

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0267-04

·实验研究·

β 极低密度脂蛋白经细胞外信号调节激酶 信号途径诱导其受体表达上调

王 燕, 冯友梅, 屈 伸, 吴 凡, 宗义强

(华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 医用生物化学; 动脉粥样硬化; 极低密度脂蛋白受体; β 极低密度脂蛋白; 信号转导; 细胞外信号调节激酶 1/2; 脂质堆积

[摘 要] 为探讨 β 极低密度脂蛋白诱导极低密度脂蛋白受体表达上调的信号转导途径及其对巨噬细胞胞内脂质堆积的影响, 采用 Western Blot 方法检测 β 极低密度脂蛋白温育后巨噬细胞内的细胞外信号调节激酶活性, 在体外培养的巨噬细胞中加入不同信号途径关键酶的抑制剂, 观察各信号途径对受体调控的阻断效应, 测定胞内胆固醇和甘油三酯的含量, 观察泡沫细胞的形成。结果发现, β 极低密度脂蛋白以蛋白激酶 C 依赖的方式激活巨噬细胞中的细胞外信号调节激酶 1/2 活性。细胞外信号调节激酶 1/2 抑制剂和蛋白激酶 C 抑制剂可显著阻断 β 极低密度脂蛋白诱导巨噬细胞极低密度脂蛋白受体转录的效应, 而 P38 抑制剂和蛋白激酶 C 激动剂对 β 极低密度脂蛋白诱导极低密度脂蛋白受体表达上调无明显影响。细胞外信号调节激酶 1/2 抑制剂可抑制 β 极低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞内胆固醇和甘油三酯含量升高。上述结果表明, 蛋白激酶 C 依赖的细胞外信号调节激酶 1/2 信号级联可能是介导 β 极低密度脂蛋白诱导极低密度脂蛋白受体表达上调的主要信号转导途径, 特异地抑制此信号途径可抑制 β 极低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞胞内脂质堆积。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

Very Low Density Lipoprotein Receptor Transcription by β -Very Low Density Lipoprotein is Mediated by the Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway

WANG Yan, FENG You-Mei, QU Shen, WU Fan, and ZONG Yi-Qiang

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Very Low Density Lipoprotein Receptor; β -VLDL; Signal Transduction; Extracellular Signal Regulated Kinase; Lipid Accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the intracellular signaling pathways for β -very low density lipoprotein (VLDL)-induced VLDLR transcription and their effects on lipid accumulation in macrophages. **Methods** Phosphorylated extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) protein was detected with Western blot. mRNA level of VLDL receptor was assayed by RT-PCR.

Results We found that β -VLDL induced an increase in ERK1/2 activity in a protein kinase C (PKC)-dependent manner in murine RAW264.7 macrophages. Studies using different protein kinases inhibitors or activators showed that the effect of β -VLDL-induced VLDL receptor transcription, which was monitored by RT-PCR analysis of VLDL receptor mRNA, was not affected by the inhibitor of P38 kinase and cAMP analog, but extremely abolished by pretreating cells with an inhibitor of ERK and an inhibitor of PKC. Studies on effects of PD98059 (the inhibitor of ERK) on β -VLDL-induced cellular lipid accumulation, which was assessed by cholesterol and triglycerid assay kit showed that ERK inhibitor decreased cellular cholesterol and triglycerid increase exposed to β -VLDL in a dose-dependent manner. **Conclusions** These results demonstrated that the PKC-ERK1/2 cascade was the essential signaling pathway by which β -VLDL activated VLDL receptor mRNA expression and inhibition of the ERK1/2 signaling cascade resulted in suppression of the cellular lipid accumulation induced by β -VLDL in macrophages.

目前认为, 极低密度脂蛋白受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)作为介导细胞摄入富含甘油三酯脂蛋白的主要受体, 在泡沫细胞形成和

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变的发生发展中具有重要的作用^[1]。在兔 As 模型中, As 斑块的 VLDLR mRNA 水平大幅提高, 最高可至正常水平的 100 倍^[2]。我室近期研究发现, β -VLDL 可诱导巨噬细胞中 VLDLR mRNA 的表达, 促进细胞摄取脂蛋白, 导致泡沫细胞的形成^[3]。然而泡沫细胞形成过程中 VLDLR 表达上调的信号转导机制目前尚无研究报道, 本文对此进行了研究。

[收稿日期] 2003-10-29

[修回日期] 2004-04-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970307)资助

[作者简介] 王燕, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, 联系电话为 027-83692624, E-mail 为 shjys@mails.tjmu.edu.cn。
冯友梅, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, 联系电话为 027-83692623, E-mail 为 shjys@mails.tjmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购自上海细胞所。RNAeX Reagent 购自上海华舜生物工程公司。SB203580 购自 Calbiochem 公司。GF109203X 和 8-Br-cAMP 购自 Sigma 公司。抗磷酸化细胞外信号调节激酶 (extra cellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 多克隆抗体及化学发光检测试剂 (ECL) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。PCR 引物由上海生工公司合成。标记有辣根过氧化物酶的羊抗二抗购自广州中山公司。脂质测定试剂盒购自北京中生公司。

1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞培养于含 10% 小牛血清和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基中 (37℃、5% CO₂)。接种 6×10^5 /孔细胞于 6 孔板中, 以无血清培养基培养 24 h, 然后分别加入不同信号途径关键激酶的抑制剂或激动剂处理 1 h, 与 β -VLDL 温育。

1.3 脂蛋白分离

兔 β -VLDL 从高胆固醇饲料饲养的新西兰家兔鲜血中按超速离心法分离^[4]。脂蛋白过滤除菌 (450 μ m 滤孔), 储存于 4℃, 在两周内使用。

1.4 Western Blot

以蛋白裂解液裂解细胞, Lowry 法测蛋白含量。取蛋白样本 (80 μ g/孔) 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转至硝酸纤维素膜上, 加入封闭液 4℃ 封闭过夜。TBST 洗膜后再加入抗磷酸化 ERK1/2 多克隆抗体 (滴度为 1:200) 与膜温育 4 h, TBST 洗膜后, 与标有辣根过氧化物酶的二抗温育 1 h (滴度为 1:10 000), TBST 洗膜后, 采用辣根过氧化物酶化学发光检测试剂 (ECL) 检测化学发光强度。采用 Kodak digital science 图形扫描分析软件对蛋白条带进行灰度扫描, 以积分吸光度 (峰面积) 代表蛋白条带的信号强弱, 以此对目的蛋白表达水平进行半定量比较。

1.5 逆转录—聚合酶链反应

据 RNA eX Reagent 操作指南提取细胞总 RNA。经反转录后进行 PCR 扩增。PCR 引物参见文献 [3]。VLDLR 反应条件为: 95℃ 3 min → 95℃ 30 s → 62℃ 30 s → 72℃ 45 s, 32 个循环; 然后 72℃ 10 min。GAPDH 反应条件为: 95℃ 3 min → 95℃ 30 s → 62℃ 30 s → 72℃ 45 s, 28 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, UV 照相, GIS 凝胶电泳分析系统扫描分析, 以 GAPDH (520 bp) 为内参照 VLDLR (320 bp) 的表达产物进行定量。

1.6 脂质的抽提及测定

细胞温育结束后, 以 0.5 mL 孔加入 0.1 mol/L NaOH 裂解细胞。留取 20 μ L 样本用 Lowry 法进行蛋白定量。取 400 μ L 细胞裂解液于玻璃试管中, 加入 4 倍体积脂质抽取液 (氯仿: 甲醇 = 2:1), 剧烈振荡混匀 1 min, 3 kr/min 离心 20 min, 吸取下层有机相。洗涤液 (氯仿: 甲醇: H₂O = 15:235:240) 漂洗 1~2 次, 3 kr/min 离心 20 min, 将有机相转入干净玻璃试管中, 80℃ 水浴 4 h 蒸干。按照脂质测定试剂盒说明分别测定管中甘油三酯 (triglyceride, TG) 或总胆固醇 (total cholesterol, TC) 的含量。

1.7 统计学方法

两组间的比较用 *t* 检验。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 方式表示。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 β 极低密度脂蛋白对细胞外信号调节激酶 1/2 活性的影响

β -VLDL 可刺激 RAW264.7 细胞中 ERK1/2 活性, 并具有浓度和时间相关性。 β -VLDL 在浓度为 25 mg/L 时, 刺激细胞 5 min 即可明显增加 RAW264.7 细胞中磷酸化 ERK1/2 的含量, 并随浓度的增加效应增强, 10 min 时 RAW264.7 细胞中 ERK1 活性最高, 15 min 时 ERK2 活性达到高峰 (图 1, Figure 1)。

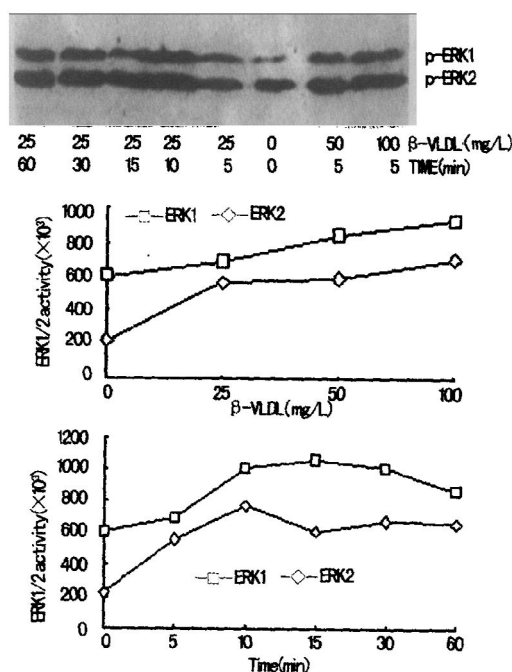


图 1. β 极低密度脂蛋白诱导 RAW264.7 细胞内细胞外信号调节激酶 1/2 活性升高 A-蛋白电泳结果; B、C-A 图的扫描分析结果

Figure 1. β -VLDL activates ERK1/2 in RAW264.7 cells

2.2 蛋白激酶 C 对 β 极低密度脂蛋白诱导 RAW264.7 细胞中细胞外信号调节激酶 1/2 活性形式的影响

以不同浓度的 GF109203X(蛋白激酶 C 抑制剂)温育细胞 1 h, 然后与 β -VLDL 温育 10 min, 检测 RAW264.7 细胞中 ERK1/2 活性。结果表明: GF109203X 可抑制 β -VLDL 诱导的 ERK1/2 活性升高, 并随其浓度的增加而效应增强(图 2, Figure 2)。说明 β -VLDL 诱导的 ERK1/2 活性是呈 PKC 依赖性的。以 ERK1/2 抑制剂 PD98059 刺激细胞 1 h, 进行脂蛋白温育实验, 结果发现, PD 98059 可明显抑制 β -VLDL 诱导的 ERK1/2 活性, 说明 PD98059 作为 ERK1/2 抑制剂的有效性。

β -VLDL(100mg/L)	-	+	+	+	+	+
GF109203X(μ mol/L)	-	-	-	1	5	10
PD98059(20 μ mol/L)	-	-	+	-	-	-

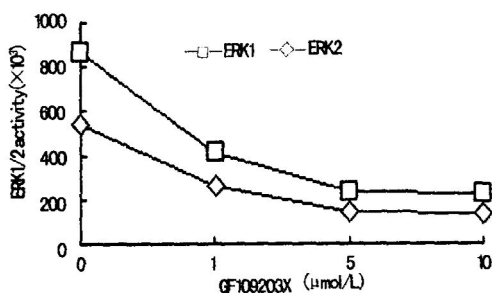
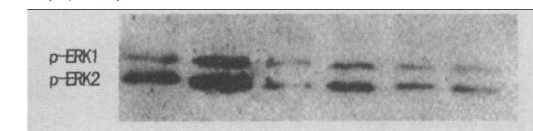


图 2. 蛋白激酶 C 介导 β 极低密度脂蛋白诱导细胞内细胞外信号调节激酶 1/2 活性升高

Figure 2. Protein kinase C mediates β -VLDL induced ER

2.3 蛋白激酶 C、MAPK 和 PKA 信号转导途径在 β 极低密度脂蛋白诱导极密度脂蛋白受体表达上调中的作用

采用不同信号途径关键激酶的抑制剂或激动剂处理 RAW264.7 细胞 1 h, 与 β -VLDL 温育 24 h 后以半定量 RT-PCR 的方法检测细胞内 VLDLR mRNA 水平, 图 3A(Figure 3A)代表了 4 次独立的实验结果。VLDLR mRNA 以 GAPDH mRNA 标化后, 结果如图 3B(Figure 3B)所示, GF109203X 和 PD98059 分别使 β -VLDL 诱导 VLDLR mRNA 水平下降了约 30% 和 35%, 与未诱导的细胞 VLDLR mRNA 水平接近。8-Br-cAMP 在其效应浓度(0.2 ~ 1.2 mmol/L), SB203580 在其效应浓度(10 ~ 30 μ mol/L)对 VLDLR mRNA

表达调节无明显影响(文中仅显示高浓度组数据)。

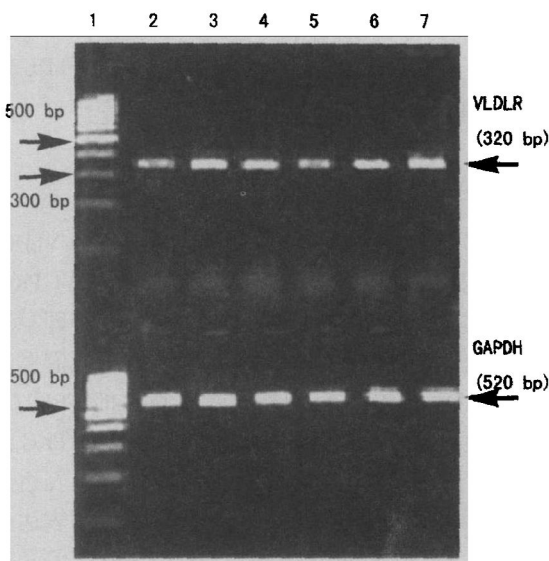


图 3. 蛋白激酶 C、MAPK 和 PKA 信号转导途径在 β 极低密度脂蛋白诱导极密度脂蛋白受体表达上调中的作用

泳道 1 为 DNA Marker, 2 为 Control cell, 3 为 β -VLDL(100 mg/L), 4 为 β -VLDL + PD98059(20 μ mol/L), 5 为 β -VLDL + GF109203X(1 μ mol/L), 6 为 β -VLDL + SB203580(30 μ mol/L), 7 为 β -VLDL + 8-Br-cAMP(1.2 mmol/L)。

Figure 3. Effects of PD98059, GF109203X, SB203580, 8-Br-cAMP on β -VLDL induction of VLDLR mRNA expression

表 1. 脂蛋白及细胞外信号调节激酶 1/2 的抑制剂温育后 RAW264.7 细胞中脂质含量($\bar{x} \pm s$, mg/g)

Table 1. Accumulation of total cholesterol RAW264.7 exposed to lipoproteins and PD98059

分 组	胆固醇	甘油三酯
对照组	16.62 \pm 0.08	21.07 \pm 2.95
β -VLDL(100 mg/L)	51.23 \pm 3.80 ^c	45.72 \pm 2.61 ^c
β -VLDL + PD98059(10 μ mol/L)	37.66 \pm 2.23 ^a	38.49 \pm 1.58 ^a
β -VLDL + PD98059(40 μ mol/L)	31.29 \pm 2.60 ^b	29.13 \pm 3.49 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with β -VLDL group, c: $P < 0.01$, compared with control group.

2.4 细胞外信号调节激酶 1/2 抑制剂对 RAW264.7 细胞内脂质堆积的影响

以不同浓度的 PD98059(ERK1/2 抑制剂)预处理 RAW264.7 细胞 1 h, 然后与 β -VLDL 温育 24 h, 检测细胞内甘油三酯和胆固醇的含量。由表 1(Table 1)可见, PD98059 在低浓度时, 可使 β -VLDL 温育的 RAW264.7 细胞内甘油三酯含量降低 29.3%, 胆固醇

醇含量降低 39.2%。高浓度的 PD98059 可使 β -VLDL 温育的 RAW264.7 细胞内甘油三酯含量降低 67.3%, 胆固醇含量降低 57.6%。以上实验结果表明: 特异性抑制 ERK1/2 信号途径可降低 β -VLDL 诱导的 RAW264.7 细胞内脂质堆积程度。

3 讨论

在平滑肌细胞增殖的研究中发现, β -VLDL、VLDL 及其组分或降解产物可激活胞内的 PKC-ERK1/2 信号途径, 诱导胞内 c-fos 和 c-myc 等即早基因的表达, 继而诱导平滑肌细胞增殖^[5,6]。我们发现 β -VLDL 可以 PKC 依赖的方式激活胞内的 ERK1/2。应用特异性抑制剂分别阻断胞内 ERK1/2 及 PKC 活性, 可几乎完全抑制 β -VLDL 诱导的 VLDLR 表达上调。结果提示, VLDL、 β -VLDL 诱导的 VLDLR 表达上调可能主要是由其激活的胞内 PKC-ERK1/2 信号途径介导。利用特异性抑制剂阻断 ERK1/2 信号途径, 发现 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 可降低 β -VLDL 温育后的巨噬细胞内胆固醇和甘油三酯的含量。提示 VLDLR 受 β -VLDL 诱导表达上调, 进而大量摄取富含载脂蛋白 E 的脂蛋白, 从而导致胞内脂质堆积、泡沫细胞形成。

在 VLDLR 基因的 5' 端转录调控序列中, 存在两个重要的顺式作用元件: 反向 CCAAT 盒和位点 D, 它们可分别结合核转录因子 NF-Y 和 CEBP/ β , 在 JEG-3 和 BeWo 细胞中这两个转录因子调控 VLDLR 的表达^[7], 而且 NF-Y 和 CEBP/ β 均可被 ERK1/2 磷酸化激活^[9]。因此推测, PKC-ERK1/2 信号途径介导的 VLDLR 表达上调将主要作用于转录水平, 通过转录激活的方式调节 VLDLR 的表达, 本实验结果证实了这一推测。然而转录激活作用是否也是通过活化 NF-Y 和 CEBP/ β , 则有待进一步研究证实。

p38 也参与调控脂蛋白受体的表达, Hsien-Yeh 等研究发现, p38 介导 TNF 诱导的巨噬细胞清道夫受体表达下调^[9]。本实验结果表明 p38 信号途径对 RAW264.7 细胞中 VLDLR 上调无明显影响。另据报道: JEG-3 细胞中, cAMP 的类似物 8-Br-cAMP 可显著下调 VLDLR mRNA 的表达^[10], 而 cAMP 对某些细胞胞内 ERK1/2 活性也有影响^[11,12]。本实验中 PKA 途径激动剂对细胞 VLDLR mRNA 水平无明显影响。

综上所述, 本实验通过体外实验证实了 VLDLR 可以受 β -VLDL 诱导而表达上调, 信号转导途径阻断

实验表明 PKC-ERK1/2 信号转导途径在 VLDLR 上调过程中具有重要作用。我们的研究首次发现 ERK1/2 途径也参与 VLDLR 的表达调控, 并影响巨噬细胞内脂质堆积。近年来, 采用 MAPK 信号途径抑制剂治疗疾病已成为药物研发领域的热点, 有些抑制剂已进入临床试验阶段, 本研究可望为动脉粥样硬化的防治, 尤其是新药研制方面提供理论基础和新的分子靶点。

[参考文献]

- [1] Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T, Yla-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation*, 1998, 97 (11): 1 079-086
- [2] Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, Kanehara H, Sakai J, Tohda G, et al. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor: interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages. *Circulation*, 2001, 103 (8): 1 142-147
- [3] 田俊, 屈伸, 王燕, 等. 极低密度脂蛋白受体在泡沫细胞形成中的作用地位的探讨. *中国动脉硬化杂志*, (待发表)
- [4] 王淳本, 宗义强, 吴万生, 冯友梅, 邓耀祖, 冯宗忱. 两步超速离心法快速分离大量血浆极低密度脂蛋白及低密度脂蛋白. *同济医科大学学报*, 1995, 24 (3): 169-171
- [5] Zhao D, Letteman J, Schreiber BM. beta-Migrating very low density lipoprotein (beta VLDL) activates smooth muscle cell mitogen-activated protein (MAP) kinase via G protein-coupled receptor-mediated transactivation of the epidermal growth factor (EGF) receptor: effect of MAP kinase activation on beta VLDL plus EGF-induced cell proliferation. *J Biol Chem*, 2001, 276 (33): 30 579-588
- [6] Sachinidis A, Kettenhofen R, Seewald S, Gouni-Berthold I, Schmitz U, Seul C, Ko Y, Vetter H. Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (10): 2 412-421
- [7] Kreuter R, Soutar AK, Wade DP. Transcription factors CCAAT/enhancer-binding protein beta and nuclear factor-Y bind to discrete regulatory elements in the very low density lipoprotein receptor promoter. *J Lipid Res*, 1999, 40 (3): 376-386
- [8] Marziani G, Perrotti E, Ilari R, Coccia EM, Mantovani R, Testa U, Battistini A. The activity of the CCAAT-box binding factor NF-Y is modulated through the regulated expression of its A subunit during monocyte to macrophage differentiation: regulation of tissue-specific genes through a ubiquitous transcription factor. *Blood*, 1999, 93 (2): 519-526
- [9] Hsien-Yeh H, Yuh-ching T. Tumor necrosis factor- α -mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. *J Biol Chem*, 2000, 275 (52): 41 035-048
- [10] Wittmaack FM, Gafvel ME. Location and Regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-e receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport. *Endocrinology*, 1995, 136 (1): 340-348
- [11] Hafner S, Adler HS, Mischak H, Janosch P, Heidecker G, Wolfman A, et al. Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol*, 1994, 14 (10): 6 696-703
- [12] Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJ. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275 (5): 3 722-728

(此文编辑 朱爱霞)