进行蛋白定量, 然后进行 Western blotting 分析。Adipophilin 和 PKC α 抗体的工作浓度分别为 1:2 000 和 1:350。结果用凝胶图像分析系统(型号 GOS7500, UVP 公司)对胶片扫描。

5 免疫组织化学

各组动物的主动脉石蜡切片经烤片、乙醇梯度水化后, 放入盛有枸橼酸盐缓冲液的容器中, 置于电炉上 100 °C 15 min 进行抗原修复, 经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 2 次后使用即用型第 2 代免疫组化试剂盒(福州迈新生物公司)按说明

操作。棕褐色或棕黄色着色的细胞视为阳性细胞。

6 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)(密度 1.040 - 1.063 kg/L)采用序列超速离心法制备。用 Lowry 法测得 LDL 的蛋白质含量为 1.68 g/L。文中所列脂蛋白浓度均以蛋白为标准。参考文献^[15]的方法制备铜氧化的 ox-LDL。本实验所用 LDL 在氧化前过氧化脂质(lipid peroxide, LPO)含量为 1.5 μ mol TBARS/g 胆固醇, 氧化修饰后为 17.2 μ mol TBARS/g 胆固醇。

7 PepTag[®] assay 琼脂糖凝胶电泳及分光光度法

按试剂盒说明, 取 9 μ L 未变性胞膜蛋白的粗提液加入到 16 μ L 经过 30 °C、2 min 的 PKC 活性检测反应液(PepTag[®] PKC reaction 5 \times buffer 5 μ L, PepTag[®] C1 peptide 5 μ L, PKC activator 5 \times solution 5 μ L, peptide protection solution 1 μ L), 混匀后构成 25 μ L 的反应体系(阴性对照则将 9 μ L 未变性胞膜蛋白的粗提液替换为 9 μ L 去离子水), 30 °C 30 min, 95 °C 10 min, 4 °C 避光保存。取 5 μ L 反应终产物于 0.8% 的琼脂糖凝胶 100 V 的电压条件下水平电泳 15 min。终止电泳后, 使用凝胶电泳分析系统摄像, 显示胞膜 PKC 的磷酸化与非磷酸化条带。

切下凝胶磷酸化区带 250 μ L 放入 1.5 mL 刻度离心管, 95 °C 加热至凝胶溶解。将 175 μ L 的热琼脂糖倒入含有 75 μ L 胶溶解液、100 μ L 冰乙酸和 150 μ L 去离子水的试管中。摇匀后将 500 μ L 溶液倒入 0.5 mL 的比色杯中。可见/紫外分光光度计读取 570 nm 的吸光度值。以液化的不含 PepTag[®] peptide 的琼脂糖作为空白值。根据试剂盒提供的数据和 Beer's 定律逐步计算酶活性(单位酶活性指每升溶液中的磷酸盐每分钟转移至底物的微摩尔数量)。

8 RT-PCR 检测

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 用逆转录酶合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板进行 PCR 反应。Adipophilin 引物序列为 5' - AGGGGCTAGACAGGATTGAGGAGA - 3' (正义链), 5' - ACGGGAGTGAAGCTTGGTAGAC - 3' (反义链), 扩增片段长度 436 bp; 内参照 GAPDH 引物序列为 5' - TCACCATCTTCAGGAGCGAG - 3' (正义链), 5' - TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG - 3' (反义链), 扩增片段长度 697 bp; 内参照 β -actin 引物序列 5' - ATCCCTGTACGCCTCTGG - 3' (正义链), 5' - TCCTTCTGCATCCTGTCC - 3' (反义链), 扩增片段长度 500 bp。ACAT1 引物序列为 5' - TATTGCCCTCCTCATTCTC - 3' (正义链), 5' - CTTCATAGCGACATAACCC - 3' (反义链), PCR 扩增产物长度为 259 bp。反应结束后, 取 RT-PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳。电泳

条带采用 UVP 凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析,以各组目的基因与内参照基因吸光度值的比值来比较待测基因 mRNA 的表达差异。

9 油红 O 染色

参考文献^[16]的方法,细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板,处理结束后,油红 O 染色,苏木素衬染。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,摄像保存。

10 高效液相色谱分析

参考文献^[17]的方法,待细胞处理结束后,弃去培养基,PBS 洗 3 遍,加入 0.1 mol/L NaOH 500 μL,反复冻融 3 次裂解细胞,蛋白定量后,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,800 r/min 离心 10 min,留上清进行胆固醇检测。以豆甾醇为内标并做标准曲线,取 100 μL 上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μL,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇样品,加 1 mol/L NaOH 200 μL 为游离胆固醇样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥,200 μL 乙晴-异丙醇(80:20)溶解样品,上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱,柱温 4 °C,流速 1 mL/min,250 nm 紫外光检测,胆固醇以峰面积定量,内标校准,以 g/g 细胞蛋白为单位。细胞内胆固醇酯含量为总胆固醇与游离胆固醇的差值。

11 pcDNA3.1-HA-adi 质粒的构建及转染

从培养的小鼠(C57BL/6J)血管平滑肌细胞(第 6 代)提取总 RNA,逆转录成 cDNA,以此作模板行 PCR 反应。PCR 引物根据 GenBank 编号为 M93275 的小鼠 mRNA 序列设计,覆盖 adipophilin 完整的编码序列(coding sequence, CDS)。正义引物(79-100)为 5' ATGGCAGCAGCAGTACTGGATC-3',包括 ATG 起始密码子;反义引物(1 237-1 256)为 5'-TTACTGAGCTTTGACCTCAG-3',包括 TAA 终止密码子。使用 TOPO TA 克隆试剂盒(Invitrogen 公司, K4500-1),把 adipophilin 基因克隆到 pCR2.1 载体上,得到 pCR2.1-adipophilin 克隆载体。用 pCR2.1-Adi 质粒为模板,设计引物,在基因的两端加入 Not I 酶切位点,5' 端起始密码子前面加入 Kozak 序列,便于基因正确翻译,3' 端加入 HA 序列(5'-UAU CCA UAU GAU GUU CCA GAU UAU GCU-3')和终止密码子(TAA)。正义引物为 5'-GGAAGCGCCCGCACCATGCCAGCAGCAGTACTGGA-3',反义引物为 5'-GGAAGCGCCCGCTTAAG-CATAATCTGGAACATCATATGGATACTGAGCTTTGACCTCAGACTGCT-GGACC-3'。用 TOPO TA 克隆试剂盒把 HA-adipophilin 基因克隆到 pCR2.1 载体上,得到 pCR2.1-HA-adi 克隆载体。Not I 酶切

pCR2.1-HA-Adi,得到 HA-adipophilin 基因。同时使用 Not I 酶切 pcDNATM3.1/myc-His(-)-C 载体,使用碱性磷酸酶去磷酸化约 10 min。酶切产物纯化后,使用 T4 DNA 连接酶连接 HA-adipophilin 基因与线性化的 pcDNATM3.1/myc-His(-)-C 载体。把连接产物转化到 DH5α 大肠杆菌,扩增后,纯化质粒,进一步测序鉴定基因的完整性及正确的插入方向,得到 pcDNA3.1-HA-adi 表达载体。

取对数生长期的 THP-1 细胞,待其细胞密度达到 80% 时,加入 160 nmol/L PMA 处理 24 h 诱导其贴壁。用 37 °C 预热的 PBS 冲洗细胞 2 次,换成无血清培养基过夜。8 μg pcDNA3.1-HA-adi 表达载体或空白 pcDNA3.1 载体的 DNA 稀释于 800 μL 无血清培养基中,轻轻混匀。24 μL 梭华-Sofast™ 稀释于 800 μL 无血清培养基中,轻柔混匀。800 μL 梭华-Sofast™ 稀释液滴加到 DNA 稀释液中,一边滴加一边混匀,室温孵育 15-20 min。将 1.6 mL 梭华-Sofast™/DNA 复合物加入待转染的每瓶细胞中。37 °C CO₂ 培养箱孵育 3 h,然后换成 2 g/L BSA 的培养基孵育 48 h 后再加入处理因素。

12 统计学处理

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析及 t 检验,由 SPSS11.0 统计软件完成。

结 果

1 Adipophilin 和 PKCα 在动脉粥样硬化新西兰白兔主动脉中表达的变化

高胆固醇饲料喂养新西兰兔 12 周后,Western blotting 检测主动脉组织 adipophilin 和 PKCα 蛋白质的表达。结果显示(图 1),与对照组相比,高胆固醇饲料喂养的新西兰兔主动脉组织 adipophilin 和 PKCα 蛋白质表达均明显上调。免疫组织化学检测显示,实验组增厚的主动脉内膜 adipophilin 和 PKCα 表达明显增多(图 2 箭头所示)。但是,adipophilin 的分布多局限于增厚的内膜,而 PKCα 的分布却更广泛,除增厚的内膜表达增加外,还扩展到中膜近内膜处。

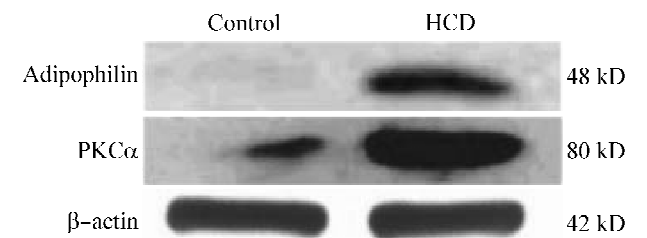


Fig 1 Western blotting analysis of adipophilin and PKCα protein from atherosclerotic rabbit aortas.

图 1 Western blotting 检测兔主动脉组织 adipophilin 和 PKCα 的表达

2 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 adipophilin、ACAT1、PKC 活性表达的影响

THP-1 巨噬细胞与 0、10、20、40、80 mg/L Ox-LDL 孵育 24 h 后, RT-PCR 观察 adipophilin (图

3A) 及 ACAT1 (图 3B) 的表达改变。结果显示, 随着 ox-LDL 浓度的增高, adipophilin 及 ACAT1 的表达也随之增加, 而且 adipophilin 及 ACAT1 表达的增加存在伴行关系。

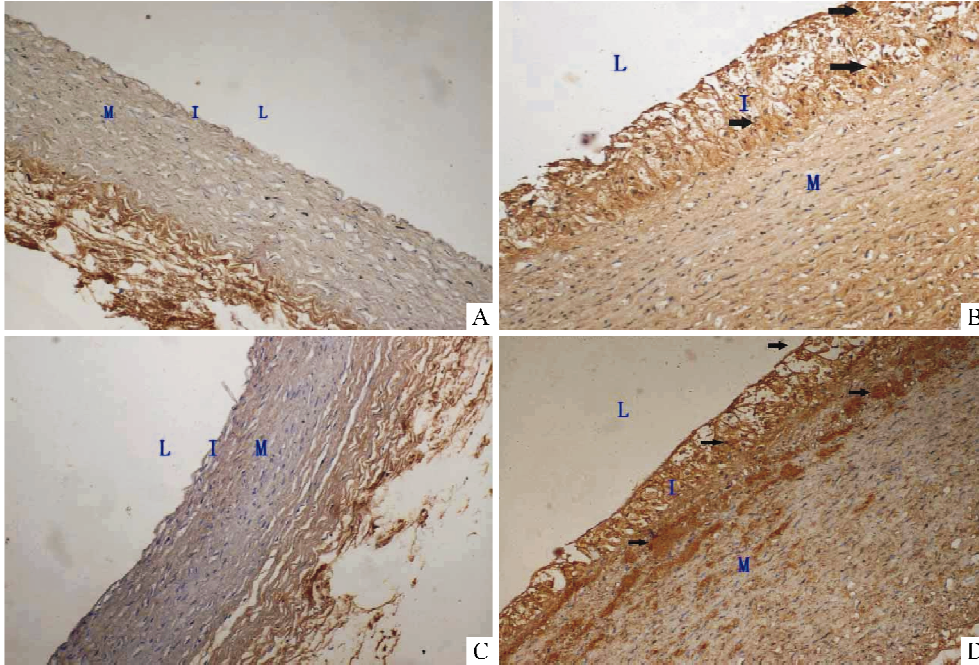


Fig 2 Immunostaining for adipophilin and PKC α from atherosclerotic rabbit aortas. M, I and L indicate media, intima and lumina respectively. Brown chromogen (arrows) show positive cell. A (control) and B (HCD) were for adipophilin, C (control) and D (HCD) were for PKC α ($\times 200$).

图 2 免疫组化检测兔主动脉 adipophilin 和 PKC α 的表达

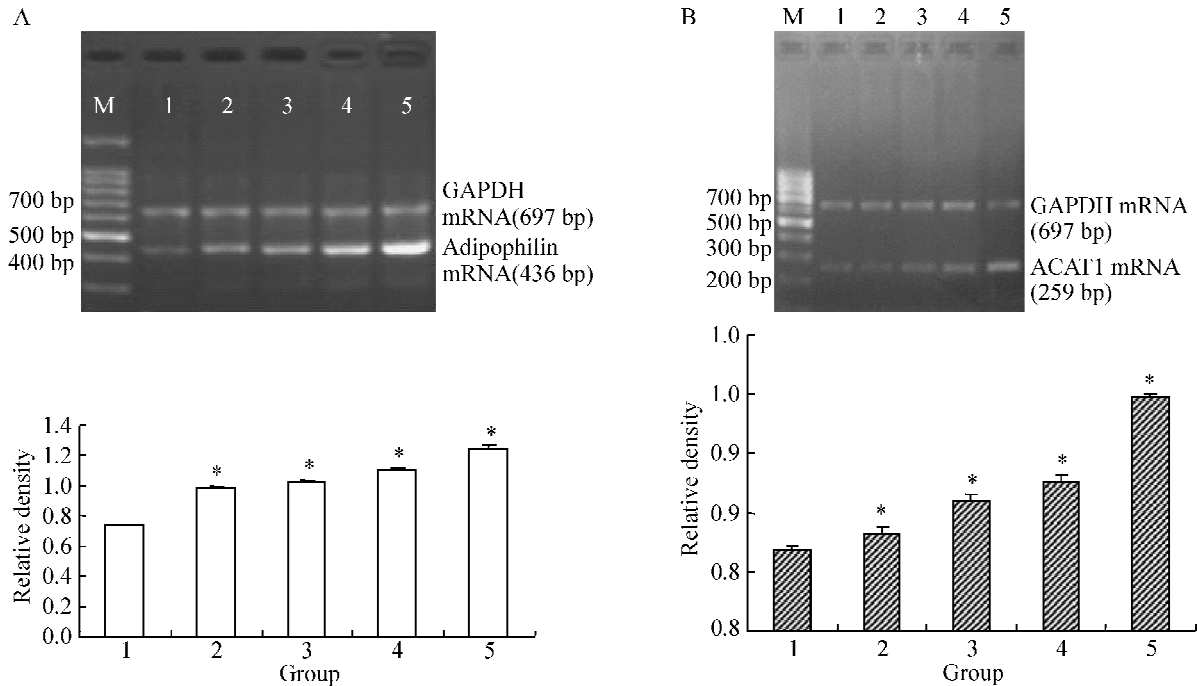


Fig 3 RT-PCR of adipophilin and ACAT1 mRNA in THP-1 macrophages after ox-LDL stimulation. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs group 1. M; indicates marker. Lane 1, 2, 3, 4, 5 indicate cells treated with 0, 10, 20, 40, 80 mg/L ox-LDL for 24 h, respectively. GAPDH band is 697 bp. Adipophilin mRNA band (A) is 436 bp. ACAT1 mRNA band (B) is 259 bp. The bar charts represent relative density which is the ratio of the two band scanning absorbance at the same lane. The data shown are representative of three separate analyses for each group.

图 3 RT-PCR 检测 ox-LDL 处理 THP-1 巨噬细胞时 adipophilin 及 ACAT1 mRNA 表达的改变

PepTag[®] assay kit 应用了对激酶具有高度特异性的高亮度荧光 PepTag[®] 肽底物 (PKC 特异性肽底物 PepTag[®] C1 肽的氨基酸序列是 P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K)。特异性荧光肽底物的磷酸化使肽的电荷和分子量发生变化,从而使得琼脂糖凝胶电泳可以快速分离底物磷酸化和非磷酸化部分。与 ox-LDL 孵育后,琼脂糖凝胶电泳显示高特异性 PepTag[®] 荧光肽底物被成功地分离为磷酸化与非磷酸化部分,指示胞膜 PKC 活性的磷酸化条带随着 ox-LDL 浓度的增加而增加(图 4)。回收磷酸化条带 570 nm 分光光度计下检测结果(表 1)显示,随着 ox-LDL 浓度的增加,THP-1 膜 PKC 活性从静息状态的 $(0.0670 \pm 0.0091) \times 10^3$ U/L 增至 $(0.1357 \pm 0.0235) \times 10^3$ U/L,增幅最大的 ox-LDL 浓度为 40 到 80 mg/L。

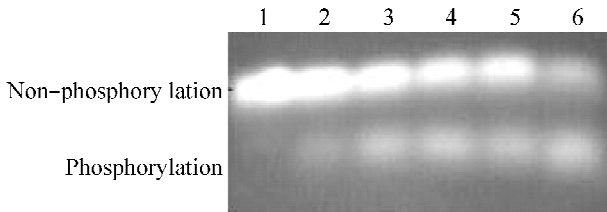


Fig 4 PKC activity in THP-1 macrophages after ox-LDL stimulation. The PKC activity of cytomembrane was qualitative analyzed by PepTag[®] assay for non-radioactive detection (the phosphorylated versions of the substrate separated on an agarose gel reflect the change trend of PKC activity). Lane 1 indicates negative control. Lane 2,3,4,5,6 indicate treating THP-1 macrophages with 0,10,20,40,80 mg/L ox-LDL, respectively.

图 4 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞胞膜 PKC 活性的影响

表 1 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞膜 PKC 活性变化

Tab 1 Changes of PKC activity in THP-1 macrophages after ox-LDL stimulation ($\times 10^3$ U/L. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$)

ox-LDL(mg/L)	0	10	20	40	80
PKC activity	0.067 ± 0.009	0.093 ± 0.015 *	0.102 ± 0.010 *	0.110 ± 0.015 *	0.136 ± 0.023 *

* $P < 0.05$ vs 0mg/L ox-LDL group.

3 PMA 和 CAL 对荷脂 THP-1 巨噬细胞中 adipophilin 表达的影响

PMA 是 PKC 的有效激动剂, CAL 是 PKC 的常用抑制剂^[18]。使用 50 mg/L ox-LDL 与 THP-1 巨噬细胞共孵育 16 h 使之成为荷脂细胞 (SE-laden macrophage), RT-PCR 及 Western blotting 结果显示(图 5、6),与对照组相比,荷脂细胞中 adipophilin 表达明显增加。如果荷脂细胞同时与 PKC 激动剂 100 nmol/L PMA 共孵育 16 h,可以协同增强这种上调

adipophilin 的效应;如果荷脂细胞同时与 PKC 抑制剂 300 nmol/L CAL 共孵育 16 h,可以有效地抑制荷脂所致的 adipophilin 高表达。

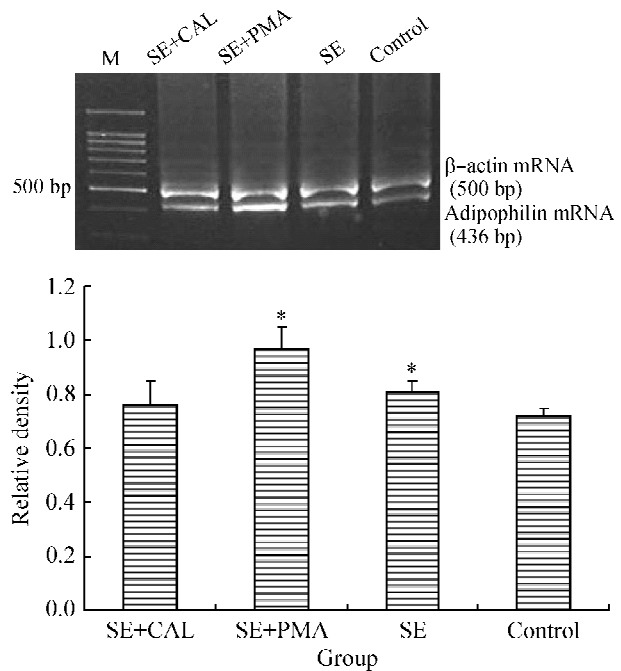


Fig 5 RT-PCR of adipophilin mRNA in THP-1 macrophages incubated with CAL or PMA. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control. M indicates DNA marker. Untreated macrophages (control) or SE-laden macrophages incubated in the presence of 300nmol/L CAL for 16 h (SE + CAL), or presence of 100nmol/L PMA for 16 h (SE + PMA) or absence (SE). The bar chart represents relative density which is the ratio of the two band scanning absorbance at the same lane. The data shown are representative of three separate analyses for each group.

图 5 RT-PCR 检测 PMA 和 CAL 对荷脂 THP-1 巨噬细胞 adipophilin mRNA 表达的影响

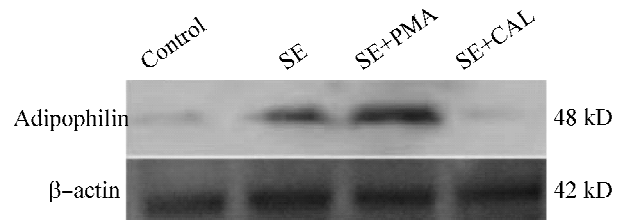


Fig 6 Immunoblot of effect of PMA and CAL on adipophilin expression in THP-1 macrophages. Untreated THP-1 macrophages (control) or SE-laden macrophages incubated in the absence (SE) or presence of 100nmol/L PMA for 16 h (SE + PMA) or presence of 300 nmol/L CAL for 16 h (SE + CAL). Adipophilin expression increased in the presence of PMA, and decreased in the presence of CAL.

图 6 PMA 和 CAL 对荷脂 THP-1 巨噬细胞 adipophilin 蛋白表达的影响

4 PMA 和 CAL 对 THP - 1 巨噬细胞脂质蓄积的影响

油红 O 染色结果显示(图 7), 荷脂细胞内脂滴的数量明显增加, 部分脂滴融合, PKC 激动剂 PMA 处理荷脂细胞后, 可见细胞内脂滴的数量增加, 蓝染的细胞核周围蓄积了大量的脂滴。而 CAL 处理后细胞内脂滴的数量降低, 但仍比未荷脂细胞组高。

HPLC 检测对照组, SE、SE + PMA、SE + CAL 组细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值依次为(25.4 ± 8.4)%、(57.3 ± 3.5)%、(69.8 ± 9.5)%、(40.1 ± 9.1)%。结果显示(图 8), PMA 与 ox - LDL 协同增强细胞内胆固醇酯所占的比例, PMA 的处理使细胞已经完全转变为泡沫细胞, CAL 可以抑制 ox - LDL 造成的胆固醇酯蓄积。

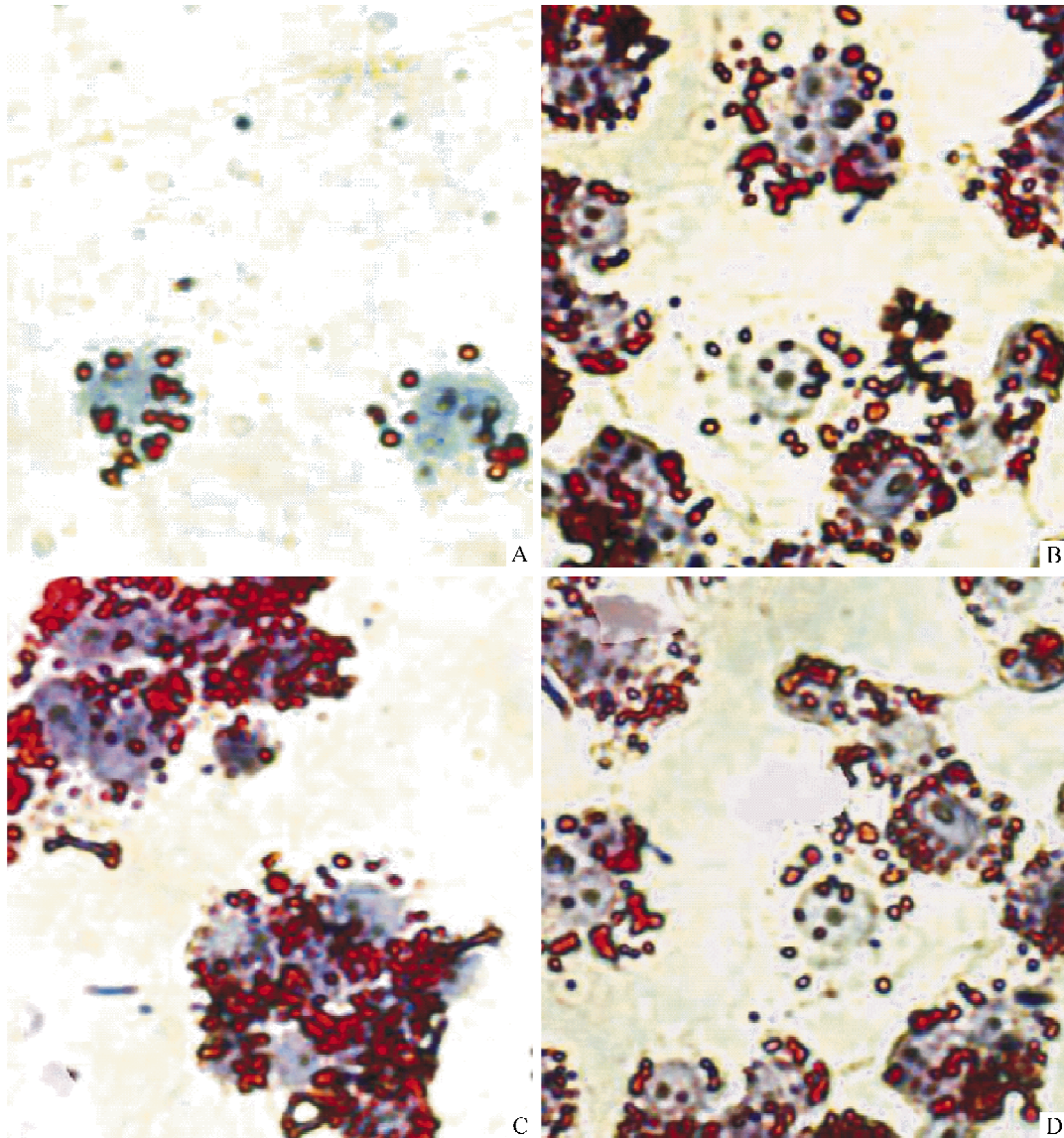


Fig 7 Effect of PMA and CAL on the formation of lipid droplets in SE - laden macrophages(×400). After treatment, cells were collected and stained with red oil O. A; untreated macrophages. B; SE - laden macrophages which made from THP - 1 macrophages incubated with 50 mg/L ox - LDL for 16 h show moderate accumulation of lipid droplets. C; Cotreatment with PMA results in marked accumulation of lipid droplets. D; Prominent lipid droplet decrease is induced by CAL.

图 7 PMA 和 CAL 对荷脂 THP - 1 巨噬细胞脂滴形成的影响

5 高表达 adipophilin THP - 1 巨噬细胞中 ACAT1 表达及细胞内胆固醇的改变

使用梭华 - Sofast™ 基因转染试剂将 pcDNA3.1 - HA - adi 及空白的 pcDNA3.1 载体转染 THP - 1 巨噬细胞后, Western blotting 检测转染后 adipophilin

的表达。结果显示, pcDNA3.1 - HA - adi 转染可明显上调 adipophilin 的表达水平(图 9)。

S - 58035 是 ACAT 的抑制剂^[19]。THP - 1 巨噬细胞转染 pcDNA3.1 - HA - adi 后, 再顺次使用 80 mg/Lox - LDL 及 10 mg/LS - 58035 各处理 24 h。

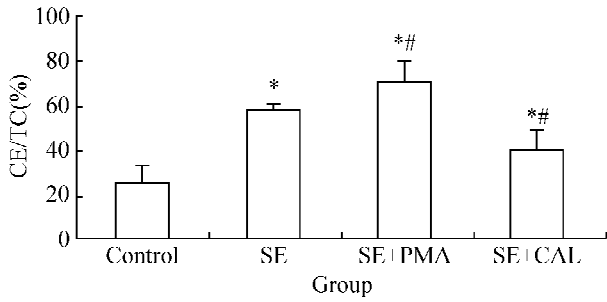


Fig 8 HPLC analyzes effect of PMA and CAL on the cellular cholesteryl ester formation in SE-laden macrophages. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.05$ vs SE.

图 8 HPLC 检测 PMA 和 CAL 对荷脂 THP-1 巨噬细胞 CE/TC 的影响

图 10 显示,各个转染组加入 ox-LDL 后,ACAT1 的表达均有上调,其中 pcDNA3.1-HA-adi 转染组表达最高。不使用 ox-LDL 处理的各组,pcDNA3.1-HA-adi 转染均上调 ACAT1 表达,加入 ACAT 抑制剂 S-58035 后,这种上调作用均受到抑制。而作为对照的 pcDNA3.1 转染组对 ACAT1 表达无影响。

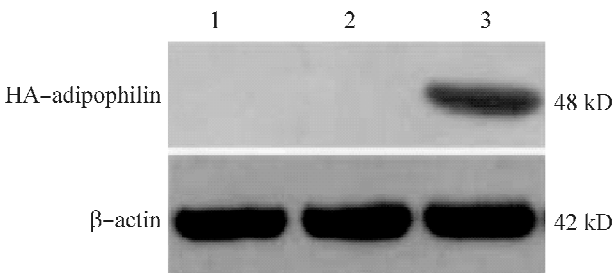


Fig 9 Immunoblot of effect of pcDNA3.1-HA-adi transfection on adipophilin expression. Lane 1-3: THP-1 macrophages transfected without (lane1) or with pcDNA3.1 (lane2) or pcDNA3.1-HA-adi (lane3).

图 9 pcDNA3.1-HA-adi 转染 THP-1 巨噬细胞后 adipophilin 蛋白表达的改变

使用 HPLC 观察高表达 adipophilin 后对细胞内胆固醇酯的变化,图 11 显示,与各自的未加 ox-LDL 组相比,加入 ox-LDL 后,细胞内 CE/TC(胆固醇酯:总胆固醇)值均有明显增加,其中 pcDNA3.1-HA-adi 转染组增加幅度最大。有意义的是在不加 Ox-LDL 的情况下,高表达 adipophilin 的细胞内 CE/TG 却最大。加入 ACAT 抑制剂 S-58035 后,这种作用受到了抑制。作为对照的 pcDNA3.1 转染不影响细胞内脂质蓄积。

讨 论

泡沫细胞内的脂质来源于血液中的修饰脂蛋白(例如,ox-LDL),当这些修饰的脂质被吞噬到细胞

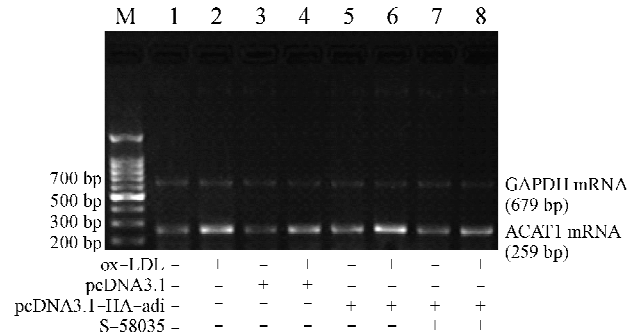


Fig 10 Expression of ACAT1 mRNA in overexpression adipophilin THP-1 macrophages. RT-PCR of adipophilin in THP-1 macrophages transfected without or with pcDNA3.1 or pcDNA3.1-HA-adi, then incubated with 80 mg/L ox-LDL for 24 h and 10 mg/L S-58035 for 24 h, respectively. M: marker; 1: control; 2: ox-LDL; 3: pcDNA3.1; 4: ox-LDL + pcDNA3.1; 5: pcDNA3.1-HA-adi; 6: ox-LDL + pcDNA3.1-HA-adi; 7: pcDNA3.1-HA-adi + S-58035; 8: ox-LDL + pcDNA3.1-HA-adi + S-58035.

图 10 高表达 adipophilin 的 THP-1 巨噬细胞中 ACAT1 表达的改变

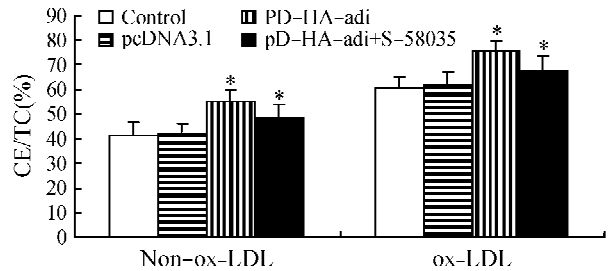


Fig11 HPLC analyzes effect of adipophilin overexpression on the cellular cholesteryl ester formation. $\bar{x} \pm s$. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control.

图 11 高表达 adipophilin 的 THP-1 巨噬细胞中胆固醇酯/总胆固醇的改变

后,主要以脂滴的形式储存于胞浆,脂滴被蛋白不完全包裹。在生理状态下,adipophilin 主要存在于新生脂滴的周围,但是,当脂滴成熟后,adipophilin 消失,被另一种脂滴周围蛋白 perilipin 代替。在病理状态下,adipophilin 与泡沫细胞形成关系密切。Larigauderie 等^[20]发现,高表达 adipophilin 的 THP-1 巨噬细胞与 100 mg/L 乙酰化低密度脂蛋白(acetylated low density lipoprotein, AcLDL)共孵育后 48 h,细胞内三酰甘油及胆固醇分别上升了 43% 和 67%。用 siRNA 使 adipophilin 表达降低后,两者的蓄积均明显下降。并且 adipophilin 表达的高低不影响 AcLDL 受体的数量及亲和力,与脂质流出相关的基因如 ABCA1 及 apoE 的表达亦无改变。但是,adipophilin 促使泡沫细胞形成是通过胆固醇代谢通路上的哪个环节而发

生作用的尚不清楚。

PKC 是细胞内信号转导的重要分子, PKC α 在动脉粥样硬化内膜增厚部位表达上调。静息状态下 PKC 多位于胞浆, 激活时从胞浆转位至胞膜, 并经历一系列复杂的磷酸化过程。PKC 的活性可影响细胞内胆固醇流入和外排^[8]。在动脉粥样硬化斑块中, ACAT1 的表达增加。如果将 ACAT1^{-/-} 的小鼠与 LDLR^{-/-} 的小鼠杂交得到双缺失的后代, 发现动脉粥样硬化斑块增大, 巨噬细胞内游离胆固醇增加^[21]。很多实验室还发现 ACAT 抑制剂能使动脉壁的胆固醇下降, 冠状动脉的斑块减少。

总结有关 PKC 及 ACAT 的研究, 结合我们实验室的研究成果^[12,13], 我们推测 adipophilin 可能是通过激活 PKC, 进一步引起 ACAT1 表达的增加, 从而使细胞内胆固醇酯积聚。本文首先观察了兔 As 病变的主动脉 adipophilin 和 PKC α 的表达, 发现两者在增厚内膜处同时表达增加。而且, 免疫组化染色还发现, PKC α 在中膜也表达增高。在细胞水平上, 用不同浓度的 ox-LDL 处理 THP-1 巨噬细胞 24 h, 使细胞负荷胆固醇酯, 随着 ox-LDL 浓度的不断增加, adipophilin 及 ACAT1 的 mRNA 水平也随之上调, 两者存在平行关系。同时, 胞膜磷酸化 PKC 也明显增加, 定量检测显示胞膜活性从静息状态的 $(0.067 \pm 0.009) \times 10^3$ U/L 增至 $(0.110 \pm 0.015) \times 10^3$ U/L, 两者差别显著。

细胞负荷胆固醇酯后, adipophilin、PKC、ACAT1 三者的表达具有平行关系, 那么, PKC 活性的增加与 adipophilin 的表达有没有调控与被调控的关系呢? PKC 活性的改变可否影响到 adipophilin 介导的脂质蓄积呢? 本研究采用了 PKC 的特异性激动剂 PMA 和抑制剂 CAL 处理荷脂的 THP-1 巨噬细胞。Chen 等^[18] 使用荷脂的 RAW264.7 巨噬细胞发现, adipophilin 是调控巨噬细胞中脂质代谢的一个重要蛋白, 它可能受调于 PKC 的活性。本研究结果显示, 与对照组相比, 荷脂细胞中 adipophilin 表达明显增加。如果荷脂细胞同时与 PKC 激动剂 100 nmol/L PMA 共孵育 16 h, 可以协同增强这种上调 adipophilin 的效应; 如果荷脂细胞同时与 PKC 抑制剂 300 nmol/L CAL 共孵育 16 h, 可以有效地抑制荷脂所致的 adipophilin 高表达。油红 O 染色显示, 荷脂细胞内脂滴的数量明显增加, 部分脂滴融合, PKC 激动剂 PMA 处理荷脂细胞后, 可见细胞内脂滴的数量增加; 而 CAL 处理后细胞内脂滴的数量降低。这些结果说明, adipophilin 可以通过 PKC 而发挥蓄积细胞内脂质的作用。

但是, adipophilin 与 ACAT1 的关系如何呢? 本

文设计了复制高表达 adipophilin 的巨噬细胞以验证它们之间的关系。THP-1 巨噬细胞转染质粒后, 加入 ox-LDL 的各个转染组 ACAT1 表达均出现不同程度的上调, 其中以高表达 adipophilin 组上调幅度最大。同为高表达 adipophilin 组, 加入 ox-LDL 后, 其 ACAT1 上升的幅度较单纯加入 ox-LDL 要大, 提示 adipophilin 与 ox-LDL 存在协同效应。而与空白组相比, adipophilin 高表达细胞而不加入 ox-LDL 也能上调 ACAT1 表达, 提示 adipophilin 上调 ACAT1 表达不依赖于细胞内胆固醇含量, 其自身就有这种作用。无论是空白组与 pcDNA3.1 转染组相比, 还是 ox-LDL 组与 ox-LDL + pcDNA3.1 转染组相比, ACAT1 的表达都不存在明显差异, 提示 pcDNA3.1 转染对 ACAT1 的表达没有影响, 也进一步表明 pcDNA3.1-HA-adi 转染组上调 ACAT1 表达是由外源性 adipophilin 基因引起, 而与转染试剂及载体无关。

S-58035 是一种常用的 ACAT 抑制剂, 很多实验表明它能有效抑制巨噬细胞中 ACAT 参与的脂质蓄积^[22]。令人感兴趣的是, 在 S-58035 存在的情况下, 无论是 pcDNA3.1-HA-adi 转染组, 还是 Ox-LDL + pcDNA3.1-HA-adi 转染组, ACAT1 的表达都是下调的。这一现象支持 adipophilin 为 ACAT1 上游调控基因的假设。因为 pcDNA3.1-HA-adi 转染可上调 ACAT1 表达, 表明 adipophilin 有调控 ACAT1 表达的能力, 而使用 ACAT 抑制剂后, 转染引起的上调即受到抑制, 表明 adipophilin 的这种调控作用位于 ACAT 抑制剂作用的上游, 即 adipophilin 可能为 ACAT1 上游调控基因。

高表达 adipophilin 后, THP-1 巨噬细胞内脂质也发生改变。与各自的未加 ox-LDL 组相比, 加入 ox-LDL 后, 细胞内总胆固醇及 CE/TC 值均有明显增加, 其中又以高表达 adipophilin 组增加幅度最大, 表明 adipophilin 可促进 ox-LDL 诱导的脂质蓄积。与空白组相比, 仅 pcDNA3.1-HA-adi 转染而不存在 ox-LDL 也能增加细胞内胆固醇酯的比重, 表明 adipophilin 自身也能促进细胞内的脂质蓄积。这些发现与 ACAT1 表达的改变相一致, 两者共同提示 adipophilin 可能通过 ACAT1 来影响细胞内脂质代谢。使用 S-58035 后, 无论是 pcDNA3.1-HA-adi 转染组, 还是 ox-LDL + pcDNA3.1-HA-adi 转染组, 细胞内胆固醇酯的比重都下降, 这些结果进一步支持 adipophilin 可能为 ACAT1 上游调控基因这一假设。

从本文的结果来看, ACAT1 是 adipophilin 促 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的一个作用靶点, adipophilin 可能通过 PKC α 来调控 ACAT1, 进一步影响

细胞内脂质代谢。目前,已经有研究者^[23,24]申请了利用反义寡核苷酸和 siRNA 技术,针对 adipophilin 为作用靶点,治疗 adipophilin 相关疾病(如动脉粥样硬化、高胆固醇血症、心肌梗死、脑缺血及外周血管疾病等)的专利。由此看来,adipophilin 正在成为防治 AS 的新靶点,本文的结果将为 AS 的发病机制和治疗提供新的理论根据。

(致谢:感谢中国国家留学基金委对本文的完成提供生活上的帮助。感谢美国北卡罗来纳大学医学院卡罗来纳心血管生物学中心 Runge 实验室对本文部分工作的完成提供实验场所和仪器。)

[参 考 文 献]

- [1] 杨永宗,阮长耿,唐朝枢,等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京:科学出版社,2004. 51 - 52.
- [2] 赵战芝,杨永宗,王 佐,等. 肥大细胞改变 THP - 1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇含量及抑制胆固醇流出[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(8):1457 - 1463.
- [3] Liu P, Ying Y, Zhao Y, et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic[J]. J Biol Chem, 2004, 279(5):3787 - 3792.
- [4] Tauchi - Sato K, Ozeki S, Houjou T, et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition[J]. J Biol Chem, 2002, 277(46):44507 - 44512.
- [5] Wang X, Reape TJ, Li X, et al. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low - density lipoprotein and in atherosclerotic lesions[J]. FEBS Lett, 1999, 462(1 - 2):145 - 150.
- [6] Shiffman D, Mikita T, Tai JTN, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol - loaded macrophages[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48):37324 - 37332.
- [7] Via DP, Pons L, Dennison DK, et al. Induction of acetyl - LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP - 1[J]. J Lipid Res, 1989, 30(10):1515 - 1524.
- [8] Li Q, Tsujita M, Yokoyama S. Selective down - regulation by protein kinase C inhibitors of apolipoprotein - mediated cellular cholesterol efflux in macrophages[J]. Biochemistry, 1997, 36(40):12045 - 12052.
- [9] Chang C, Dong R, Miyazaki A, et al. Human acyl - CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006, 38(3):151 - 156.
- [10] Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, et al. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8):1711 - 1717.
- [11] Gao J, Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long - chain fatty acids[J]. J Cell Physiol, 2000, 182(2):297 - 302.
- [12] 袁中华,杨永宗,尹卫东,等. Adipophilin 在动脉粥样硬化病变和脂质负荷细胞中的作用研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(4):549 - 554.
- [13] 袁中华,杨永宗,尹卫东,等. 反义 adipophilin 寡核苷酸降低 ACAT 活性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(10):930 - 935.
- [14] Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, et al. CLA - 1/SR - BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator - activated receptors[J]. Circulation, 2000, 101(20):2411 - 2417.
- [15] Yu H, Gutman RL, Ryu BH, et al. Cholesteryl esterase - treated LDL augments oxidized LDL - mediated cholesteryl ester deposition in mouse peritoneal macrophages[J]. Atherosclerosis, 1998, 140(1):35 - 43.
- [16] 杜卓明. 实用组织学技术[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1998. 312 - 313.
- [17] 王 佐,李全忠,杨向东,等. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯[J]. 中国动脉硬化杂志,1998,6(4):317 - 320.
- [18] Chen JS, Greenberg AS, Tseng YZ, et al. Possible involvement of protein kinase C in the induction of adipose differentiation - related protein by sterol ester in RAW 264.7 macrophages[J]. J Cell Biochem, 2001, 83(2):187 - 199.
- [19] Davalos A, Fernandez - Hernandez C, Cerrato F, et al. Red grape juice polyphenols alter cholesterol homeostasis and increase LDL - receptor activity in human cells *in vitro*[J]. J Nutr, 2006, 136(7):1766 - 1773.
- [20] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP - 1 macrophages: potential role in atherogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(3):504 - 510.
- [21] Fazio S, Major AS, Swift LL, et al. Increased atherosclerosis in LDL receptor - null mice lacking ACAT1 in macrophages[J]. J Clin Invest, 2001, 107(2):163 - 171.
- [22] Gaus K, Kritharides L, Schmitz G, et al. Apolipoprotein A - 1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages[J]. Faseb J, 2004, 18(3):574 - 576.
- [23] Dobie KW. Modulation of adipophilin expression [P]. USA: PCT/US2003/039261, 2004 - 06 - 24.
- [24] Larigauderie G. Methods for screening compounds modulating cholesterol flux and uses thereof [P]. France: PCT/FR2003/003303, 2004 - 06 - 03.