

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0342-03

## 低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、 高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 单核细胞 ABC1 mRNA 表达的影响

吕 湛, 陈运贞

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆市 400016)

[关键词] 内科学; 脂蛋白和氧化型脂蛋白对 ABC1 表达的影响; 逆转录聚合酶链反应; 单核细胞; 胆固醇逆向转运; 动脉粥样硬化; 细胞培养

[摘要] 为探讨低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、氧化型高密度脂蛋白对 THP-1 单核巨噬细胞 ABC1 表达的影响, 用 40  $\mu\text{g/L}$  佛波酯作用 48 h, 将单核细胞诱导成巨噬细胞, 再分别与 20 mg/L、120 mg/L 的低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、氧化型高密度脂蛋白作用 24 h, 提取细胞中总 RNA, 用逆转录聚合酶链反应法检测其 ABC1 mRNA 的表达。结果发现, 小剂量的低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白可引起 THP-1 细胞 ABC1 mRNA 不同程度的表达增高, 小剂量的高密度脂蛋白对 ABC1 表达无明显影响; 而大剂量的低密度脂蛋白、氧化型低密度脂蛋白、高密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白可使 THP-1 细胞 ABC1 mRNA 的表达不同程度降低, 其中高密度脂蛋白组轻微降低。结果提示, 不同浓度脂蛋白和氧化型脂蛋白对血中单核细胞 ABC1 表达水平的影响可能在动脉粥样硬化的发生发展过程起重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Effects of Low Density Lipoprotein, Oxidized Low Density Lipoprotein, High Density Lipoprotein, Oxidized High Density Lipoprotein on the Expression of ABC1 mRNA in THP-1 Cells

LU Zhan, and CHEN Yurr-Zhen

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Monocyte; Reverse Cholesterol Transport; Atherosclerosis; Cell Culture; Lipoproteins; Oxidized Lipoproteins

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of low density lipoprotein (LDL), oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), high density lipoprotein (HDL), oxidized high density lipoprotein (ox-HDL) on the expression of ATP binding cassette transporter 1 (ABC1) mRNA in THP-1 cells. **Methods** Cultured THP-1 cells were induced into macrophage by 40  $\mu\text{g/L}$  phorbol ester (PMA) for 48 h and then incubated with 20 mg/L and 120 mg/L LDL, ox-LDL, HDL and ox-HDL for 24 h, total RNA of THP-1 cells were abstracted, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to inspect of the expression of ABC1 mRNA. **Results** The expression of ABC1 mRNA in THP-1 cells increased mildly in the presence of low dose of LDL, ox-LDL and ox-HDL, and low dose of HDL showed almost no effect on ABC1 expression; on the contrary, the expression of ABC1 mRNA decreased obviously in the presence of high dose of LDL, ox-LDL and ox-HDL, while HDL caused a mildly decrease in ABC1 mRNA expression in THP-1 cells. **Conclusions** Low dose of LDL, ox-LDL and ox-HDL can increase the expression of ABC1 mRNA in THP-1 cells; while high dose of LDL, ox-LDL, HDL and ox-HDL suppress ABC1 mRNA expression in THP-1 cells. This may imply that the effect of different levels of lipoproteins and oxidized lipoproteins on ABC1 expression play an important role in atherogenesis.

胆固醇逆向转运是指外周组织的胆固醇经高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 向肝脏运输的过程<sup>[1]</sup>。ATP 结合盒转运蛋白 (ATP binding cassette transporter 1, ABC1) 基因编码的 ABC1 蛋白是一

种重要的胆固醇流出调节蛋白 (cholesterol efflux regulatory protein, CERP), 几乎存在于机体所有的组织, 其中在胎盘、肝脏、肺、肾上腺和胚胎组织表达最高<sup>[2]</sup>, 它位于细胞膜上, 主要功能为将组织细胞中的胆固醇转运到细胞外, 与血浆 HDL 结合。当血浆中的脂质水平增高时, 循环中的单核巨噬细胞吞噬脂质并沉积于血管壁变成泡沫细胞, 从而导致动脉粥样硬化等病变, 因此泡沫细胞的 ABC1 蛋白表达水

[收稿日期] 2002-11-06 [修回日期] 2003-05-30

[作者简介] 吕湛, 男, 1967 年出生, 四川省南充市人, 博士研究生。  
陈运贞, 女, 1934 年出生, 上海市人, 教授, 博士研究生导师。

平将直接影响胆固醇逆向转运的程度和动脉粥样硬化斑块的形成过程。本研究以 THP-1 单核细胞为研究对象,探讨低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、氧化型 LDL (oxidized LDL, ox-LDL)、HDL、氧化型 HDL (oxidized HDL, ox-HDL) 对 ABC1 mRNA 表达的影响及其意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

RPMI1640 培养基为 Hyclone 公司产品,佛波酯 (PMA)、PCR 仪为 Sigma 公司产品,一步法逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒为 TAKARA 公司产品,总 RNA 提取试剂盒为 Omega 公司产品,日立 55P-72 超速离心机为日立公司产品,其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 脂蛋白和氧化型脂蛋白的制备

用健康人新鲜血清经超速离心制备 LDL 和 HDL。蛋白质定量后用  $\text{Cu}^{2+}$  氧化法制备 ox-LDL 和 ox-HDL: 将 LDL 和 HDL 置于含  $10 \mu\text{mol/L}$   $\text{Cu}^{2+}$  的 PBS 中,  $37^\circ\text{C}$  透析 12 h, 再经  $0.01\%$  EDTA 的 PBS 于  $4^\circ\text{C}$  透析 24 h, 滤过除菌。硫代巴比妥酸法检测丙二醛含量以鉴定氧化效果。

### 1.3 THP-1 细胞培养<sup>[3]</sup>

THP-1 细胞由中科院上海细胞所提供,用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基,  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%$   $\text{CO}_2$  培养箱中静置培养,第 3~5 代细胞用于实验。

### 1.4 实验分组

THP-1 细胞分成 5 组,即对照组、LDL 组、ox-LDL、HDL 组和 ox-HDL 组,脂蛋白干预组按脂蛋白浓度分成小剂量组和大剂量组,小剂量组分别给予 LDL、ox-LDL、HDL 和 ox-HDL  $20 \text{ mg/L}$ ,大剂量组分别给予 LDL、ox-LDL、HDL、ox-HDL  $120 \text{ mg/L}$ 。脂蛋白干预: THP-1 细胞 10 瓶,细胞浓度为  $10^9/\text{L}$ ,培养至对数生长期,加入氟波酯  $40 \mu\text{g/L}$  诱导 48 h,使之成为巨噬细胞,更换无血清培养基,同时给予相应浓度的 LDL、ox-LDL、HDL 及 ox-HDL,对照组不给任何处理,作用 24 h,用以提取 RNA。

### 1.5 细胞总 RNA 的提取

收集细胞,提取总 RNA,按试剂盒说明书操作。

### 1.6 逆转录聚合酶链反应

引物由上海生物工程技术有限公司合成。ABC1 (84 bp) 上游引物  $5'$ -TGTCCAGTCCAGTA-ATGGTTCGTG- $3'$ , 下游引物  $5'$ -AAGCGAGATATG-GTCCGGATT- $3'$ ;  $\beta$ -actin (237 bp) 上游引物  $5'$ -

GGGTCAGAAGGATTCCTATG- $3'$ , 下游引物  $5'$ -GGTCTCAAACATGATCTGGG- $3'$ 。RT-PCR 采用一步法 RNA PCR 试剂盒,其反应体系组成为:  $10 \times$  RNA PCR 缓冲液  $5 \mu\text{L}$ ,  $25 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$   $10 \mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol/L}$  dNTP  $5 \mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂 ( $40 \text{ Mu/L}$ )  $1 \mu\text{L}$ , 逆转录酶 ( $5 \text{ Mu/L}$ )  $1 \mu\text{L}$ , Taq 酶 ( $5 \text{ Mu/L}$ )  $1 \mu\text{L}$ , ABC1 上、下游引物 ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ ,  $\beta$ -actin 上、下游引物 ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ , 样本 RNA  $5 \mu\text{L}$  ( $1 \mu\text{g}$ ), 加无 RNA 酶纯水  $18 \mu\text{L}$ , 总体积为  $50 \mu\text{L}$ 。RT-PCR 反应步骤: 逆转录  $50^\circ\text{C}$   $30 \text{ min}$ ,  $94^\circ\text{C}$   $2 \text{ min}$ ;  $94^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ;  $55^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ ; 共 35 个循环。反应结束后各取  $10 \mu\text{L}$  PCR 产物用  $2\%$  琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相。RT-PCR 产物的电泳照片用 BioRad 公司提供的 Quantity One 凝胶分析软件进行半定量分析,计算 ABC1 与内参  $\beta$ -actin 的 RT-PCR 产物平均吸光度比值。

## 2 结果

小剂量的 LDL、ox-LDL 和 ox-HDL 作用于 THP-1 单核巨噬细胞 24 h 后, ABC1 mRNA 的表达轻度增高,小剂量 HDL 对 ABC1 表达无明显影响;大剂量的 LDL、ox-LDL、HDL 和 ox-HDL 可使 ABC1 mRNA 的表达不同程度降低,其中 LDL、ox-LDL 和 ox-HDL 作用较 HDL 明显 (图 1 和表 1, Figure 1 and Table 1)。

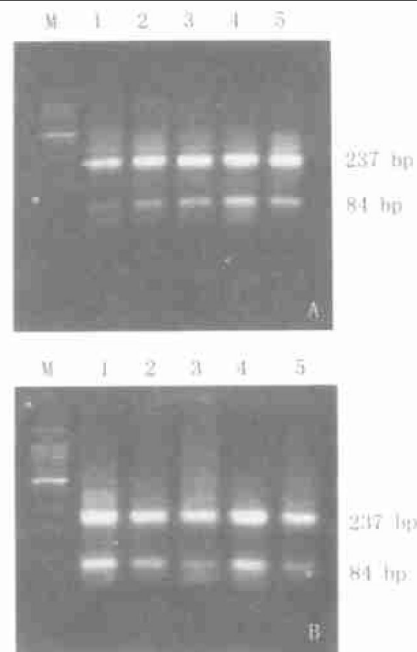


图 1. ABC1 mRNA 的逆转录聚合酶链反应产物电泳结果

A:  $20 \text{ mg/L}$ ; B:  $120 \text{ mg/L}$ ; M: 标准物; 1: 对照组; 2: 低密度脂蛋白; 3: 氧化型低密度脂蛋白; 4: 高密度脂蛋白; 5: 氧化型高密度脂蛋白。

Figure 1. Electrophoresis of RT-PCR products of ABC1 mRNA

表 1. 逆转录聚合酶链反应半定量分析结果

Table 1. Semi quantitative analysis results of RT-PCR

分 组	20 mg/L	120 mg/L
对照组	0.756	0.764
LDL 组	0.824	0.61
ox-LDL 组	0.847	0.619
HDL 组	0.758	0.733
ox-HDL 组	0.809	0.601

### 3 讨论

由 ABC1 基因编码的 ABC1 蛋白是一种重要的胆固醇流出调节蛋白,其主要功能为将细胞内的胆固醇转运到细胞外与 HDL 结合,在胆固醇的逆向转运中起重要作用<sup>[4]</sup>。ABC1 基因突变导致其编码的 CERP 异常,引起胆固醇逆向转运障碍,胆固醇在外周组织细胞聚集,从而可导致血脂异常和动脉粥样硬化等一系列临床病理改变。人的 ABC 基因与小鼠的 ABC 基因以及其他 ABC 相关基因结构相似,含有 33 bp~ 249 bp 的大小不等的外显子 49 个,总长度大于 70 kb。Langmann 等<sup>[2]</sup>于 1999 年报道其用 RT-PCR 方法克隆了人的 ABC1 基因编码区的 cDNA 全序列,全长 6 880 bp,其开放阅读框架共含有 6 603 bp,编码的 ABC1 蛋白共 2 201 个氨基酸,分子量约 220 000,人与鼠 ABC1 蛋白的氨基酸序列的同源性高达 94%,非同源区主要位于 N 末端的 220 个氨基酸。

ABC1 蛋白为进化过程中高度保守的跨膜蛋白,属于 ABC 基因编码的蛋白质家族中的一员,与细胞胆固醇流出调节的关系密切,目前研究较多<sup>[5]</sup>。ABC1 蛋白有 4 个结构域,其中 2 个跨膜结构域,另 2 个结构域伸入胞质,为 ATP 结合结构域,通过与 ATP 结合为跨膜转运提供能量。ABC1 可转运多种配体,包括磷脂、胆固醇、无机离子、氨基酸、多肽、维生素、多种药物、离子螯合物等<sup>[6]</sup>。

近年对 Tangier 病的研究表明,该病系 ABC1 基因突变所致的 ABC1 蛋白表达异常,导致胆固醇逆向转运障碍和血脂代谢异常<sup>[7-10]</sup>,胆固醇在外周组织特别是网状内皮系统大量聚集,亦可大量沉积于血管壁,导致动脉粥样硬化和冠心病的发生。本研究以 THP-1 细胞为研究对象,观察了不同剂量的 LDL、ox-LDL、HDL、ox-HDL 对其 ABC1 mRNA 表达的影响,结果发现小剂量的 LDL、ox-LDL、ox-HDL 均可

不同程度诱导 ABC1 mRNA 表达增加,这可能是由于进入细胞内的胆固醇经激活过氧化体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , PPAR  $\gamma$ ) 等核受体引起 ABC1 mRNA 的转录增加<sup>[2]</sup>,这有利于将进入细胞内的胆固醇转运到细胞外,防止细胞吞噬过多的胆固醇而成为泡沫细胞,从而有利于防止动脉粥样硬化。本研究结果还发现,高剂量的 LDL、ox-LDL、HDL、ox-HDL 对 THP-1 细胞 ABC1 mRNA 表达具有不同程度的抑制作用。文献<sup>[2]</sup>报道 HDL 介导的细胞内胆固醇逆向转运可致 ABC1 表达下调,为细胞内胆固醇负荷量下降的反馈性调节,高剂量的 LDL、ox-LDL、ox-HDL 抑制 ABC1 表达的机制尚不清楚,但这可能是循环中的相应脂质增高引起动脉粥样硬化的原因之一。由此推测,对于高脂血症患者,在降脂治疗的同时,如能诱导细胞的 ABC1 表达增高,将有利于增加胆固醇的逆向转运,防止泡沫细胞形成,从而防治动脉粥样硬化的形成和发展,以补充当前调脂药物对动脉粥样硬化疾病的防治效果。目前国内外均有人在对此进行研究,这无疑将对脂质代谢和动脉硬化的防治研究开辟新的思路和前景,值得进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] Fielding JF, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*, 1995, **36**: 211-228
- [2] Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol-dependent regulation in macrophage. *Biochem Biop Res Commun*, 1999, **257**: 29-33
- [3] 胡厚源, 陈运贞. 氧化型高密度脂蛋白对人单核细胞株 THP-1 细胞迁移及单核细胞趋化蛋白 1 含量的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 132-134
- [4] Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porselr-Ozcurumez M, Liebisch G, et al. ABCG1(ABC8), the human homolog of *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (2): 817-822
- [5] Higgins CF, Callaghan K, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol*, 1997, **8** (3): 135-142
- [6] Linton KJ, Higgins CF. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette(ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 1998, **28**: 5-13
- [7] Marcil M, Brooks WA, Marcil M, Clee SM, Roomp K, Zhang LH, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, 1999, **22**: 336-345
- [8] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 1999, **22**: 347-351
- [9] Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, 1999, **22**: 352-355
- [10] Hobbs HH, Rader DJ. ABC1: Connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL. *J Clin Invest*, 1999, **104** (8): 1 015-017

(此文编辑 文玉珊)