

## 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因过表达对泡沫细胞形成的影响

何平<sup>1</sup>, 成蓓<sup>1</sup>, 王洪星<sup>2</sup>, 戚本玲<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科, 湖北省武汉市 430022;

2. 美国 Zeneca 制药公司分子和细胞生物学部)

[关键词] 病理学与病理生理学; 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1; 巨噬细胞; 单核细胞; 泡沫细胞

[摘要] 目的 研究在三种不同细胞中过表达酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因对泡沫细胞形成的影响。方法 构建携带酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 全长 cDNA 的 pCDNA3.1 质粒载体并稳定转染体外培养的人 THP-1 单核细胞、小鼠 RAW264.7 单核巨噬细胞和人胚肾 293 上皮细胞, 以油红 O 染色法检测在乙酰化低密度脂蛋白作用下转染前后三种细胞形成泡沫细胞的情况。结果 在相同的脂质负荷条件下, 转染酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因的 THP-1 单核细胞和 RAW264.7 巨噬细胞同未转染的细胞相比泡沫细胞的形成数量增加, 而人胚肾 293 上皮细胞无论是否转染酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因均不易形成泡沫细胞。结论 单核巨噬细胞中过表达酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因可促进泡沫细胞的形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effect of Over-Expressing of Acyl Coenzyme A Cholesteryl Acyltransferase 1 Gene on the Foam Cell Formation

HE Ping<sup>1</sup>, CHENG Bei<sup>1</sup>, WANG Hong-Xing<sup>2</sup>, and QI Ben-Ling<sup>1</sup>

(1. Department of Gerontology, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

2. Department of Molecular and Cell Biology, Zeneca Pharmaceuticals, Wilmington 19850, USA)

[KEY WORDS] Acyl Coenzyme A Cholesteryl Acyltransferase 1; Macrophages; Monocytes; Foam Cells

[ABSTRACT] Aim To study on the effect of over-expressing acyl coenzyme A cholesteryl acyltransferase 1 (ACAT-1) gene in the formation of foam cells in three kinds of cells. Methods ACAT-1 gene were transfected into cultured human THP-1 monocytic cells, human embryonic kidney 293 (HEK293) cells and murine macrophages RAW264.7 cells. The over-expressing ACAT-1 gene cells were incubated with acetylated low density lipoprotein (ac-LDL) and stained with oil red O to detect the formation of foam cells. Results The formation of foam cells became easier from over-expressing ACAT-1 gene THP-1 monocytic cells and RAW264.7 cells than control. But no apparent changes were observed in over-expressing ACAT-1 gene HEK293 cells. Conclusion Over-expressing ACAT-1 gene accelerated the formation of foam cells in monocytic and macrophagic cell lines.

泡沫细胞是动脉粥样硬化病变形成早期特征性的标志。研究发现泡沫细胞形成过程中酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 (acyl coenzyme A cholesteryl acyltransferase, ACAT) 活性明显增加, 而且这种酶活性的上升源于 ACAT-1 基因表达的上调<sup>[1,2]</sup>, 但 ACAT-1 基因表达的增加对泡沫细胞形成产生何种影响目前尚不清楚, 因此本研究在三种不同细胞中过表达 ACAT-1 基因以进一步揭示 ACAT-1 基因在泡沫细胞形成过程中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人 THP-1 单核细胞系购自武汉大学典藏物中心, 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系及人胚肾 293 (HEK293) 细胞系均购自美国典型物培养中心 (ATCC); G418 培养基、1640 培养基、MEM 无血清培养基、胎牛血清及 Trizol 购自 Gibco 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染试剂和 pCDNA3.1 质粒购自 Invitrogen 公司; 带有 ACAT-1 全长 cDNA 的 pCR/CMV 质粒由本室构建; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室保存菌种; [<sup>14</sup>C] 油酰 CoA 购自 NEN 公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、胆固醇、胆固醇油酯、油酰 CoA、Triton WR-1339 及佛波酯购自 Sigma 公司; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒及限制性内切酶 Apa I 和 Not I

[收稿日期] 2006-11-20 [修回日期] 2007-04-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30170378)

[作者简介] 何平, 博士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化的分子机制研究, E-mail 为 peace.00@263.net. 通讯作者成蓓, 教授, 博士生导师, 主要从事冠心病发病的分子机制研究。王洪星, 副教授, 主要从事脂质代谢的分子机制研究。

购自 Takara 公司; 所用引物由赛百盛合成, 其它试剂为国产分析纯。

## 1.2 细胞培养及传代

THP-1 细胞、RAW264.7 细胞及 HEK293 细胞均按 ATCC 的说明进行培养和传代, 转染 ACAT-1 基因后的细胞培养基含 500 mg/L G418。

## 1.3 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1-pCDNA3.1 重组质粒的构建

制备感受态细菌, 带有 ACAT-1 全长 cDNA 的质粒 pCR/CMV 及 pCDNA3.1 分别转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 扩增后进行小量抽提, 分别对质粒 pCR/CMV 及 pCDNA3.1 进行酶切并回收 ACAT-1 全长 cDNA 及质粒 pCDNA3.1 长片段, 连接, 转化, 扩增后进行大量抽提。

## 1.4 酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1-pCDNA3.1 重组质粒转染入细胞

转染前一天给细胞传代(THP-1 细胞转染当天传代), 按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 使用说明进行转染。

## 1.5 稳定转染细胞株的获得及鉴定

在 G418 的筛选下, 未获转染的细胞逐渐死亡, 获转染的细胞由单克隆逐渐扩增培养成稳定转染细胞株; 酶活性及 RT-PCR 检测进行鉴定。

## 1.6 酶活性测定

用低张休克法<sup>[3]</sup>获取细胞中的蛋白质。酶反应液包括 100  $\mu$ g 待测蛋白、1 mg BSA、游离胆固醇/Triton WR-1339(20  $\mu$ g: 600  $\mu$ g) 加 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4, 含 10 mmol/L DTT) 至 180  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后加入 20  $\mu$ L [1-<sup>14</sup>C] 油酰 CoA 溶液(用未标记的油酰 CoA 稀释,  $3.7 \times 10^5$  Bq, 终浓度为 20  $\mu$ mol/L), 37  $^{\circ}$ C 继续孵育 10 min, 加入 4 mL 氯仿: 甲醇(2: 1, 体积比) 终止反应, 加入 0.8 mL 水使有机相分离, 取下层相(氯仿相) 液体进行薄层层析, 展层系统为正己烷: 乙醚: 冰乙酸 = 170: 30: 1, 以胆固醇油酰酯作对照, 用碘蒸气显色后剪下胆固醇酯斑点(R<sub>f</sub> = 0.71) 放入装有 5 mL 闪烁液的液闪瓶中, 用液体闪烁计数器测定其放射性。

## 1.7 低密度脂蛋白的提取及修饰

取健康供血者血清 100 mL, 用密度梯度离心法获取低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 乙酸盐法对 LDL 进行乙酰化修饰<sup>[4]</sup>, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

## 1.8 泡沫细胞的形成

50 mg/L 乙酰化 LDL(acetyled LDL, ac-LDL) 加入培养基中孵育 24 h, 4% 甲醛固定, 60% 异丙醇漂洗, 油红 O 染色, 苏木素复染。显微镜下对泡沫细胞形

成进行分度: + 代表脂滴占胞质 < 1/3, ++ 代表脂滴占胞质 < 1/3~2/3, +++ 代表脂滴占胞质 > 2/3, 再计算++ 和+++ 的细胞占总细胞数的百分比。

## 1.9 统计学处理

实验均重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 稳定转染细胞的鉴定

与未转染的对照组比较, 转染 ACAT-1 基因后的细胞酶活性明显上升, THP-1 转染组、HEK293 转染组和 RAW264.7 转染组酶活性分别上升至对照组的 160%、220% 和 211% (表 1), ACAT-1 mRNA 水平也相应增加(图 1 和表 2)。

表 1. 转染前后细胞酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 的酶活性变化 [ $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu$ mol/(min·g)]

| 细胞类型     | 对照组           | 转染组                         |
|----------|---------------|-----------------------------|
| THP-1    | 2.0 $\pm$ 0.4 | 3.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>  |
| HEK293   | 1.1 $\pm$ 0.2 | 2.3 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>  |
| RAW264.7 | 6.4 $\pm$ 0.9 | 13.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> |

a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较。

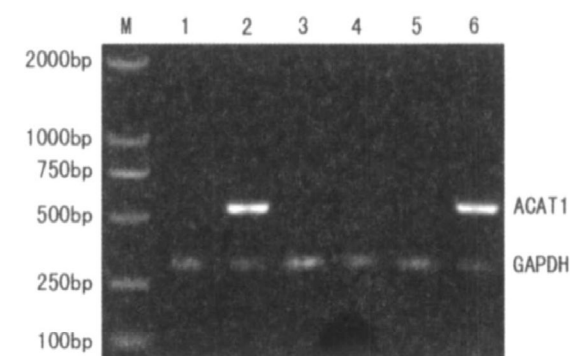


图 1. 转染前后细胞酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 逆转录聚合酶链反应结果 M 为分子质量标准, 1 为对照组, 2 为 ACAT-1 基因转染组, 3 为 THP-1 细胞, 4 为 HEK293 细胞, 5 为 RAW264.7 细胞。

表 2. 转染前后细胞酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 mRNA 水平的变化

| 细胞类型     | 对照组             | 转染组                          |
|----------|-----------------|------------------------------|
| THP-1    | 0.34 $\pm$ 0.12 | 1.34 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup> |
| HEK293   | 0.15 $\pm$ 0.06 | 0.46 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> |
| RAW264.7 | 0.60 $\pm$ 0.20 | 3.00 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup> |

a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较。

## 2.2 转染酰基辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 基因前后泡沫细胞的形成比较

与未转染细胞比较, 过表达 ACAT-1 基因的 THP-1 单核细胞和 RAW264.7 单核巨噬细胞油红 O 染色++ 和+++ 的细胞百分比增加, THP-1 单核细胞由转染前  $25.4\% \pm 4.1\%$  上升至转染后  $71.5\% \pm 7.8\%$  ( $P < 0.05$ ), RAW264.7 单核巨噬细胞由转染前  $30.1\% \pm 4.8\%$  上升至转染后  $90.3\% \pm 4.4\%$  ( $P < 0.01$ ), 后者增加更明显(图 2 和 3); 而在 HEK293 细胞, 无论转染 ACAT-1 基因与否, 泡沫细胞的形成均不明显, 油红 O 染色++ 和+++ 的细胞百分比分别为  $2.8\% \pm 1.7\%$  和  $3.2\% \pm 2.1\%$  (图 4)。

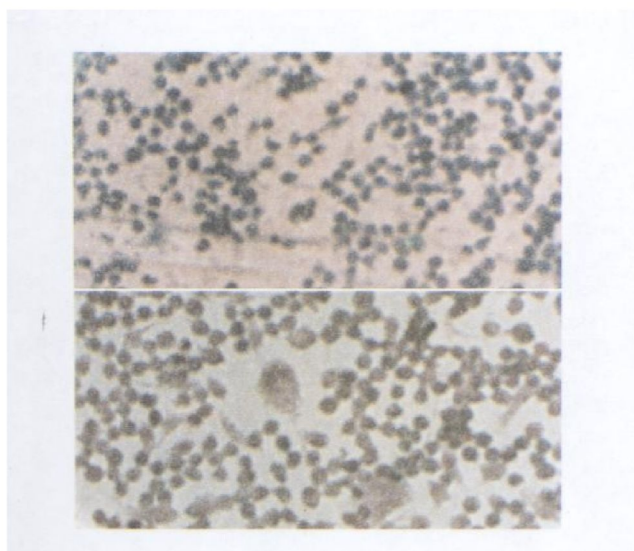


图 2. 转染前后 THP-1 细胞形成泡沫细胞的比较 上图为未转染的 THP-1 细胞, 下图为转染 ACAT-1 基因的 THP-1 细胞。

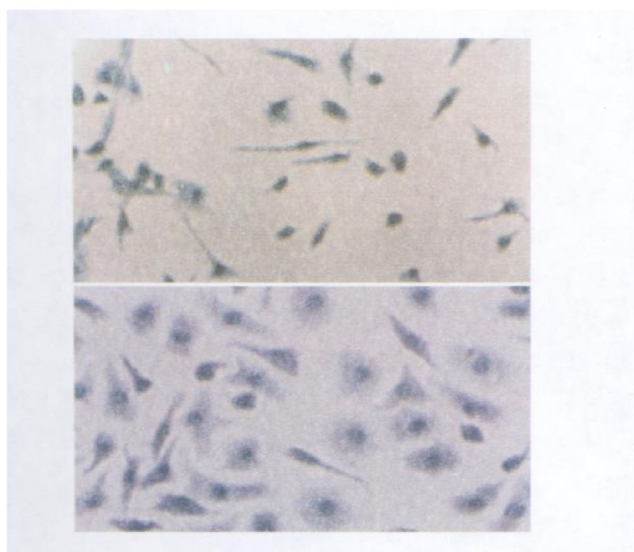


图 3. 转染前后 RAW264.7 细胞形成泡沫细胞的比较 上图为未转染的 RAW264.7 细胞, 下图为转染 ACAT-1 基因的 RAW264.7 细胞。

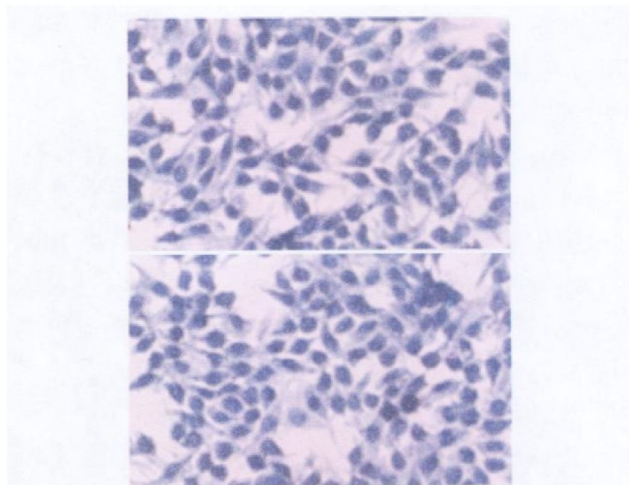


图 4. 转染前后 HEK293 细胞形成泡沫细胞的比较 上图为未转染的 HEK293 细胞, 下图为转染 ACAT-1 基因的 HEK293 细胞。

## 3 讨论

巨噬细胞来源的泡沫细胞存在于动脉粥样硬化病变的各个阶段。在各种促动脉粥样硬化因素的作用下, 血液中的单核巨噬细胞侵入动脉血管内皮下吞噬脂蛋白, 在细胞质中沉积大量胆固醇酯形成泡沫细胞。由清道夫受体介导的脂质内吞和 ACAT 催化的胆固醇酯合成在泡沫细胞的形成过程中起了重要作用。LDL 被氧化或乙酰化修饰后可由 A 型清道夫受体(SR-A)摄入细胞, 这种摄入不受细胞内胆固醇水平的影响, 导致细胞内胆固醇的大量堆积<sup>[5,6]</sup>, 胆固醇是 ACAT 的天然底物及变构调节剂, 可促进 ACAT 酶活性上升<sup>[7]</sup>, 使胆固醇以胆固醇酯的形式贮存在细胞内, 促进泡沫细胞的形成。

在人体 SR-A 主要分布于单核巨噬细胞, 在小鼠体内 SR-A 广泛分布于各种巨噬细胞, 包括胰腺、胸腺、肝脏、心脏和肠道<sup>[8]</sup>。ACAT-1 mRNA 可表达于哺乳动物的所有组织中, 表达水平最高的为巨噬细胞、肾上腺及皮脂腺等<sup>[9]</sup>, 提示 SR-A 及 ACAT-1 与巨噬细胞的功能密切相关。为了进一步研究 ACAT-1 基因的生物学功能, 我们采用了三种不同细胞过表达 ACAT-1 基因, 其中 THP-1 细胞属单核细胞系, RAW264.7 细胞属单核巨噬细胞系, 细胞特性倾向于巨噬细胞, 这两种细胞中均有一定量的 ACAT-1 基因表达; 而 HEK293 细胞属上皮细胞系, ACAT-1 基因的表达较少, 但这种细胞较易接受外来基因。本研究结果发现, 在单核巨噬细胞来源的细胞中过表达 ACAT-1 基因, 可导致细胞的生物学功能发生改变, 表现为更容易吞噬修饰的 LDL, 导致细胞中脂质负荷增加, 胆固醇酯大量堆积, 促进泡沫细胞的形成。而且这种变化在 RAW264.7 细胞中表现



得更加明显。可能与其细胞中 SR-A 的表达较多而 THP-1 单核细胞未被诱导分化, SR-A 尚处于较低水平有关<sup>[10,11]</sup>。在 HEK293 细胞中转染 ACAT-1 基因, 虽然有一定的生物学活性改变, 表现为 ACAT 酶活性增加, 但在 ac-LDL 进行脂质负荷后, 并没有观察到细胞中脂质堆积及泡沫细胞的形成。因为 HEK 293 细胞中没有 SR-A 的大量表达, 脂质难以进入细胞中, 尽管 ACAT 酶活性增加, 细胞具有潜在的积聚胆固醇酯的能力, 但由于细胞中缺乏相应的反应底物, 也难以形成泡沫细胞。

泡沫细胞的形成是一个复杂的由多基因、多因素共同参与调控的过程, ACAT-1 基因在这个过程中发挥了特定的作用, 在其它因素满足的条件下, 过表达 ACAT-1 基因可促进泡沫细胞的形成, 因此, ACAT-1 将成为研究致动脉粥样硬化因素的一个新的作用点, 也为通过干预 ACAT-1 而影响动脉粥样硬化进程的研究提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Wang HX, Gernain SJ, Benfield PP, Gillies PJ. Gene expression of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase is upregulated in human monocytes during differentiation and foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (6): 809-814.
- [2] 何平, 成蓓, 彭雯, 王毅, 王洪星. 泡沫细胞形成过程中酰基 CoA: 胆固醇酰基转移酶 1 活性改变及其机制研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (2): 158-160.

- [3] Chang TY, Limanek JS, Chang CCY. A simple and efficient procedure for the rapid homogenization of cultured animal cells grown in monolayer [J]. *Anal Biochem*, 1981, **116**: 298-302.
- [4] Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73** (9): 3 178-182.
- [5] Podrez EA, Hoppe G, O'Neil J, Sayre LM, Sheibani N, Hoff HF. Macrophage receptors responsible for distinct recognition of low density lipoprotein containing pyrrole or pyridinium adducts: models of oxidized low density lipoprotein. [J]. *J Lipid Res*, 2000, **41** (9): 1 455-463.
- [6] Tamura Y, Osuga J, Adachi H, Tozawa R, Takanezawa Y, Ohashi K, et al. Scavenger receptor expressed by endothelial cells I (SREC-I) mediates the uptake of acetylated low density lipoproteins by macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (30): 30 938-944.
- [7] Zhang Y, Yu C, Liu J, Spencer TA, Chang CC, Chang TY. Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 alpha-hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (13): 11 642-647.
- [8] Platt N, Gordonis S. The class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? —The mouse's tale [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108** (5): 649-654.
- [9] Sakashita N, Miyazaki A, Takeya M, Horiuchi S, Chang CC, Chang TY, et al. Localization of human acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues [J]. *Am J Pathol*, 2000, **156** (1): 227-236.
- [10] Tian G, Wilcockson D, Perry VH, Rudd PM, Dwek RA, Platt FM, et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidases I and II increases the cell surface expression of functional class A macrophage scavenger receptor (SR-A) by extending its half-life [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (38): 39 303-309.
- [11] 陈耀宇, 管晓翔, 王晓花, 乐丑, 柏惠, 陈秀英, 等. A 类清道夫受体 N 端第 1~27 位氨基酸胞浆结构域缺失对功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 267-270.

(此文编辑 文玉珊)