

## 蛋白激酶 C 抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞 清道夫受体功能的影响

周春蕾<sup>1</sup>, 陈琪<sup>2</sup>, 金艳<sup>2</sup>, 陈秀英<sup>2</sup>, 王南<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军第 454 医院心内科, 江苏省南京市 210002;

2. 南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 蛋白激酶 C 抑制剂对清道夫受体功能的影响; 蛋白质印迹试验; 清道夫受体; 巨噬细胞; 蛋白激酶 C 抑制剂; 氧化型低密度脂蛋白

[摘要] 目的 观察细胞内蛋白磷酸化水平对清道夫受体功能的影响。方法 用蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素处理小鼠腹腔巨噬细胞, 利用蛋白质印迹试验和放射自显影方法观察药物对细胞表面受体表达的影响, 并分别测定对照组和处理组细胞对碘标记的氧化型低密度脂蛋白的结合、降解以及细胞内脂质蓄积的程度。结果 0.4 μmol/L 蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素可以促进细胞结合碘标记的氧化型低密度脂蛋白, 增加细胞表面受体的表达, 但抑制细胞降解碘标记的氧化型低密度脂蛋白, 同时抑制细胞内胆固醇酯的蓄积。结论 以上表明清道夫受体功能与细胞内蛋白质磷酸化水平密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Protein Kinase C Inhibitor on Scavenger Receptor in Mouse Peritoneal Macrophage

ZHOU Chun-Lei<sup>1</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>, JIN Yan<sup>2</sup>, CHEN Xi-Ying<sup>2</sup>, and WANG Nan<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology in NO 454th Hospital of PLA, Nanjing 210002; 2. Atherosclerosis Research Center of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Scavenger Receptor; Protein Kinase C Inhibitor; Mouse Peritoneal Macrophages; Oxidized Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study effects of cell protein phosphorylation on scavenger receptor. **Methods** Mouse peritoneal macrophages (MPM) were treated with protein kinase C (PKC) inhibitor staurosporine, and then the cell were incubated with <sup>125</sup>I (oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) or ox-LDL. The effects of the drug on expression of cell surface receptor were observed by means of autoradiography. Moreover, the cellular binding of <sup>125</sup>I ox-LDL, its degradation and the accumulation of lipids within cell were measured separately. **Results** Staurosporine(0.4 μmol/L) could enhance MPM to bind lipids and stimulate scavenger receptor expression, and could reduce degradation of lipids by MPM and the accumulation of cholesterol within the cell. **Conclusion** The function of scavenger receptors may be correlated with cell protein phosphorylation.

清道夫受体(scavenger receptor, SR)是一类主要位于巨噬细胞表面的糖蛋白,至少存在 5 种不同类型共计 13 个亚型<sup>[1]</sup>。在脂蛋白的刺激下,血管中膜平滑肌细胞和血液单核细胞增殖、游移,血管内皮细胞增殖,细胞膜上的 A 类清道夫受体(SR-A)与氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)结合,使细胞转变成泡沫细胞,因而与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的关系极为密切。SR-A

是一种调理性非依赖性的受体,可能参与细胞内信号转导过程以及细胞功能的调控,其分子机制尚不清楚<sup>[2,3]</sup>。SR-A 遵循受体再循环机制,但尚不能肯定 SR-A 胞浆区中有内移信号序列的存在。然而一级结构表明,其胞质域中含有数个可被磷酸化的位点<sup>[4]</sup>,提示 SR-A 可能发生蛋白质磷酸化,并推测受体功能可能与细胞内蛋白质磷酸化有关<sup>[5]</sup>。蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)是一种磷脂依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶,具有多种功能,PKC 介导细胞生长和增殖的信息传递,通过降低 PKC 活性有望抑制过度增殖的细胞生长。本研究用蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素(staurosporine, STA)处理小鼠腹腔巨噬细胞(mouse peritoneal macrophages, MPM)后,观察 SR-A 功能特性的改变。

[收稿日期] 2004-10-11 [修回日期] 2004-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30370576)

[作者简介] 通讯作者周春蕾,硕士研究生,主治医师,研究方向为动脉粥样硬化,联系电话为 13057667090, E-mail 为 zhouchunlei1970@163.com。陈琪,奥地利格拉茨大学生物化学专业毕业,博士研究生,教授,博士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化机理的研究, E-mail 为 qchen@njmu.edu.cn。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

丙烯酰胺、双丙烯酰胺和苯甲基磺酰氟(PMSF)为Merck公司产品;四甲基乙二胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、辛基葡萄糖苷和高分子量标准蛋白质为Sigma公司产品;蛋白激酶C抑制剂、胆固醇标准、胆固醇氧化酶、辣根过氧化物酶(HRP)和亮抑酶肽(leupeptin)为Serva公司产品;Na<sup>125</sup>I为北京杜邦公司进口分装;细胞培养基DMEM则为Gibco公司产品;其余试剂均为国产分析纯;昆明种小鼠源自江苏省实验动物中心;细胞培养板为Nunc产品。

### 1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的分离和培养

取25g左右雌性昆明种小鼠500只,颈椎离断处死浸泡于75%乙醇中20s后,仰面固定于鼠板,逐层剪开皮肤及腹膜,腹腔内注射少量DMEM培养基,轻揉腹壁数次,用吸管吸出腹腔内液体装于离心管中,800 r/min、离心10 min倾去上清,将细胞重悬于含12%小牛血清的DMEM培养基中,种于培养瓶中,37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度下培养4~5 h后,换液1次以去除不贴壁细胞,培养过夜,待细胞伸展率达75%以上时,加入STA分组培养。对照组加入不含STA的DMEM培养基(含12%无脂血清LPDS),实验组加入含0.4 μmol/L STA(用二甲基亚砷DMSO溶解)的DMEM培养基(含12% LPDS),37℃ 1 h后,PBS液洗3次,分组收集细胞,制备细胞膜蛋白。测定细胞内脂质时,细胞用含2.5 g/L LPDS的DMEM培养,冲洗所用的PBS不含EDTA。

### 1.3 低密度脂蛋白的制备、修饰、标记与鉴定

按文献[6]方法进行。常规分离新鲜健康人空腹血清,超速离心分离LDL( $\rho = 1.019 \sim 1.063$  kg/L)。LDL的氧化修饰采用Cu<sup>2+</sup>介导法,<sup>125</sup>I标记LDL参照McFarlane改良法进行,<sup>125</sup>I标记脂蛋白的比放射性在200~700 cpm/ng之间,游离碘率不超过3%。<sup>125</sup>I-LDL的氧化修饰同未标记LDL。修饰的LDL经0.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,以天然LDL相对电泳迁移率为1计算,分别测得ox-LDL和<sup>125</sup>I-ox-LDL为2.85。

### 1.4 膜蛋白的制备

按文献[6]方法进行。收集MPM,用A液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, pH 7.5)清洗,重悬于含有蛋白酶抑制剂的A液(含1 mmol/L PMSF, 0.4 μmol/L leupeptin)。用超声波破碎细胞膜,2 000 r/min离心10 min去除未溶细胞。用上清液进行超速离心,38 000 r/min离心2 h,

取沉淀再溶于含蛋白酶抑制剂的A液中,加入40 mmol/L辛基葡萄糖苷,冰水浴搅拌1 h,离心除去未溶物质,得上清即为粗制膜蛋白。膜蛋白立即分装,置-70℃保存并测定蛋白含量。上述膜蛋白的分离制备均在4℃下进行。

### 1.5 蛋白质印迹试验和放射自显影

按文献[6]方法进行。将粗制膜蛋白加到3%~15%的SDS-聚丙烯酰胺梯度凝胶板(SDS-PAGE)上,电泳200 V 60 mA 50 min,将凝胶放入转移缓冲液中浸泡1 h,将凝胶上蛋白质4℃下按100 V 250 mA 1.5 h转移至硝酸纤维素膜上,进一步作配基印迹检测,即先用50 g/L脱脂奶粉封闭,然后与20 mg/L的<sup>125</sup>I-ox-LDL孵育,接着晾干硝酸纤维素膜,暗室里常温下压片7~10天后冲洗,结果用凝胶分析扫描系统分析。

### 1.6 小鼠腹腔巨噬细胞降解脂蛋白的实验

参照Goldstein等改良法,即待测细胞培养基中加入20 mg/L<sup>125</sup>I-ox-LDL,置37℃孵育4 h,置冰浴终止反应,吸出全部培养基于离心管中,加少量牛血清白蛋白和50%三氯乙酸,离心10 min,吸上清加入40% KI-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,加氯仿充分混合,静置分相,吸出水相测放射性,其结果为细胞对<sup>125</sup>I-ox-LDL的总降解量。细胞对<sup>125</sup>I-ox-LDL的非特异性降解采用同时加入30倍未标记ox-LDL的方法测定,两者之差即为特异性降解值。

### 1.7 细胞内微量胆固醇酯的测定

细胞用0.4 μmol/L STA孵育72 h后,与50 mg/L的ox-LDL孵育48 h,倾去培养基后用冰PBS洗3次,收集洗液离心,用氯仿-甲醇抽提细胞内脂质,用酶-荧光法测定总胆固醇和游离胆固醇,胆固醇酯为两者之差。细胞蛋白质用Lowry法测定。

### 1.8 药物毒性检测

采用MTT法检测。MPM接种于96孔板,贴壁后加入待测药物孵育1 h,再加入5 g/L的MTT 10 μL,混匀,继续培养4 h,加入0.04 mol/L HCl-异丙醇溶液,充分溶解MTT和细胞作用而生成的蓝色结晶,静置几分钟后,分别用570 nm实验波长和630 nm参考波长在酶标仪上读出每孔光吸收值。细胞毒性的计算公式为T% = (1 - 实验组A值/对照组A值) × 100%,A值表示光吸收值,其值越大表明细胞活力越强。用细胞培养基作为阴性对照组。

### 1.9 统计学处理

为多样本均数比较的t检验,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,图表中数据为2管均值。

## 2 结果

### 2.1 星形孢菌素对小鼠腹腔巨噬细胞的毒性作用

0.4 μmol/L STA 组细胞毒性为 -16.68% ± 5.86% (n = 8), 0.01% DMSO 组细胞毒性为 -12.02% ± 3.09% (n = 8), 表明实验浓度 STA 和 DMSO 对细胞无明显毒性作用。

### 2.2 星形孢菌素对小鼠腹腔巨噬细胞 A 类清道夫受体结合氧化型低密度脂蛋白的影响

图 1 (Figure 1) 显示, MPM 膜蛋白在分子量约 237 kDa 处染色较深, 显然为 SR-A 蛋白条带<sup>[6]</sup>。放射自显影 (图 2, Figure 2) 显示, STA 处理后 237 kDa 的条带较对照组明显加深, 提示 STA 可以促进细胞表面 SR-A 摄取<sup>125</sup>I-ox-LDL。

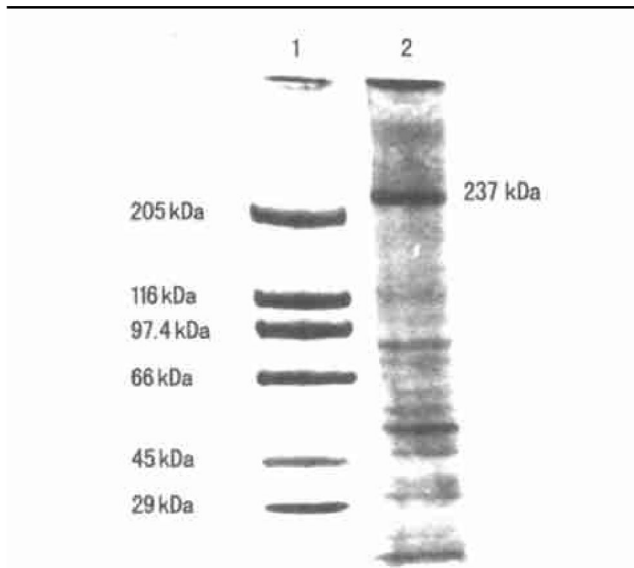


图 1. 蛋白质印迹试验后凝胶染色结果 1 为高分子量蛋白标准, 2 为 MPM 膜蛋白。

Figure 1. Gel dyeing after SDS-PAGE

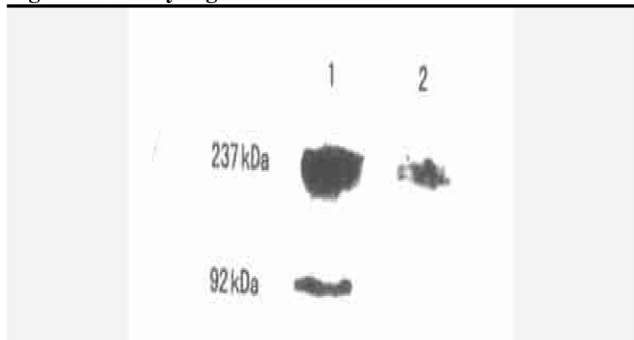


图 2. 星形孢菌素组和对照组放射自显影结果 1 为 STA 组, 2 为对照组。

Figure 2. Autoradiography of STA and control group

### 2.3 星形孢菌素对小鼠腹腔巨噬细胞 A 类清道夫受体结合脂蛋白的影响

图 3 (Figure 3) 显示对照组和 STA 组均为一条趋

向饱和的浓度曲线。经线性回归处理 Scatchard 作图得到 2 条平行直线, 对照组 B<sub>max</sub> 为 298 μg/g 细胞蛋白, K<sub>d</sub> 值为 14.1 mg/L, r = -0.99, STA 处理细胞后, B<sub>max</sub> 增加为 406.8 μg/g 细胞蛋白, 与对照组比较差异有显著性。STA 组 K<sub>d</sub> 值为 11.1 mg/L, r = -0.96, 与对照组比较差异无显著性。表明 STA 对 SR-A 与<sup>125</sup>I-ox-LDL 的亲和力影响不大, 主要通过增加 MPM 表面受体数目而促进对 ox-LDL 的摄取。

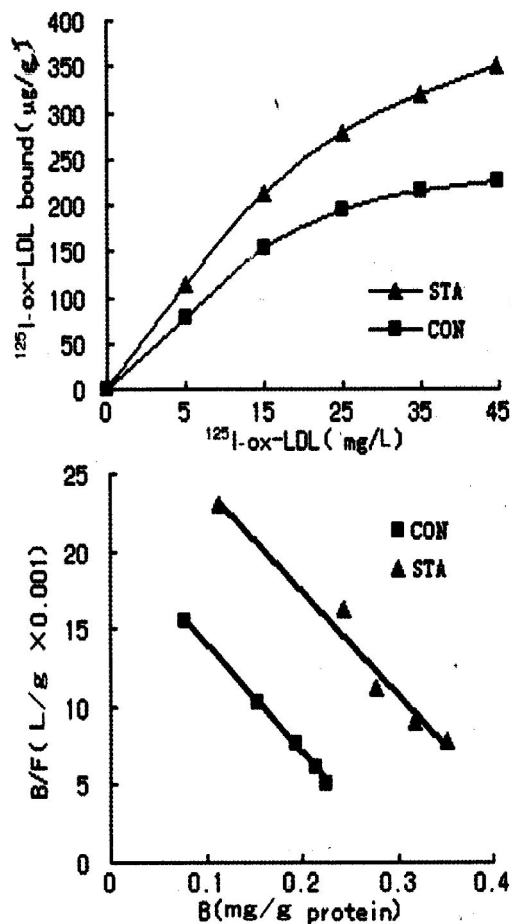


图 3. 星形孢菌素对 A 类清道夫受体结合脂蛋白的浓度曲线和 Scatchard 作图

Figure 3. Effect of STA on the binding of <sup>125</sup>I-ox-LDL and Scatchard plot

### 2.4 星形孢菌素对小鼠腹腔巨噬细胞 A 类清道夫受体降解脂蛋白的影响

0.1 μmol/L、0.2 μmol/L 和 0.4 μmol/L STA 与 MPM 孵育后, 细胞降解<sup>125</sup>I-ox-LDL 值依次为 5.48 ± 0.22 mg/g、3.39 ± 0.18 mg/g 和 2.62 ± 0.15 mg/g, 而对照组降解值为 8.18 ± 0.21 mg/g。表明随药物浓度加大, 细胞降解的抑制率也逐渐加大。

## 2.5 星形孢菌素对氧化型低密度脂蛋白所致小鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇酯积聚的影响

表 1(Table 1) 表明, STA 作用于细胞后, 细胞内总胆固醇和胆固醇酯明显低于对照组, 其中胆固醇酯差异有显著性( $P < 0.01$ )。说明 STA 主要抑制细胞内胆固醇酯的蓄积。

表 1. 星形孢菌素对小鼠腹腔巨噬细胞内胆固醇酯积聚的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Effect of STA on the cholesterol accumulation in MPM

| 分 组   | 总胆固醇<br>(mg/g) | 游离胆固醇<br>(mg/g) | 胆固醇酯<br>(mg/g)          |
|-------|----------------|-----------------|-------------------------|
| 对照组   | 62.8 ± 0.3     | 40.7 ± 0.5      | 22.1 ± 0.4              |
| STA 组 | 49.9 ± 4.1     | 39.6 ± 5.2      | 10.3 ± 3.5 <sup>a</sup> |

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

## 3 讨论

近年来 As 发病机制研究中的一个焦点是 ox-LDL 的作用, 其中重要作用之一就是 SR 被巨噬细胞摄取, 使后者转变为泡沫细胞。SR 是一种分子量为 220 kDa 的三聚体, 是在巨噬细胞上表达的介导乙酰化 LDL (ac-LDL) 摄取的受体, 除结合 ac-LDL 外, 它可高效地结合 ox-LDL<sup>[7]</sup>。本实验在 MPM 膜蛋白中经放射自显影出现一条高度结合 ox-LDL 的 237 kDa 蛋白条带, 在文献[6]中已充分论证为 SR-A 蛋白条带。

蛋白激酶 C 是细胞生长信号转导过程中的一个主要成分, 激活的 PKC 可使多种蛋白的丝氨酸/苏氨酸发生磷酸化, 从而影响细胞内生物信息的代谢。STA 是一种由微生物中提出的生物碱, 是最强的蛋白激酶 C 抑制剂, 通过抑制 PKC 的催化结构域而起作用。用 STA 预处理 MPM, 取其膜蛋白经放射配体印迹实验结果显示, STA 可以显著促进 MPM 表面 SR-A 摄取<sup>125</sup>I-ox-LDL。进一步实验发现细胞表面 SR-A 结合<sup>125</sup>I-ox-LDL 呈一条饱和的浓度曲线, Scatchard 分析表明: 这种结合值的增多主要源于细胞表面受体数目的增多, 而非受体结合配基亲和力的增加。然而测定细胞对<sup>125</sup>I-ox-LDL 的降解结果显示, STA 的处理使细胞降解值明显减少, 这种减少并非由于细胞活力的减弱, 因为 STA 组与对照组的

MIT 生成没有明显改变。与细胞降解值相一致, STA 组细胞内脂蛋白蓄积低于对照组, 而且其中以胆固醇酯最为明显。

细胞内蛋白磷酸化的抑制能促进 SR-A 的表达, 其确切机制尚不清楚。SR-A 与其他细胞膜内移受体一样遵循受体再循环机制。细胞内蛋白磷酸化的抑制是否可加速受体再循环, 抑或可引起受体的重分布, 使之在胞膜表面的分布增加, 从而导致结合配基增多, 这值得进一步研究。STA 处理细胞后, 细胞内降解 ox-LDL 及胆固醇酯蓄积明显减少, 推测可能受体与 ox-LDL 结合后, 受体-配基复合物内移进入胞质、被溶酶体降解等途径速率减慢。因为我们在 U937 细胞上发现 STA 处理后, 受体-配基复合物内移明显减慢这一事实<sup>[8]</sup>。已知 SR-A 的胞质部分含有 3 个 Ser/Thr 磷酸化位点, 是否 PKC 抑制可改变其磷酸化, 进而影响受体内移速度、使 ox-LDL 降解和胆固醇酯蓄积减少, 值得进一步探索与研究。

通过抑制 PKC 活性, MPM 上 SR-A 表达增多, 但细胞内胆固醇的降解、蓄积减少, 表明 SR 功能与细胞内蛋白质磷酸化水平密切相关, 对其进一步的探索将为防止泡沫细胞形成及 As 的发生发展开辟新途径。

## [参考文献]

- [1] David R. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defense. *Curr Opin Lipid*, 1998, **9**: 425-432
- [2] Napolitano M, Bravo E. Activation of protein kinase C by phorbol esters in human macrophages reduces the metabolism of modified LDL by down-regulation of scavenger receptor activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, **35** (7): 1127-143
- [3] Santiago-Garcia J, Kodama T, Pitas RE. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 2003, **278** (9): 6942-946
- [4] Hans PD, Ralf C. Stimulation of mitogen activated protein kinase by LDL and ox-LDL in human U937 macrophage-like cell. *FEBS Letter*, 1996, **385**: 149-154
- [5] Collier SP, Paulnock DM. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. *J Leukoc Biol*, 2001, **70** (1): 142-148
- [6] 周春蕾, 陈琪, 魏恩会, 陈秀英, 王南, 范乐明. 巨噬细胞新型氧化低密度脂蛋白结合蛋白的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (4): 362-366
- [7] Linton MF, Fazio S. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2001, **12** (5): 489-495
- [8] 金艳, 陈琪, 王南, 陈秀英, 魏恩会, 周春蕾, 等. 蛋白激酶 C 抑制剂对 U937 细胞清道夫受体功能的影响. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (4): 395-399

(此文编辑 朱雯霞)