

[文章编号] 1000- 4718(2006)03- 0581- 05

# 脂肪分化相关蛋白反义寡核苷酸降低乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶活性\*

袁中华<sup>1</sup>, 杨永宗<sup>1</sup>, 尹卫东<sup>2</sup>, 易光辉<sup>1</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>, 唐显庆<sup>3</sup>, 万载阳<sup>1</sup>, 吴孟津<sup>3</sup>  
(南华大学 <sup>1</sup>心血管病研究所, <sup>2</sup>生命科学与技术学院, <sup>3</sup>医学院, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** **目的:** 已经发现随着细胞内胆固醇酯的积聚, 脂肪分化相关蛋白的表达明显增加。本文进一步探讨脂肪分化相关蛋白干预细胞内胆固醇代谢的作用位点。**方法:** Ox- LDL 组为 80 mg/L 氧化低密度脂蛋白与 C57BL/6J 小鼠腹腔巨噬细胞共同孵育, Ox- LDL+ antisense 组另加 1 mmol/L 脂肪分化相关蛋白反义寡核苷酸, 在不同的时点取样, 共观察 4 d。使用荧光分光光度计观察细胞内胆固醇酯的改变; 使用脂肪分化相关蛋白抗体间接法结合流式细胞术, 观察脂肪分化相关蛋白表达量的变化; 使用 Ox- r[CL- <sup>3</sup>H]LDL 和液体闪烁计数器观察细胞对氧化低密度脂蛋白摄入量的变化, 并同时测定乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶的活性。**结果:** 72 h 后, Ox- LDL+ antisense 组细胞内胆固醇酯(19.9±1.9) mg/g protein 显著低于 Ox- LDL 组(46.6±3.4) mg/g protein。4 d 观察期间, 脂肪分化相关蛋白蛋白的表达量两组细胞都增加, 从 12 h 时点开始, Ox- LDL 组大于 Ox- LDL+ antisense 组, 在 4 d 时点, Ox- LDL 组明显高于 Ox- LDL+ antisense 组。两组细胞摄入 Ox- r[CL- <sup>3</sup>H]LDL 的量逐渐增加, 但是, Ox- LDL+ antisense 组摄入量从 1 d 后明显低于 Ox- LDL 组, 在 2 d 和 4 d 时点, 两组差别仍有显著性。乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶相对活性从 6 h 到 2 d 表现为增加, 在 2 d 时点, 两组比较差别显著, Ox- LDL+ antisense 组的活性明显低于 Ox- LDL 组。但从 2 d 到 4 d, 乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶相对活性稳定。ACAT 的活性与脂肪分化相关蛋白蛋白的表达量相关分析表明, Ox- LDL 组  $R^2=0.6176$  ( $P<0.05$ ), Ox- LDL+ antisense 组  $R^2=0.8212$  ( $P<0.05$ )。**结论:** 抑制脂肪分化相关蛋白表达能引起细胞摄入外源性脂蛋白减少和乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶的活性降低, 提示脂肪分化相关蛋白与脂滴的代谢功能密切相关, 且乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶有可能是其潜在的位点。

**[关键词]** 甾醇 O- 酰基转移酶; 酰基辅酶 A; 巨噬细胞; 胆固醇; 寡核苷酸类, 反义

**[中图分类号]** R361.3

**[文献标识码]** A

## Adipophilin antisense oligonucleotides decrease ACAT activity

YUAN Zhong-hua<sup>1</sup>, YANG Yong-zong<sup>1</sup>, YIN Wei-dong<sup>2</sup>, YI Guang-hui<sup>1</sup>, TANG Chao-ke<sup>1</sup>, TANG Xian-qing<sup>3</sup>, WAN Zai-yang<sup>1</sup>, WU Meng-jin<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Cardiovascular Disease, <sup>2</sup>Life Science and Technology College, <sup>3</sup>Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** Based on the finding of adipophilin expression with the increase in cellular cholesterol, the aim of the present study was to look for the active site of adipophilin in cellular cholesteryl metabolism. **METHODS:** Mouse peritoneal macrophages were incubated with 80 mg/L Ox- LDL (Ox- LDL group) or 80 mg/L Ox- LDL plus 1 mmol/L adipophilin antisense oligonucleotides (Ox- LDL+ antisense group), respectively. At the various time points, the incubated cell samples were observed with adipophilin immunofluorescence staining, flow cytometric analysis and cellular cholesterol analysis. **RESULTS:** The Ox- LDL + antisense group cells contained significantly lower cholesteryl ester (19.9±1.9) mg/g (protein) than that of cells in Ox- LDL group (46.6±3.4) mg/g (protein) at 4 days. From 12 h, expression of adipophilin in Ox- LDL group increased more quickly than that of the cells in Ox- LDL+ antisense group. At day 4, the level of adipophilin expression in Ox- LDL group was significantly higher than that in Ox- LDL+ antisense group. During the observation, the amount of Ox- r[CL- <sup>3</sup>H]LDL taking up increased gradually in both groups, however, from day 1 the taking up amount in Ox- LDL+ antisense group was less than that in Ox- LDL group. There was a statistical difference between the two groups from day 2 to day 4. From 6 h to day 2, the relative ACAT activity increased in both groups. The relative ACAT activity kept unchanged from day 2 to day 4 in the two groups. At day 2, the relative ACAT activity in Ox- LDL+ antisense group was significantly lower than that in Ox- LDL group. Correlative analysis be-

**[收稿日期]** 2004- 07- 13 **[修回日期]** 2004- 10- 09

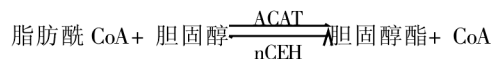
\* **[基金项目]** 湖南省教育厅科研项目基金资助项目(No. 01C191)

Tel: 0734- 8281311; E- mail: yzh5555@163.com

tween activity of ACAT and adipophilin expression showed than  $R^2$  were 0.6176 and 0.8212 ( $P < 0.05$ ) in Ox- LDL group and Ox- LDL+ antisense group, respectively. **CONCLUSION:** At least partly, expression of adipophilin is related to cellular taking up of lipoproteins and to ACAT activity. Therefore, the results indicate that adipophilin has a role in metabolism of cellular lipid droplets and the effective point may be ACAT.

[KEY WORDS] Sterol O- acyl- transferase; Acyl coenzyme A; Macrophages; Cholesterol; Oligonucleotides, antisense

泡沫细胞形成是导致动脉粥样硬化( atherosclerosis, As) 病变发展和斑块不稳定的主要原因<sup>[1]</sup>, 其生物化学改变是细胞内胆固醇代谢障碍。我们已经观察到<sup>[2]</sup>, 随着细胞内胆固醇酯的积聚, 脂肪分化相关蛋白( adipophilin) 的表达明显增加。Londos 等<sup>[3]</sup> 提出, adipophilin 在细胞内胆固醇代谢的作用位点在哪里, 这是目前研究急需解答的问题。在细胞内, 催化胆固醇代谢的关键酶是乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶( acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase, ACAT) 和中性胆固醇酯水解酶( neutral cholesteryl ester hydrolase, nCEH), 它们催化的反应是:



两者的作用相反, 处于动态平衡之中<sup>[4]</sup>。在粥样硬化的动脉中, ACAT 活性增加 50 倍<sup>[5]</sup>。Matsuo 等<sup>[6]</sup> 发现, ACAT 抑制剂 FR145237 能使动脉壁的胆固醇下降, 冠状动脉的斑块减少。在细胞质中, adipophilin 分布在脂滴的周围, 从空间结构上看, 它应该与粗面内质网上的 ACAT 比较接近, 但两者是否有关, 目前未见报道。

本实验在使用 adipophilin 反义寡核苷酸观察对细胞内胆固醇影响的基础上, 观察 adipophilin 水平的变化, 探讨它与细胞摄入重构氧化低密度脂蛋白及 ACAT 活性的关系, 以揭示 adipophilin 在泡沫细胞形成中的作用点。

## 材 料 和 方 法

### 1 试剂与仪器

[<sup>3</sup>H]- 胆固醇 [ <sup>14</sup>C]- 油酸 [ <sup>3</sup>H]- 胆固醇油酸酯由中国原子能科学研究院同位素研究所合成; 马铃薯粉 2, 5- 二甲基咪唑, 1, 4- 双[ 2' ( 5- 苯基咪唑) - 2]- 苯购自美国 Sigma 公司; Epics Alfra 型流式细胞仪系美国 Beckman- Coulter 公司产品; FJ- 2107P 型液体闪烁计数器系西安 262 厂产品; 真空冷冻干燥机系美国 Labconco 公司产品。

### 2 细胞培养

取 8 周龄、无感染的 C57BL/6J 小鼠, 在无菌条件下, 取腹腔巨噬细胞, 调整细胞数为  $1 \times 10^9/L$  -  $5 \times 10^9/L$ , 再转移到 30 mL 培养瓶或 6 孔培养板中培养( 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度, 37 °C), 使用含 10% 胎牛血清( fetal calf serum, FCS) 的 RPMI- 1640 培养基。

### 3 细胞内胆固醇测定

参考文献<sup>[7]</sup> 的方法, 使用 960 型荧光分光光度计测定荧光强度( 氙灯, 激发波 325 nm, 发射波 415 nm, 2 mm 狭缝, 上海第三分析仪器厂), Lowry 法测细胞蛋白浓度。

### 4 脂蛋白的制备及氧化修饰

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<sup>[8]</sup> 的方法制备铜氧化的 Ox- LDL。本实验所用 LDL 在氧化前 LPO 含量为 1.5 μmol TBARS/g 胆固醇, 氧化修饰后为 17.2 μmol TBAS/g 胆固醇。

### 5 重构 LDL 的制备及氧化

重构 LDL 的制备( reconstituted low density lipoprotein, r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL) 参考文献<sup>[9]</sup> 的方法, 16 mg ( 36.8 mL) 新鲜制备的 LDL 溶于 5 mL 0.15 mol/L NaCl 和 0.3 mmol/L EDTA- Na<sub>2</sub> ( pH 7.4) 中, 然后放在 0.3 mmol/L EDTA- Na<sub>2</sub> ( pH 7.0, 4 °C) 透析 60 h。透析后, LDL 转移到 10 mL 试管中, 加入 25 mg 纯化的马铃薯粉, 搅拌均匀, 并放入液氮中使之冻干在管壁上。加入 5 mL 正庚烷( - 10 °C) 并剧烈振荡 1 h, 离心( 2 000 r/min, 10 min, 4 °C), 弃上清后, 再用正庚烷抽提 3 次, 每次 30 min, - 10 °C。完全移去上面的正庚烷后, 加入 200 μL 含有 6 mg [ <sup>3</sup>H]- 胆固醇油酸酯( 0.5 Ci/L), 在 - 10 °C 环境下, 振荡 1.5 h, 然后在真空冷冻干燥机中冻干。重新溶于 12 mL 10 mmol/L Tricine, pH 8.4, 在 4 °C 下稳定 41 h, 离心 2 000 r/min, 10 min, 4 °C, 把上清液转移到 EP 管中, 12 000 r/min, 20 min, 4 °C 再离心。把上清液移入新的试管中, 并使用 0.8 μm 的滤膜过滤, 充氮气并在 4 °C 温度下保存。

使用 r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL, 按照 2.5 的方法制备氧化重构 LDL( reconstituted oxidized low density lipoprotein, Ox- r[ CL- [ <sup>3</sup>H] LDL) 。

### 6 实验分组及处理

参考文献<sup>[10]</sup> 的小鼠 adipophilin mRNA 序列, 针对第 76- 90 碱基, 包括起始密码子 AUG, 设计反义( 5' - TGCTGCTGCCATTTT - 3' )、正义( 5' - AAAATGCGACGACGA - 3' ) 和错义( 5' - GAGTTGTATCCAGC

- 3') 寡核苷酸, 由上海生工生物工程公司合成, PAGE 纯化。反义、正义和错义的寡核苷酸直接加入培养基, 终浓度为 1 mmol/L, 每天重复 1 次,

实验分 5 组: 对照组, 含 10% FCS 的 RPMI- 1640 培养基; Ox- LDL 组, 培养基中加入 80 mg/L OxLDL (或 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL); Ox- LDL+ antisense 组, 培养基中加入 80 mg/L Ox- LDL (或 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL) 和 1 mmol/L 的反义 adipophilin 寡核苷酸; Ox- LDL+ sense 组, 培养基中含有 80 mg/L Ox- LDL 和 1 mmol/L 的正义 adipophilin 寡核苷酸; Ox- LDL+ missense 组, 培养基中含有 80 mg/L Ox- LDL 和 1 mmol/L 的错义 adipophilin 寡核苷酸。各组细胞分别处理 0.6 h、12 h、1 d、2 d、3 d 和 4 d。

## 7 细胞摄入重构氧化低密度脂蛋白量的测定

待细胞处理结束后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗 3 次, 然后用细胞擦刮下细胞, 重悬于 0.5 mL PBS 中, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 弃去上清液。加入异丙醇 (0.5 L/g protein), 超声破碎细胞 (每次 2 s, 共 5 次)。再离心 (1 000 r/min, 15 min), 沉淀物溶于 50 μL 0.1 mol/L NaOH, Lowry 法测蛋白浓度。上清液移入闪烁瓶, 闪烁液使用含有 0.5% 2, 5- 二甲基噻唑和 0.03% 1, 4- 双[2' (5- 苯基噻唑) - 2] - 苯的二甲苯 3 mL, 混合后使用液体闪烁计数器记录放射强度 (counts·min<sup>-1</sup>), 每一点的数值均由复管决定。

## 8 流式细胞术测定 adipophilin 蛋白的表达

收集处理结束后的细胞, 约 2 × 10<sup>6</sup> 个/样品, 用冷的 PBS 2 mL 洗涤细胞 1 次, 离心 1 000 r/min, 5 min。弃上清后加入 4% 多聚甲醛 2 mL 室温固定细胞 40 min, 离心 1 000 r/min, 5 min。弃上清后加入冷的 PBS 2 mL 重悬细胞, 吹打均匀。加入 1: 50 稀释的 adipophilin 单抗, 饱和剂量加入, 冰浴 40 min。离心 1 000 r/min, 5 min, 弃上清后再加入 2 mL 冷 PBS, 再离心 1 000 r/min, 5 min。弃上清后加入 FITC 标记的 II 抗, 冰浴避光 40 min 后, 离心 1 000 r/min, 5 min, 用冷的 PBS 洗涤 2 次。加入 1% 多聚甲醛 0.5 mL 重悬细胞, 吹打分散, 流式细胞仪检测。数据分析计数 10 000 个细胞, 重复 3 次。

## 9 乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶活性的测定

参考文献<sup>[11]</sup>的方法, 待细胞处理结束后, 换无血清 RPMI- 1640 培养液, 并加入 [<sup>14</sup>C] - 油酸/HAS 乳剂, 孵育 2 h。然后用冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 再刮取收集细胞。离心 (1 000 r/min, 30 min, 4 °C), 弃上清后用 0.4 mL H<sub>2</sub>O 重悬细胞, 并加入含有 100 μg [<sup>3</sup>H] - 胆固醇的氯仿/甲醇 (1: 2) 溶液, 37 °C 孵育 1 h。离心 (5 000 r/min, 10 min), 把上清液转移到新的试管中, 沉淀物溶于 0.5 mL 0.1 mol/L NaOH 中,

Lowry 法测蛋白含量。

上清液中加入氯仿/水 (1: 1) 溶液 2 mL, 涡旋混合, 分两层。使用薄层层析分离下层相中的 [<sup>3</sup>H] - 游离胆固醇和 [<sup>14</sup>C] - 胆固醇酯。薄层层析使用硅胶板, 流动相使用正庚烷/二乙醚/冰乙酸 (90: 20: 1) 溶液, 碘蒸汽染色。与标准胆固醇和胆固醇酯对照后, 刮下直径 1 cm 的斑点放入闪烁瓶, 闪烁液含有 0.5% 2, 5- 二甲基噻唑和 0.03% 1, 4- 双[2' (5- 苯基噻唑) - 2] - 苯的二甲苯 3 mL, 混合后液体闪烁计数器计数。计数后校正 [<sup>3</sup>H] - 游离胆固醇的回收率, 用 [<sup>14</sup>C] - 油酸的放射强度 (counts·min<sup>-1</sup>) 与 0 h 的放射强度 (counts·min<sup>-1</sup>) 的百分比值表示结果。

## 10 统计学处理

所有实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计分析使用 SPSS 11.0 分析软件, 独立样本 *t* 检验 ( $P < 0.05$ )。

## 结 果

### 1 细胞内胆固醇含量的变化

小鼠腹腔巨噬细胞与 80 mg/L Ox- LDL 孵育 72 h 后, 细胞内胆固醇酯明显增加 (表 1), Ox- LDL 组细胞内胆固醇酯为 (46.6 ± 3.4) mg/g protein, 与对照组 (2.5 ± 2.2) mg/g protein 相比, 差别显著。而 Ox- LDL+ antisense 组细胞内胆固醇酯为 (19.9 ± 1.9) mg/g protein, 与 Ox- LDL 组相比, 差别显著, 而作为阴性对照的 Ox- LDL+ sense 组和 Ox- LDL+ missense 组与 Ox- LDL 组相比差别无显著。见表 1。

表 1 细胞内胆固醇的变化

Tab 1 Changes of cellular cholesterol (mg/g protein.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| Group              | Free       | Total       | Ester       |
|--------------------|------------|-------------|-------------|
| Control            | 40.1 ± 3.1 | 42.6 ± 2.0  | 2.5 ± 2.2   |
| Ox- LDL            | 51.2 ± 1.7 | 97.8 ± 3.9  | 46.6 ± 3.4  |
| Ox- LDL+ antisense | 45.5 ± 2.1 | 65.4 ± 1.7* | 19.9 ± 1.9* |
| Ox- LDL+ sense     | 43.6 ± 1.1 | 89.2 ± 2.8  | 45.6 ± 1.8  |
| Ox- LDL+ missense  | 47.1 ± 3.3 | 90.5 ± 1.6  | 43.4 ± 2.9  |

\*  $P < 0.05$  vs Ox- LDL group.

### 2 细胞摄入重构氧化低密度脂蛋白的量

把 Ox- LDL 组和 Ox- LDL+ antisense 组共孵育的 80 mg/L Ox- LDL 换成 80 mg/L Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL, Ox- LDL+ antisense 组另加 1 mmol/L adipophilin 反义寡核苷酸, 分别于 0.6 h、12 h、1 d、2 d 和 4 d 取样。从图 1 可以看出, 两组细胞摄入 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL 的量逐渐增加, 但是, Ox- LDL+ antisense 组从 1 d 后明显低于 Ox- LDL 组, 在 2 d 和 4 d 时点, 两组比较差别显著。

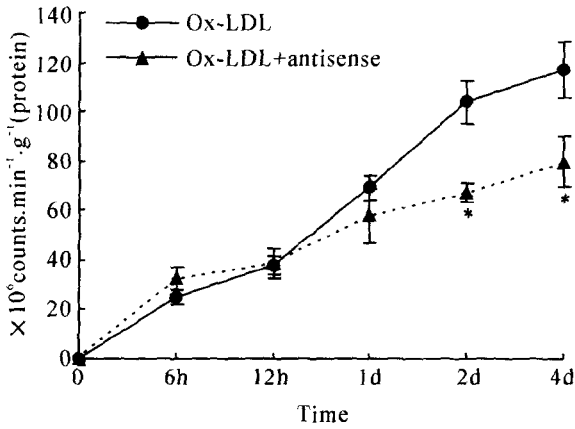


Fig 1 Change of the amount of Ox- r[CL- <sup>3</sup>H] LDL taking up by the macrophages.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs Ox- LDL group.

图 1 细胞摄入重构氧化低密度脂蛋白量的变化

### 3 Adipophilin 蛋白表达量的变化

Ox- LDL 组和 Ox- LDL+ antisense 组分别于 0、6 h、12 h、1 d、2 d 和 4 d 取样。使用 adipophilin 抗体间标法, 采用流式细胞术, 得到图 2, 纵坐标表示与 0 h 时点相比的相对荧光强度, 0 h 时点的荧光强度定为 1。可以看出, 在 4 d 的观察期间 adipophilin 蛋白的表达量在两组细胞都增加, 从 12 h 时点开始, adipophilin 的量就逐渐产生差别, Ox- LDL 组大于 Ox- LDL+ antisense 组, 且相差的幅度很均匀。在 4 d 时点, Ox- LDL 组明显高于 Ox- LDL+ antisense 组。

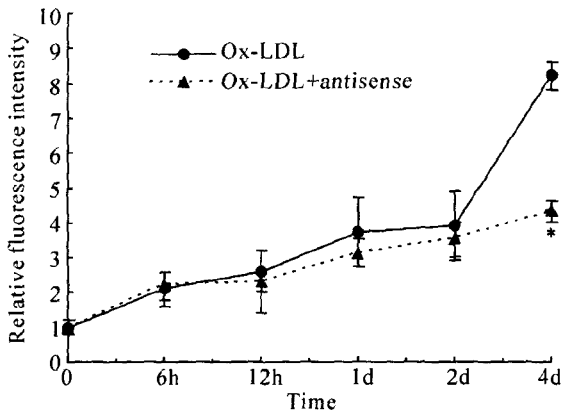


Fig 2 The relationship between time and the relative fluorescence intensity of adipophilin.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs Ox- LDL group.

图 2 Adipophilin 蛋白的相对荧光强度变化与时间的关系

### 4 乙酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶活性的变化

图 3 的纵坐标表示与 0 h 时点相比的相对 ACAT 活性, 0 h 时点的 ACAT 活性为 100, 可以看出, 从 6 h 到 2 d 时点, ACAT 的相对活性增加; 从 2 d 到 4 d 时点, ACAT 的相对活性稳定。在 2 d 时点, Ox- LDL+ antisense 组的活性明显低于 Ox- LDL 组。

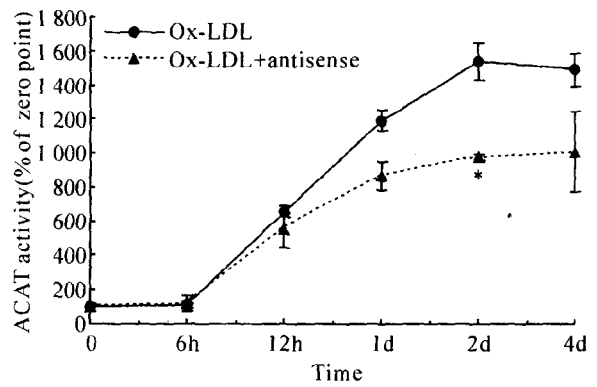


Fig 3 The relationship between time and ACAT relative activity.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs Ox- LDL group.

图 3 ACAT 的相对活性与时间的关系

### 5 Adipophilin 蛋白的表达量与 ACAT 活性的相关性分析

把 Ox- LDL 组和 Ox- LDL+ antisense 组 adipophilin 蛋白的相对荧光强度与 ACAT 相对活性进行直线相关分析。每组中, 两者都有一定的正相关性, 但是, 相关系数很低, Ox- LDL 组的  $R^2 = 0.6176$ , Ox- LDL+ antisense 组的  $R^2 = 0.8212$ 。两组相关系数的假设检验  $P < 0.05$ , 说明两者之间不呈直线相关。经过对数、指数、多项式相关分析, 相关系数不大。

### 讨 论

胆固醇是哺乳动物细胞的必需成份, 除了维持细胞膜的结构和生理、生化特性外, 还与很多调节机制有关。它还是新近发现的脂筏(lipid raft)和质膜微囊(caveolae)的主要成分<sup>[12]</sup>, 与生物膜的结构和功能密切相关。很少看到因缺乏胆固醇而引起生长受抑制, 但是却能经常看到因胆固醇过多而引起的病理状态, 最典型的是动脉粥样硬化疾病。

细胞控制胆固醇外流和内流的能力, 依赖于游离胆固醇在细胞内的一些特殊结构上的聚集。例如, 游离胆固醇在内质网的聚集, 能够刺激胆固醇的酯化, 因为 ACAT 的活性主要依赖于可用底物的量。如果这种精细的调节被打破, 就会出现细胞内胆固醇流动障碍。动脉粥样硬化中泡沫细胞的形成就是这种障碍的后果, 它表现为胆固醇酯以脂滴的形式大量堆积细胞质中。这些脂滴都有一个中性脂质的核, 外面有单层的磷脂和膜蛋白构成的膜, adipophilin 就是这些膜蛋白中的一种。

Ox- LDL 能够引起小鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇酯积聚(表 1), adipophilin 反义寡核苷酸能抑制这种作用, 而正义和错义的寡核苷酸却没有这种作用。所以在本实验中主要选择了 Ox- LDL 组和 Ox- LDL+ antisense 进行研究。

在细胞内胆固醇的流动过程中,其中 ACAT 是关键酶之一,它活性的增高直接引起细胞内胆固醇酯合成增多,游离胆固醇减少,移出细胞的胆固醇减少<sup>[13]</sup>。在本实验中(图 1 3),伴随着 ACAT 活性的增高,外源性 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL 摄入细胞也逐渐增多,ACAT 一直维持在较高的活性状态。

那么,本实验的核心物质 adipophilin 的情况如何呢?在 4 d 的观察期间 adipophilin 蛋白的表达量一直在增加,外源性 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL 摄入细胞的量也在增加。两者何者是因,何者是果,从它们增加的趋势上很难分辨。但是,从 Ox- LDL 组和 Ox- LDL+ antisense 组的比较中可以发现(图 1 2),由于反义 adipophilin 寡核苷酸的抑制作用,adipophilin 蛋白表达量在 12 h 时点,两组之间开始出现差别,而细胞摄入 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL 的量开始出现差别的时间是 1 d,推测可能是由于 adipophilin 表达量的改变影响了摄入 Ox- r[ CL- <sup>3</sup>H] LDL 的量。也就是说,adipophilin 的功能可能不仅仅是维持脂滴的结构,至少它与细胞摄入外源性脂蛋白有关。

既然 adipophilin 与细胞内胆固醇流动有关,我们又进一步分析了它与 ACAT 的关系,结果发现,adipophilin 的表达量与 ACAT 有一定的正相关,但不是直线相关。

Chen 等<sup>[14]</sup>报道了与本文互相印证的实验结果,他们在负荷胆固醇酯的 RAW264.7 巨噬细胞中,发现 adipophilin 在细胞内是一种很重要的调节脂滴代谢的蛋白,它的这种作用可能是通过 PKC 介导的。Buechler 等<sup>[15]</sup>使用酶修饰的 LDL 与血液单核细胞共孵育,能够导致泡沫细胞的形成。孵育 2 h 后,adipophilin mRNA 和蛋白就开始上调,随着 adipophilin 的表达增加,能够促进细胞吞噬游离脂肪酸显著增加。并且 PPAR $\gamma$  激动剂[15 d- PGJ(2) 和 ciglitazone]能够促进 adipophilin 的表达,说明在人单核细胞中 adipophilin 表达的增高可能由 PPAR $\gamma$  介导。从目前正在进行的实验可以看出,adipophilin 作用机制可能是多环节的。

本实验的结果除了探讨 adipophilin 的作用点可能是 ACAT 外,还表明,通过抑制 adipophilin 的表达,能够减少细胞对外源性脂蛋白的摄入,能够降低 ACAT 的活性。

#### [参 考 文 献]

- [1] Shiratori Y, Okwa AK, Tabas L. Free cholesterol loading of macrophages stimulates phosphatidylcholine biosynthesis and up-regulation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(15): 11337- 11348.
- [2] Yuan ZhH, Yang YZ, Yin WD, et al. Induced expression of adipophilin with high cholesterol diet in rabbit atherosclerotic lesions and reduced lipid accumulation with adipophilin antisense in mouse macrophages [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2003, 30(4): 549- 554.
- [3] Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, et al. Perilipin, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cell [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(1): 51- 58.
- [4] Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. —Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters [J]. *J Biol Chem*, 1980, 255(19): 9344- 9352.
- [5] 蔡海江, 李子行, 苏静怡. 动脉粥样硬化与冠心病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 135- 135.
- [6] Matsuo M, Ito F, Konto A, et al. Effect of FR145237, a novel ACAT inhibitor, on atherogenesis in cholesterol-fed and WHHL rabbits. Evidence for a direct effect on the arterial wall [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1259(3): 254- 260.
- [7] Heider JG, Boyett RL. The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture [J]. *J Lipid Res*, 1978, 19(4): 514- 518.
- [8] Yu H, Gutman RL, Ryu BH, et al. Cholesteryl esterase-treated LDL augments oxidized LDL-mediated cholesteryl ester deposition in mouse peritoneal macrophage [J]. *Atherosclerosis*, 1989, 140(1): 35- 43.
- [9] Krieger M, Brown MS, Faust JR, et al. Replacement of endogenous cholesteryl esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate. Reconstitution of a biologically active lipoprotein particle [J]. *J Biol Chem*, 1978, 253(12): 4093- 4101.
- [10] Wang XK, 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.
- [11] Cadigan KM, Chang CCY, Chang TY. Isolation of Chinese hamster ovary cell lines expressing human acyl-coenzyme A/cholesterol acyltransferase activity [J]. *J Cell Biol*, 1989, 108(6): 2201- 2210.
- [12] 杨福愉. 生物膜结构研究的一些进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(4): 495- 502.
- [13] Sviridov D. Intracellular cholesterol trafficking [J]. *Histol Histopathol*, 1999, 14(1): 305- 319.
- [14] 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.
- [15] Buechler C, Ritter M, Duong CQ, et al. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1532(1- 2): 97- 104.