

胆固醇诱导未折叠蛋白反应及其调节酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 基因的表达

王 琼, 刘志国, 田 俊, 宗义强, 屈 伸

(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] 分子生物学; 胆固醇; 未折叠蛋白反应; 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2; X 盒结合蛋白 1; 氧化胆固醇

[摘 要] 目的 探讨胆固醇对肝细胞和小肠粘膜上皮细胞中未折叠蛋白反应及其调节酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 基因表达的影响。方法 以不同浓度(10 mg/L 和 20 mg/L)的游离胆固醇和氧化胆固醇温育肝癌细胞系 HepG2 细胞和小肠粘膜上皮细胞系 Caco2 细胞, 应用半定量逆转录聚合酶链反应法检测两种细胞中 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 的表达水平。结果 随着游离胆固醇和氧化胆固醇浓度的升高, HepG2 细胞和 Caco2 细胞中的 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 表达均上调, 呈现浓度依赖性。结论 胆固醇和氧化胆固醇均可诱导未折叠蛋白反应中标记分子 X 盒结合蛋白 1 的表达, 并上调酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 的表达, 提示酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 的表达可能受未折叠蛋白反应的调控; 鉴于酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 在胆固醇吸收的酯化过程中具有重要作用, 未折叠蛋白反应可能在胆固醇吸收调控中具有重要意义。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Study on Cholesterol Induced Unfolded Protein Response and Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase-2 Expression

WANG Qiong, LIU Zhi-Guo, TIAN Jun, ZONG Yi-Qiang, and QU Shen

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

[KEY WORDS] Cholesterol; Unfolded Protein Response; Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase-2; X-Box Binding Protein 1; Oxidative Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulation of X-box binding protein 1 (XBP-1) and acyl-CoA cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) expression by cholesterol in hepatic cell and enterocyte. **Methods** HepG2 cell and Caco2 cell were incubated with different concentration of free cholesterol and oxidative cholesterol. The mRNA level of XBP-1 and ACAT-2 in cells were detected by semi-quantitative RT-PCR. **Results** In cells incubated with free cholesterol and oxidative cholesterol, XBP-1 and ACAT-2 mRNA levels in HepG2 cell and Caco2 cell were up-regulated, and were dependent on the concentration increase. **Conclusions** Both of cholesterol and oxidative cholesterol can induce UPR, and ACAT-2 mRNA level can be up-regulated, the results imply the possibility that ACAT-2 may be regulated by UPR; in view of ACAT-2 playing an important role in the cholesterol esterification and absorption, UPR may have important significance in cholesterol absorption.

胆固醇是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要危险因素^[1]。研究显示高胆固醇所致的 As 斑块形成与胆固醇诱导未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)及其导致的细胞凋亡关系密切^[2,3]。在哺乳动物细胞中,三个位于内质网的跨膜蛋白转录激活因子 6(activating transcription factor-6, ATF-6)、肌醇依赖蛋白 1(inositol requiring-1, IRE-1)

和胰腺内质网激酶(PER-like ER kinase, PERK)通过不同的信号途径诱导 UPR。当细胞感受到内质网应激后,可使 ATF-6 的活性部分从胞浆转移到核内,上调其下游基因 X 盒结合蛋白 1(X-box binding protein-1, XBP-1)的转录^[4,5]; XBP-1 mRNA 可被激活的 IRE-1 的核糖核酸内切酶选择性剪切,成为具有强活性的转录因子,调节下游多种基因,因此 XBP-1 被认为是 UPR 的一种标志性基因^[6]。酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2(acyl-CoA cholesterol acyltransferase-2, ACAT-2)的启动子中存在多个能被 XBP-1 识别结合的顺式元件,它们在特定的细胞中可能受到 XBP-1 的调节。ACAT-2 主要分布于小肠粘膜上皮细胞和肝细胞中,在胆固醇的消化吸收及肝细胞内的代

[收稿日期] 2006-11-07 [修回日期] 2007-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30300134)

[作者简介] 王琼,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 wangqiong_john@yahoo.com.cn。刘志国,博士后,教授,主要从事动脉粥样硬化发病的分子机制研究。通讯作者屈伸,教授,博士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化发病的研究, E-mail 为 qushen@mails.tjmu.edu.cn。

谢中具有重要作用, 因此, 探讨胆固醇诱导的 UPR 及其调节 ACAT-2 基因表达对于胆固醇代谢及 As 发病机制的研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

肝细胞系 HepG2 购自上海细胞生物所, 小肠粘膜上皮细胞系 Caco2 购自武汉大学细胞库; Hepes、RPMI1640、OMEM 及 DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胆固醇和 7-酮基胆固醇购自 Sigma 公司; 逆转录酶、Oligo dT、Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自 Promega 公司; PCR 引物由上海生工公司合成。其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞培养

正常生长的 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清、20 mmol/L Hepes、25 mmol/L NaHCO₃ 及 pH7.4 的 RPMI1640 培养基中, Caco2 细胞培养于含 10% 胎牛血清及 pH7.4 的 DMEM 培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。胆固醇孵育前 24 h, 接种 1 × 10⁶ 个

细胞于 100 mL 培养瓶中, 孵育时换用 OMEM 无血清培养基培养 24 h, 然后再加入胆固醇和 7-酮基胆固醇(储液浓度为 100 mg/L 乙醇溶液), 至终浓度为 10 mg/L 和 20 mg/L, 孵育 16 h。二硫苏糖醇终浓度为 2 g/L, 分别孵育 HepG2 细胞和 Caco2 细胞 7 h, 作为阳性对照。

1.3 HepG2 细胞和 Caco2 细胞 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 的表达检测

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。取总 RNA 8 μg、Oligo(dT) 12-18 1 μg, 用 DEPC 处理水补充反应体积至 15 μL, 混匀。75℃、10 min 后置于冰上冷却 2 min, 加入 5 × Buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 3 μL, 逆转录酶 2 μL, 42℃反应 60 min 后, 95℃、5 min 灭活逆转录酶, 置于- 20℃保存。取 2 μL 逆转录产物进行 PCR 反应。PCR 反应引物序列及扩增条件见表 1。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 紫外灯下照相, GIS 凝胶电泳分析系统扫描分析, 以 β-actin 为内参。

表 1. 聚合酶链反应的引物序列和扩增条件

	引物序列	扩增片段长度	变性	退火	延伸	循环数
XBP-1	上游引物 5'-CCITGTAGTTGAGAACCAGG-3'	441 bp	95℃	55℃	72℃	28
	下游引物 5'-GGCCTTGGTATATATGTGG-3'					
ACAT-2	上游引物 5'-GGCAGAATCCTGTTAGAG-3'	236 bp	95℃	55℃	72℃	28
	下游引物 5'-GTCAGTCAGTGGCATCTG-3'					
β-actin	上游引物 5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3'	316 bp	95℃	55℃	72℃	28
	下游引物 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTG-3'					

1.4 统计学分析

实验组与对照组间的比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆固醇和 7-酮基胆固醇对 HepG2 细胞 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 水平的影响

10 mg/L 和 20 mg/L 的胆固醇和 7-酮基胆固醇使 HepG2 细胞 XBP-1 和 ACAT-2 mRNA 水平显著升高, 其效应随孵育浓度的增加而增加(图 1 和表 2)。

2.2 胆固醇和 7-酮基胆固醇对 Caco2 细胞 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 水平的影响

10 mg/L 和 20 mg/L 的胆固醇和 7-酮基胆固醇

使 Caco2 细胞 XBP-1 和 ACAT-2 mRNA 水平显著升高, 其效应随孵育浓度的增加而增加(图 2 和表 3)。

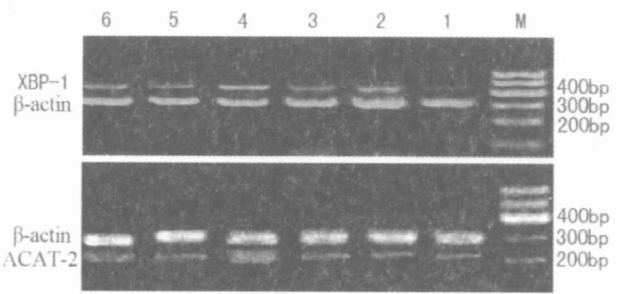


图 1. 不同浓度的胆固醇和 7-酮基胆固醇对 HepG2 细胞 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 水平的影响 1、3 及 4 泳道分别为 0、10 及 20 mg/L 7-酮基胆固醇孵育 16 h, 5 和 6 泳道分别为 10 和 20 mg/L 胆固醇孵育 16 h, 2 泳道为 2 g/L 二硫苏糖醇孵育 7 h, M 为 DNA marker。

表 2. 凝胶图像软件分析目的基因与内参 β -actin 光密度比值

分 组	ACAT-2	XBP-1
空白对照组	0.3256 \pm 0.0036	0.4172 \pm 0.0023
二硫苏糖醇组	0.7259 \pm 0.0026 ^a	0.7846 \pm 0.0016 ^a
胆固醇		
10 mg/L	0.6465 \pm 0.0015 ^a	0.6971 \pm 0.0033 ^a
20 mg/L	0.7896 \pm 0.0090 ^a	0.8276 \pm 0.0010 ^a
7-酮基胆固醇		
10 mg/L	0.7257 \pm 0.0021 ^a	0.7867 \pm 0.0027 ^a
20 mg/L	0.8365 \pm 0.0062 ^a	0.8677 \pm 0.0042 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

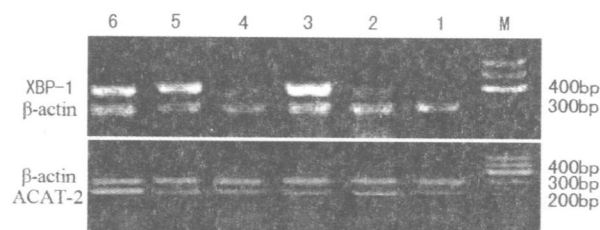


图 2. 不同浓度的胆固醇和 7-酮基胆固醇对 Caco2 细胞 X 盒结合蛋白 1 和酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 2 mRNA 水平的影响 1~3 泳道分别为 0、10 及 20 mg/L 7-酮基胆固醇孵育 16 h, 4 和 5 泳道分别为 10 和 20 mg/L 胆固醇孵育 16 h, 6 泳道为 2 g/L 二硫苏糖醇孵育 7 h, M 为 DNA marker。

表 3. 凝胶图像软件分析目的基因与内参 β -actin 光密度比值

分 组	ACAT-2	XBP-1
空白对照组	0.4015 \pm 0.0015	0.4212 \pm 0.0023
二硫苏糖醇组	0.7456 \pm 0.0020 ^a	0.7859 \pm 0.0025 ^a
胆固醇		
10 mg/L	0.7565 \pm 0.0012 ^a	0.7971 \pm 0.0013 ^a
20 mg/L	1.0274 \pm 0.0027 ^a	1.1676 \pm 0.0031 ^a
7-酮基胆固醇		
10 mg/L	0.7986 \pm 0.0023 ^a	0.8125 \pm 0.0031 ^a
20 mg/L	1.1985 \pm 0.0022 ^a	1.3628 \pm 0.0025 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

3 讨论

酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是胆固醇代谢中的关键酶之一, ACAT 存在两种同工酶, ACAT-1 和 ACAT-2。ACAT-1 存在于多数组织中, 使细胞内胆固醇酯化而维持细胞内胆固醇的浓度, 如果 ACAT-1 突变, 细胞内胆固醇的浓度增加, 细胞膜功能发生紊乱而导致细胞死亡, 加速 As 进展。已有的研究资料表明, ACAT-2 主要表达于肝细胞和小肠粘膜上皮细胞中, 催化胆固醇酯化并参与脂蛋白乳糜微粒、极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白的装配和代谢, 因此, 它可能参与胆固醇在肠道中的吸收和在

肝中的代谢^[7,8]。

胆固醇尤其是氧化胆固醇可诱导 UPR 而导致细胞凋亡, 这一过程与 As 的形成相关^[9,10]。本研究以肠上皮细胞和肝细胞作为主要研究对象, 选择 XBP-1 作为 UPR 的观察指标, 探讨胆固醇以及氧化胆固醇对 HepG2、Caco2 两种不同类型细胞中 XBP-1 及 ACAT-2 表达的影响。结果发现在这两种类型的细胞中胆固醇和氧化胆固醇均能诱导 UPR, 并同时增加 ACAT-2 的表达。在诱导 ACAT-2 表达增高的同时, XBP-1 的表达同步增高。尽管本研究中尚未直接证实 ACAT-2 的增高是 XBP-1 转录激活的结果, 但已有的证据表明, XBP-1 的激活可促进多种 UPR 靶基因的转录增强。序列分析结果显示 XBP-1 和通用型转录因子 NF- κ B 相互作用, 分别与细胞核 ERSE 上两侧的序列 CCAGG 和 CCAAT 结合, 促进下游基因的转录^[4]。对 ACAT-2 启动子序列分析结果显示, 其启动子中含有 3 份 CCAGG, 因此推测胆固醇或氧化胆固醇诱导 UPR, 并通过 XBP-1 的转录激活作用促进 ACAT-2 的转录, 从而影响胆固醇在肠细胞中的酯化吸收以及肝细胞中的代谢。本研究将在动物实验中证实 ACAT-2 对胆固醇酯化吸收的影响, 为最终阐明 ACAT-2 在胆固醇代谢中的作用奠定基础, 从而为 As 的临床治疗提供新的认识。

[参考文献]

- [1] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 249-53.
- [2] Feng B, Yao PM, Li YK, Zhang DJ, Harding HP, Rong JX, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophage [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5 (9): 781-792.
- [3] Rao RV, Hemmel E, Castro-Oregon S, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (36): 33 869-874.
- [4] Lee K, Tirasophon W, Shen XH, Michalak M, Prywes R, Okada T, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP 1 in signaling the unfolded protein response [J]. *Gen Devel*, 2002, 16 (1): 452-466.
- [5] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP 1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE 1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor [J]. *Cell*, 2001, 107 (7): 881-891.
- [6] Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP 1 regulate a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (21): 7 448-459.
- [7] Keisuke K, Toshiya T, Rina A, Kouki T. Structure of the human acyl-CoA cholesterol acyltransferase-2 (ACAT 2) gene and its relation to dyslipidemia [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2001, 1531 (13): 230-240.
- [8] Dawson PA, Rudel LL. Intestinal cholesterol absorption [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10 (4): 315-320.
- [9] Yao PM, Tabas I, Bond MG, Prack M, Rapp JH. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (31): 23 807-813.
- [10] Tabas I, Boykow G, Tall A, Trogan E. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (1): S12-16. (此文编辑 文玉珊)