

类法尼醇 X 受体在巨噬细胞中下调 单核细胞趋化蛋白 1 的表达

张 迁, 甘 淋, 鲁 力, 申丽丽, 何凤田, 江 渝

(中国人民解放军第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 重庆市 400038)

[关键词] 分子生物学; 类法尼醇 X 受体; 核受体; 胆汁酸; 单核细胞趋化蛋白 1; ANA-1 细胞株; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中类法尼醇 X 受体的表达情况, 并进一步研究类法尼醇 X 受体天然配体鹅脱氧胆酸在 ANA-1 中对单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响, 以探讨类法尼醇 X 受体在动脉粥样硬化发生发展中的作用。方法 应用逆转录聚合酶链反应检测类法尼醇 X 受体在 ANA-1 细胞中的表达, 及鹅脱氧胆酸处理后单核细胞趋化蛋白 1 的转录水平, Western blot 检测类法尼醇 X 受体的表达及其激活后对自身蛋白表达的调节, 以及单核细胞趋化蛋白 1 蛋白的表达水平。结果 类法尼醇 X 受体在 ANA-1 中表达, 并依赖鹅脱氧胆酸浓度自我上调, 鹅脱氧胆酸能显著下调单核细胞趋化蛋白 1 的表达水平 ($P < 0.05$)。结论 类法尼醇 X 受体在小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中组成型表达并呈配体浓度依赖性自我上调, 类法尼醇 X 受体激活后可通过直接或间接方式下调单核细胞趋化蛋白 1 的表达。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Downregulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 by Farnesoid X Receptor in Murine Macrophages

ZHANG Qian, GAN Lin, LU Li, SHEN Li-Li, HE Feng-Tian, and JIANG Yu

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University of the People's Liberation Army, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Farnesoid X Receptor; Nuclear Receptor; Chenodexychoic Acid; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Macrophage; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate expression of farnesoid X receptor (FXR) in murine macrophage cell line ANA-1 and evaluate the effect of FXR agonist chenodexychoic acid (CDCA) on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in ANA-1 cells. **Methods** ANA-1 cells were cultured and treated with FXR agonist CDCA. The mRNA level of FXR and MCP-1 were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Western blot was used to assess the expression of FXR and MCP-1 protein level. **Results** FXR expressed in ANA-1 cells and acted in an autoregulatory fashion. CDCA significantly reduced MCP-1 mRNA and protein level in ANA-1 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** FXR expresses in murine macrophage cell line ANA-1. After activated by CDCA, FXR may downregulate MCP-1 directly or indirectly.

单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 趋化并激活单核细胞, 与肿瘤、动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 等疾病的发生发展密切相关^[1]。近年来对 MCP-1 转录水平的调控主要围绕转录因子核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、SP1 和 AP-1 展开^[2-4], 孤核受体如肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 和过氧化物增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferators activated receptor gamma, PPAR γ) 对 MCP-1 的负调控也有报道^[5,6]。类法尼醇 X 受体

(farnesoid X receptor, FXR) 为一种孤核受体, 受多种胆汁酸及多不饱和脂肪酸激活, 以鹅脱氧胆酸 (chenodexychoic acid, CDCA) 为最适配体^[7,8]。以往对 FXR 的研究主要集中在胆汁酸代谢、糖代谢及脂代谢; 本实验就 FXR 在小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中的表达及与 MCP-1 表达的关系进行研究, 为进一步阐明 FXR 在 As 发生发展的分子机制中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ANA-1 细胞株由本室提供。主要试剂有 RPMI 1640 培养基 (HyClone 公司), CDCA (Sigma 公司)。Tripure 试剂 (Roche 公司), M-MLV 第一链 cDNA 合成

[收稿日期] 2007-07-12 [修回日期] 2007-12-28

[基金项目] 第三军医大学留学回国人员启动基金 (06HG010); 重庆市自然科学基金 (CSTC, 2007BB5050)

[作者简介] 张迁, 硕士研究生, 主要从事分子生物学方面的研究, E-mail 为 oilpangpang@hotmail.com。通讯作者江渝, 博士, 教授, E-mail 为 yujiang61@gmail.com。

试剂盒 (Promega 公司), KOD-Plus (TOYOBO 公司), 小鼠 MCP-1 单抗 (MAB479) 为 R&D Systems 产品, FXR 多抗 (H-130X) 购自 Santa Cruz 公司, β -actin 一抗购自 Abcam 公司, ECL 显色试剂盒购自 pierce 公司, HRP 标记二抗购自广州中杉公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 小鼠 ANA-1 巨噬细胞株的培养

ANA-1 细胞株由 J2 逆转录病毒感染 C57BL/6 小鼠骨髓分化而来。将其接种于含有 10% 新生小牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 37℃、5% CO₂ 培养。待细胞生长到对数生长期时, 调细胞浓度为 10⁹/L, 均匀接种到一组培养瓶中, 在含 2% 的新生小牛血清培养基中, 加入 FXR 配体 CDCA 干预细胞。

1.3 逆转录聚合酶链反应

Tripure 试剂一步法提取 ANA-1 细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第一链。FXR、MCP-1 及 β -actin 引物使用 Premier 5.0 自行设计, 由上海英骏公司合成。FXR 上游引物为 5'-TGC GAC AAG TGA CCT CCA CAA-3', 下游引物为 5'-CTC CGC CGA ACG AAG AAA CAT-3', 扩增产物长度为 317 bp; MCP-1 上游引物为 5'-GGT CCC TGT CAT GCT TCT GG-3', 下游引物为 5'-AAG TGC TTG AGG TGG TTG TG-3', 扩增产物长度为 410 bp; β -actin 上游引物为 5'-CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC-3', 下游引物为 5'-TGC TGT CGC CTT CAC CGT TCC-3', 扩增产物长度为 664 bp。PCR 反应条件为 FXR: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s → 62℃退火 30 s → 72℃延伸 30 s, 共 30 个循环, 72℃再延伸 5 min; MCP-1: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s → 63℃退火 30 s → 72℃延伸 30 s, 共 23 个循环, 72℃再延伸 5 min; β -actin: 95℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s → 59℃退火 30 s → 72℃延伸 30 s, 共 23 个循环, 72℃再延伸 5 min。所有 PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统扫描软件分析, 并计算目的基因与 β -actin 二者吸光度的比值。

1.4 Western blot

细胞总蛋白提取液抽提细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 各组样品等量上样后行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, Bio-rad 湿转移, 转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 (MCP-1: 2 mg/L; FXR: 1: 2 000; β -actin: 1: 2 000) 4℃过夜, BPST 洗涤, 二抗 (1: 6 000) 室温 2 h, PBST 洗涤, 使用 HRP-ECL 显色, 暗盒压片曝光。

1.5 统计学分析

所有数据应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学

分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差别采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 类法尼醇 X 受体在小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中表达并依赖鹅脱氧胆酸浓度上调

RT-PCR 结果表明, FXR 在 ANA-1 细胞株中组成型表达 (图 1), PCR 产物经测序表明, 与 GenBank 中给出的小鼠 FXR cDNA 片段 (NM 009108) 一致。Western blot 分析表明 FXR 在 ANA-1 中表达 (图 1)。在 FXR 天然配体 CDCA 刺激下, 随 CDCA 浓度的增加 (0、25、50 和 100 μ mol/L), FXR 也升高 (吸光度分别为 0.137 ± 0.023 、 0.185 ± 0.035 、 0.267 ± 0.028 和 0.315 ± 0.016 , $P < 0.05$, 图 2)。说明 FXR 在 ANA-1 中能够被其配体激活, 进而上调其自身的表达水平^[9, 10]。

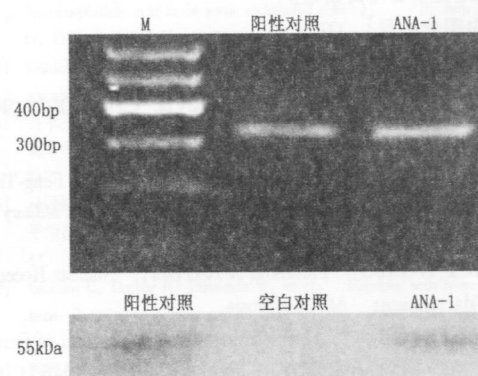


图 1. 逆转录聚合酶链反应 (上图) 和 Western blot (下图) 检测类法尼醇 X 受体在 ANA-1 细胞中的表达

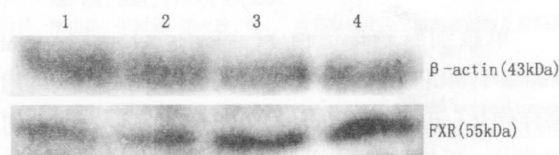


图 2. Western blot 检测不同浓度鹅脱氧胆酸处理 24 h 对类法尼醇 X 受体蛋白表达的影响 1 为对照组, 2~4 分别为 25、50 和 100 μ mol/L 鹅脱氧胆酸。

2.2 鹅脱氧胆酸下调单核细胞趋化蛋白 1 的表达

为了研究 FXR 在巨噬细胞中的转录调控功能, 我们观察 FXR 激活后, 是否可以影响下游基因的表达。经过系列筛选发现, CDCA 处理 ANA-1 细胞, 其 MCP-1 的表达下调。MCP-1 在 ANA-1 中高表达^[11], 为研究提供良好的模型。RT-PCR 及 Western blot 分

析表明, CDCA (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 ANA-1 细胞 12 和 24 h 后, MCP-1 的转录水平降低(图 3 和表 1); 同时 MCP-1 的 mRNA 和蛋白水平也随 CDCA 浓度的增加而降低(图 4 和表 2)。

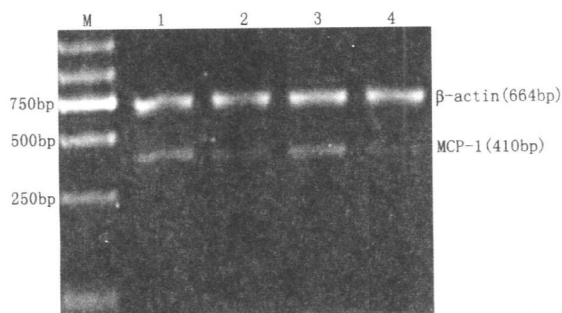


图 3. 鹅脱氧胆酸处理 12 和 24 h 对单核细胞趋化蛋白 1 转录水平的影响 1 为对照组 12 h, 2 为鹅脱氧胆酸处理 12 h, 3 为对照组 24 h, 4 为鹅脱氧胆酸处理 24 h。

表 1. 鹅脱氧胆酸处理 12 和 24 h 对单核细胞趋化蛋白 1 转录水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

鹅脱氧胆酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	处理时间 (h)	相对吸光度
0 (对照组)	12	0.507 ± 0.015
50	12	0.445 ± 0.016^a
0 (对照组)	24	0.594 ± 0.036
50	24	0.430 ± 0.020^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组同时时间比较。

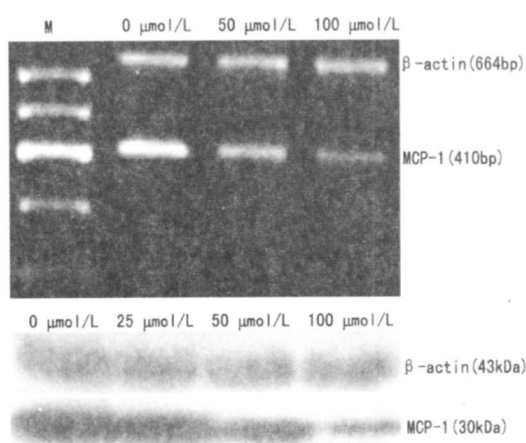


图 4. 不同浓度鹅脱氧胆酸处理 24 h 对单核细胞趋化蛋白 1 转录水平(上图)和蛋白水平(下图)的影响

3 讨论

类法尼醇 X 受体(FXR)在小鼠和人的肝脏、小

表 2. 不同浓度鹅脱氧胆酸处理 24 h 对单核细胞趋化蛋白 1 转录水平和蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

鹅脱氧胆酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	转录水平	蛋白水平
0	1.579 ± 0.024	2.56 ± 0.04
25	—	2.29 ± 0.035^a
50	0.962 ± 0.072^a	1.46 ± 0.030^a
100	0.535 ± 0.043^b	0.60 ± 0.024^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

肠、肾及肾上腺中高表达, 后来发现胆汁酸为 FXR 天然配体, 其又命名为胆汁酸受体, 对 FXR 功能研究集中在胆汁酸代谢途径, 同时 FXR 参与了脂代谢和糖代谢途径。在糖尿病鼠中, FXR 能降低中性脂类在肝中的堆积而降低血脂^[12]。而近年来的研究发现 FXR 在血管平滑肌细胞和内皮细胞中表达并发挥调控功能^[10, 13], 最近在人乳腺癌组织及 MCF-7 细胞中也检测到 FXR 的表达^[14], 进一步拓展了 FXR 的功能领域。FXR 与炎症的关系也逐渐受到关注: 在肝细胞中, FXR 激活后能诱导细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) 的表达^[15]; 脂多糖和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等炎症因子能抑制 FXR 的表达及其与 FXR 反应元件(FXR response element, FXRE)的结合^[16]; FXR 基因敲除小鼠的腹膜巨噬细胞经脂多糖刺激后, 与同样刺激的野生型小鼠腹膜巨噬细胞相比, TNF- α 与 γ -干扰素的表达显著升高^[17]。本研究在小鼠巨噬细胞株中检测到 FXR 的表达, 结合以上研究, 表明 FXR 参与调控炎症反应的相关分子的表达。

单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)为 As 发展中的主要因子, 其在 As 斑块中高表达, 血管内皮细胞产生的 MCP-1 能够招引单核细胞至内皮下, 分化为巨噬细胞, 而巨噬细胞也能够产生 MCP-1 吸引更多的单核细胞进入内皮, 此外 MCP-1 还能够诱导清道夫受体 CD36 的表达, 加速泡沫细胞的形成, 从而促进 As 的发生发展^[18]。MCP-1 基因敲除能够减缓 As 模型小鼠的病情, 进一步说明了 MCP-1 具有促 As 作用^[19]。近年对 MCP-1 的研究, 使其成为防治 As 研究的靶分子。

本研究表明, 小鼠巨噬细胞株 ANA-1 中存在 FXR, 并在其特异性天然配体 CDCA 刺激下, FXR 表达上调。已有研究表明 FXR 与 MCP-1 参与了 As 的发生发展^[17]。我们试图研究 FXR 与 MCP-1 之间的关系及其在 As 发生发展中的作用, 结果发现, ANA-1 细胞中 MCP-1 的 mRNA 和蛋白水平下调, 提示

FXR 激活后可能通过直接或间接的方式下调 MCP-1 的表达。FXR 激活后, 通常与视黄酸 X 受体(retinoid X receptor, RXR) 以异二聚体形式结合于靶基因启动子区的 FXRE 来调控基因的转录。大多数的 FXRE 由反向重复的 AGGTCA 模序组成, 反向重复序列之间有一个核苷酸相隔, 即 IR-1 (inverted repeats separated by 1 bp)。也有同向重复的 AGGTCA 模序组成的 FXRE, 重复序列之间有 3 或 4 个核苷酸相隔, 如 DR-3 (direct repeats separated by 3 bp) 和 DR-4 (direct repeats separated by 4 bp) 等。我们根据 NUBIScan V2.0 网站的 NUBIScan algorithm 在小鼠的 MCP-1 启动子区分析 FXR 的可能结合序列, 发现在 MCP-1 基因转录起始位点上游 2 172 bp 处存在打分为 0.84 的 DR-3。我们将会继续深入研究 FXR 下调 MCP-1 的具体机制。

研究发现, FXR 基因敲除的 As 模型小鼠, 其 As 发展水平较单纯的 As 模型鼠有所增高^[20], 说明了 FXR 的抗 As 作用。FXR 对 MCP-1 表达的下调, 也说明了 FXR 的抗 As 作用。本研究以及近年来对 FXR 在血管系统中的研究, 拓宽了 FXR 的临床应用潜力, FXR 激动剂作为药物不仅可以改善脂质代谢, 同时在治疗心血管疾病方面也有重要的潜在价值。

[参考文献]

- [1] Luo Y, Laning J, Hayashi M, et al. Serologic analysis of the mouse beta chemokine JE/monocyte chemoattractant protein-1 [J]. *J Immunol*, 1994, **153** (8): 3 708-716.
- [2] Seon Il Jang, Young-Jun Kim, Hyoung Jin Kim, et al. Scoparone inhibits PMA-induced IL-8 and MCP-1 production through suppression of NF- κ B activation in U937 cells [J]. *Life Sci*, 2006, **78**: 2 937-943.
- [3] 李爱民, 何作云, 周小波, 等. 氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化因子 1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 108-111.
- [4] Ping DS, Gunther Boekhoudt, Zhang FP, et al. Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the MCP-1 gene by tumor necrosis factor [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (3): 1 708-714.
- [5] Chih-Hao Lee, Ajay Chawla, Ned Urbizondo, et al. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR γ [J]. *Science*, 2003, **302** (17): 453-457.
- [6] Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors [J]. *Nat Med*, 2003, **9** (2): 213-219.
- [7] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids [J]. *Science*, 1999, **284**: 1 362-365.
- [8] Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (1): 1 104-011.
- [9] Lew JL, Zhao A, Yu J, et al. The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 8 856-861.
- [10] He FT, Li J, Mu Y, et al. Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2006, **98**: 192-199.
- [11] Bosco MC, Puppo M, Pastorino S, et al. Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production by macrophages [J]. *J Immunol*, 2004, **172** (3): 1 681-690.
- [12] Zhang Y, Lee FY, Barrera G, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice [J]. *PNAS*, 2006, **103** (4): 1 006-011.
- [13] Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (10): 3 668-673.
- [14] Journe F, Laurent G, Chaboteaux C, et al. Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, **2**: 28-32.
- [15] Qin P, Borges-Marcucci LA, Evans MJ, et al. Bile acid signaling through FXR induces intracellular adhesion molecule-1 expression in mouse liver and human hepatocytes [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, **289**: 267-273.
- [16] Kim MS, Shigenaga J, Moser A, et al. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (11): 8 988-995.
- [17] Guo GL, Santamarina-Fojo Silvia, Akiyama TE, et al. Effects of FXR in foam cell formation and atherosclerosis development [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2006, **1 761**: 1 401-409.
- [18] Tabata T, Mine S, Kawahara C, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **305** (2): 380-385.
- [19] Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Mol Cell*, 1998, **2**: 275-281.
- [20] HaHanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, et al. 功能性法尼醇 X 受体缺失增加载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉粥样硬化损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 99.

(此文编辑 许雪梅)