

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0101-06

• 实验研究 •

脂肪分化相关蛋白通过酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 促进巨噬细胞脂质蓄积

袁中华¹, 贾薇², Xi-Lin NIU³, 黄谔非¹, 刘录山¹, 易光辉¹, 王佐¹, 任重¹, 唐朝克¹, 田国平⁴, 杨永宗¹

(南华大学 1. 心血管病研究所, 4. 附属第二医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 吉首大学医学院生理学教研室, 湖南省吉首市 416000; 3. 美国北卡罗来纳大学医学院卡罗来纳心血管生物学中心, 教堂山 27599)

[关键词] 病理学与病理生理学; 脂肪分化相关蛋白; 酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1; 胆固醇酯蓄积; 巨噬细胞

[摘要] **目的** 观察高表达脂肪分化相关蛋白对酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达及脂质蓄积的影响。**方法** 构建表达载体 pcDNA3.1-HA-脂肪分化相关蛋白, 使用 THP-1 巨噬细胞, 通过瞬时转染使之高表达脂肪分化相关蛋白, 依次用氧化型低密度脂蛋白和(或)丙泊尼地处理。逆转录聚合酶链反应和 Western blot 检测酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 及脂肪分化相关蛋白的表达, 油红 O 染色和高效液相色谱检测细胞内脂质的蓄积。**结果** 随着氧化型低密度脂蛋白浓度的增加, 巨噬细胞脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达明显增强, 两者呈伴行关系。丙泊尼地能抑制酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达上调, 且随处理时间延长, 其表达逐渐减少, 并且能减少细胞内脂滴生成。与对照组相比, 瞬时转染 pcDNA3.1-HA-脂肪分化相关蛋白能使脂肪分化相关蛋白表达明显升高。高表达脂肪分化相关蛋白的巨噬细胞能使酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达增加, 促进细胞内胆固醇酯蓄积, 并协同增强氧化型低密度脂蛋白的作用。加入丙泊尼地后, 高表达脂肪分化相关蛋白的作用被减弱。**结论** 高表达脂肪分化相关蛋白能上调 THP-1 巨噬细胞酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达, 促进细胞内脂质蓄积。脂肪分化相关蛋白可能通过酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 促进细胞内胆固醇酯的蓄积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Adipophilin Accumulating Cellular Cholesterylester by Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase in THP-1 Macrophages

YUAN Zhong-Hua¹, JIA Wei², Xi-Lin NIU³, HUANG An-Fei¹, LIU Lu-Shan¹, YI Guang-Hui¹, WANG Zuo¹, REN Zhong¹, TANG Chao-Ke¹, TIAN Guo-Ping⁴, and YANG Yong-Zong¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, 4. Department of Cardiovascular Medicine of the Second Attached Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Physiology, Medical School of Jishou University, Jishou 416000, China; 3. Carolina Cardiovascular Biology Center, Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7126, USA)

[KEY WORDS] Adipophilin; Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase; Cholesteryl Ester Accumulation; Macrophages

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether overexpression adipophilin induces acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) high expression and lipid accumulation in THP-1 macrophages. **Methods** The THP-1 cells were differentiated to macrophages through incubation with 160 nmol/L phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24 h. To make overexpressed adipophilin macrophages, the pcDNA3.1-HA-adi constructed was transfected to THP-1 macrophages. Then, cells were incubated with or without oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and/or S-58035 for different time. ACAT1 and adipophilin expression were investigated with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. Oil red O staining and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to analyze the cellular cholesteryl ester accumulation. **Results** With the increasing incubated concentration of ox-LDL, both adipophilin and ACAT1 mRNA up-regulated obviously. The up-regulated expression of ACAT1 induced by ox-LDL was inhibited by S-58035, and intracellular lipid droplets also decreased. Compared with control, transfecting pcDNA3.1-HA-adi increased adipophilin protein level in THP-1 macrophages. Overexpression adipophilin cells significantly up-regulated ACAT1 expression and promoted intracellular lipid accumulation. Ox-LDL synergized the effect of ACAT1 high expression. But the effect could be inhibited by S-58035. **Conclusion** Overexpression adipophilin can up-regulate the ACAT1 expression in THP-1 macrophages, and increase cellular cholesteryl ester. It suggested that adipophilin accumulated cellular cholesteryl ester by ACAT1 in THP-1 macrophages.

[收稿日期] 2007-08-23 [修回日期] 2008-02-02

[基金项目] 湖南省自然科学基金(05JJ40039)

[作者简介] 袁中华, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为泡沫细胞形成的分子机制, E-mail 为 yzh5555@163.com。贾薇, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制。通讯作者田国平, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的防治, E-mail 为 pgtian555@hotmail.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展的核心环节是单核/巨噬细胞和平滑肌细胞大量蓄积脂质所致的泡沫细胞形成^[1]。这些蓄积的脂质主要以脂滴的形式储存于细胞质,脂肪分化相关蛋白(adipose differentiation-related protein, ADRP; adipophilin)就是脂滴外周含量较高的一种不完全包被蛋白^[2,3],它在富含巨噬细胞源性泡沫细胞的As斑块区高表达^[4]。酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶(acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase, ACAT)催化游离胆固醇和长链脂肪酸形成胆固醇酯,是细胞内主要合成胆固醇酯的酶。研究表明^[5],在As发病过程中,ACAT起至关重要的作用。在As斑块中,ADRP与ACAT1均高表达^[6]。ADRP能促进细胞对脂肪酸吸收与结合^[7],脂酰辅酶A又是ACAT1的底物。这提示两者在促使细胞内脂质积聚上密切相关。但ADRP是否通过ACAT1影响细胞内胆固醇代谢,目前尚未见报道。本课题组^[8,9]已发现,在兔As模型上增厚的主动脉内膜ADRP表达增高,ADRP反义寡核苷酸能使细胞内胆固醇酯减少,ADRP的高表达与ACAT的活性呈正相关。因此,本文使用ACAT抑制剂及高表达ADRP的THP-1巨噬细胞,研究ADRP与ACAT1的关系,寻找ADRP促进泡沫细胞形成的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

THP-1细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。RPMI-1640培养基购自美国GIBCO公司。胎牛血清购自天津灏洋公司。丙泮尼地(3-[decyldimethylsilyl]-N-[2-(4-methylphenyl)-1-phenylethyl]-propanamide, S-58035)购自Sigma公司(5 mg S-58035中加入1 mL DMSO构成5 g/L的使用浓度,反复抽吸混匀后分装,密闭4℃保存)。油红O购自Ameresco公司。Trizol试剂、dNTP和oligo(dT)18购自上海生工公司。ImProm-III™逆转录酶购自Promega公司。MasterMix一管便捷式PCR扩增试剂盒购自北京天为时代公司。所有引物由上海生工生物工程服务有限公司合成,其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

人血浆低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)(密度1.040~1.063 kg/L)采用超速离心法制备。用Lowry法测得LDL的蛋白质含量为1.68 g/L。文中所列脂蛋白浓度均以蛋白为标准。参考

文献[10]的方法制备铜氧化的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。本实验所用LDL在氧化前脂质过氧化物含量为1.5 μmol/g胆固醇,氧化修饰后为17.2 μmol/g胆固醇。

1.3 细胞培养、传代及处理

THP-1细胞生长于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,37℃、5% CO₂培养箱中静置培养。培养基中加10 mmol/L的HEPES,每48~72 h传代一次。取对数生长期细胞进行实验,在每次实验前用160 nmol/L佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)孵育细胞24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。待其贴壁生长汇合至80%左右,用含2 g/L BSA的培养基培养3 h后,加入不同处理试剂,如ox-LDL、丙泮尼地等,孵育不同时间后收集细胞。

1.4 构建pcDNA3.1-HA-脂肪分化相关蛋白质粒及转染细胞

从培养的小鼠(C57BL/6J)血管平滑肌细胞(第6代)克隆ADRP基因(GeneBank编号:M93275),使用TOPO TA克隆试剂盒(美国Invitrogen公司,编号K4500-1)得到pCR2.1-ADRP克隆载体。用该质粒为模板,3'端加入HA tag的序列(5'-UAA CCA UAU GAU GUU CCA GAU UAU GCU-3')和终止密码子(TAA)。进一步克隆,得到pCR2.1-HA-ADRP克隆载体。酶切、连接,得到pcDNA3.1-HA-ADRP载体。

取对数生长期的THP-1细胞,待其细胞密度达到80%时,加入160 nmol/L PMA处理24 h诱导其贴壁。用37℃预热的PBS冲洗细胞2次,换成无血清培养基过夜。8 μg pcDNA3.1-HA-ADRP表达载体或空白pcDNA3.1载体的DNA稀释于800 μL无血清培养基中,轻轻混匀。24 μL梭华-Sofast™稀释于800 μL无血清培养基中,轻柔混匀。800 μL梭华-Sofast™稀释液滴加到DNA稀释液中,一边滴加一边混匀,室温孵育15~20 min。将1.6 mL梭华-Sofast™/DNA复合物加入待转染的每瓶细胞中。37℃ CO₂培养箱孵育3 h,然后换成2 g/L BSA的培养基孵育48 h后再加入处理因素。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测酰基辅酶A:胆固醇酰基转移酶1及脂肪分化相关蛋白mRNA的表达

用Trizol试剂提取细胞总RNA,用ImProm-III™逆转录酶合成cDNA,以此cDNA为模板进行PCR反应。引物序列ADRP上游为5'-AGG GGC TAG ACA GGA TTG AGG AGA-3',下游为5'-ACG GGA GTG AAG CTT GGT AGA C-3',扩增片长436 bp;内参照GAPDH上游为5'-TCA CCA TCT TCC AG GAG CGA G-3',下游为5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-

3', 扩增片长 697 bp; ACAT1 上游为 5'-TAT TGC CCT CCT CAT TCT C-3', 下游为 5'-CIT CAT AGC GAC ATA ACC G-3', 扩增片长 259 bp。反应结束后, 取 RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳。电泳条带采用 UVP 凝胶图像分析系统(型号 GOS7500, 美国 UVP 公司)做积分吸光度测定和分析, 以各组目的基因与内参照基因吸光度值的比值来比较待测基因 mRNA 的表达差异。

1.6 Western blot 检测脂肪分化相关蛋白表达

待细胞处理结束后, 用预冷的 PBS 冲洗细胞 2~3 次, 加入 200 μ L 三去污裂解液(50 mmol/L Tris, pH8.0; 150 mmol/L NaCl; 0.02% 叠氮钠; 0.1% SDS; 1 mg/L Aprotinin; 1% NP40; 100 mg/L PMSF)并收集细胞。处理后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用 HA 或 β -actin 抗体为一抗行 Western blot 检测。

1.7 油红 O 染色观察细胞内中性脂质

参考文献[11]的方法, 细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 处理结束后, 油红 O 染色, 苏木素衬染。显微镜(日本 Olympus 公司)下观察, 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色, 摄像保存。

1.8 高效液相色谱分析细胞内胆固醇含量

参考文献[12]的方法, 待细胞处理结束后, 弃去培养基, PBS 洗 3 遍, 加入 0.1 mol/L NaOH 500 μ L, 反复冻融 3 次裂解细胞, 蛋白定量后, 7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白, 800 r/min 离心 10 min, 留上清进行胆固醇检测。以豆甾醇为内标并作标准曲线, 取 100 μ L 上清液, 加入 8.9 mol/L KOH 溶液 200 μ L, 水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇样品, 加 1 mol/L NaOH 200 μ L 为游离胆固醇样品。各样品分别与内标液混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 200 μ L 乙晴-一异丙醇(80:20)溶解样品, 上样于高效液相色谱仪(HPLC)。采用 C-18 柱, 柱温 4 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL/min, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以 g/g 细胞蛋白为单位。细胞内胆固醇酯含量为总胆固醇与游离胆固醇的差值。

1.9 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS11.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白影响脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 mRNA 表达

依据文献[13]确定 THP-1 巨噬细胞负荷胆固醇

酯的时间为 24 h, 把 THP-1 巨噬细胞与 0、10、20、40 和 80 mg/L ox-LDL 孵育 24 h 后, 结果发现, 随着 ox-LDL 浓度的增高, ADRP 及 ACAT1 的 mRNA 表达也随之增加, 而且 ADRP 及 ACAT1 mRNA 表达的增加存在伴行关系(表 1 和图 1)。

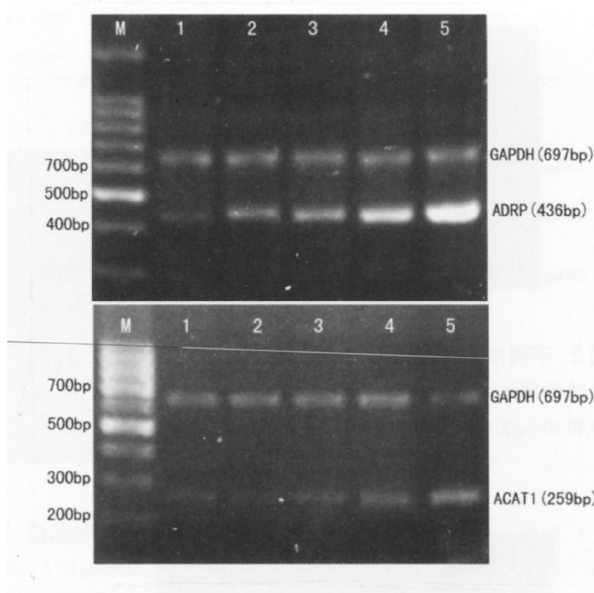


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 mRNA 表达的影响 M 为相对分子质量, 1、2、3、4 和 5 分别为 0、10、20、40 和 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理组。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白对脂肪分化相关蛋白及酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

ox-LDL 浓度(mg/L)	ADRP	ACAT1
0 (对照组)	0.93 $\pm$ 0.00	0.82 $\pm$ 0.00
10	0.98 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.01
20	1.02 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.01
40	1.09 $\pm$ 0.01	0.88 $\pm$ 0.01
80	1.24 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.02 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比。

2.2 丙泮尼地对酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达及细胞内胆固醇蓄积的影响

2.2.1 丙泮尼地对酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达的影响 THP-1 巨噬细胞与 80 mg/L ox-LDL 共孵育 24 h 后, 加入 0、2、5、10 和 20 mg/L 丙泮尼地处理 24 h, RT-PCR 观察 ACAT1 的表达, 结果表明, 随丙泮尼地浓度的增加, ox-LDL 引起的 ACAT1 表达上调逐渐受到抑制(吸光度值分别为 1.67 $\pm$ 0.08、1.43 $\pm$ 0.02、1.33 $\pm$ 0.03、0.99 $\pm$ 0.03 和 0.99 $\pm$ 0.00, $P < 0.05$), 在 10 mg/L 时, 对 ACAT1 表达的抑制

最为明显(图2)。然后用 10 mg/L 丙洋尼地分别处理细胞 0、3、6、12 和 24 h, 可以观察到随着处理时间的延长, ACAT1 的表达逐渐减少, 在 24 h 时间点, 其表达最低(图3)。所以, 后面的实验均采用 10 mg/L 丙洋尼地处理细胞 24 h。

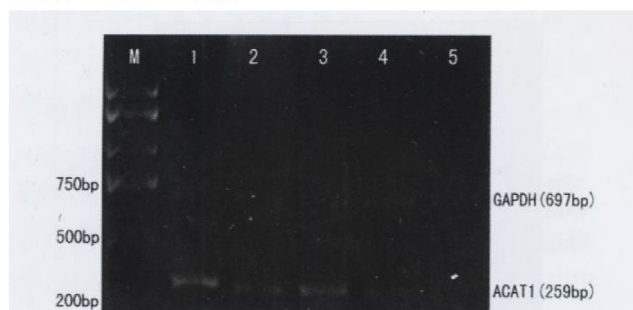


图2. 不同浓度丙洋尼地对酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达的影响 M 为相对分子质量, 1、2、3、4 和 5 分别为 0、2、5、10 和 20 mg/L 丙洋尼地处理组。

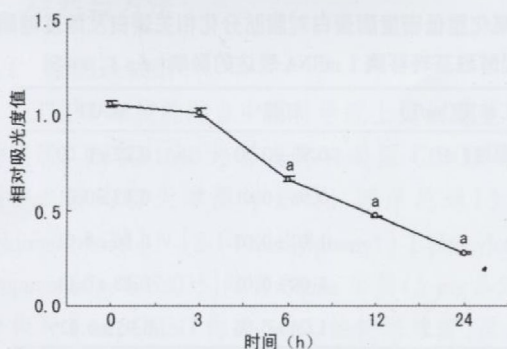
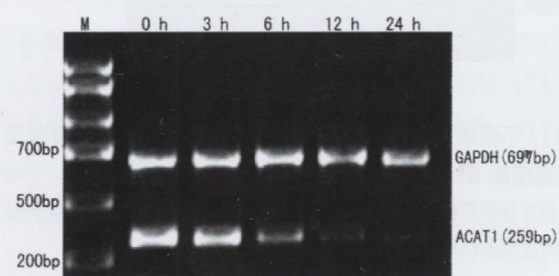


图3. 10 mg/L 丙洋尼地处理细胞不同时间对酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 比。

2.2.2 丙洋尼地对细胞内胆固醇酯蓄积的影响

THP-1 巨噬细胞与 80 mg/L ox-LDL 共孵育 24 h 后, 再与 10 mg/L 丙洋尼地孵育 0 或 24 h, 油红 O 染色发现, 与 ox-LDL 孵育后(丙洋尼地处理 0 h)细胞内中性脂质明显增多(图4A); 与丙洋尼地孵育 24 h 后, 细胞内中性脂质明显减少(图4B), 表明丙洋尼地对细胞内脂质蓄积有明显抑制作用。

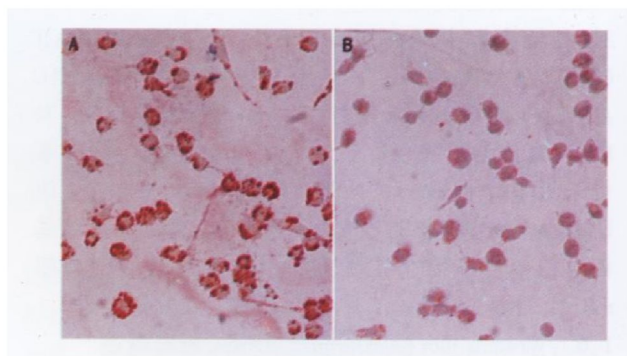


图4. 丙洋尼地处理对 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响(10 × 40) A 为处理 0 h 组, B 为处理 24 h 组。

2.3 高表达脂肪分化相关蛋白 THP-1 巨噬细胞中酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 表达及细胞内胆固醇的变化

Western blot 检测转染后 ADRP 的表达, 结果发现, pcDNA3.1-HA-ADRP 转染可明显上调 ADRP 的表达水平(图5)。转染 pcDNA3.1-HA-ADRP 后, 再顺次使用 80 mg/L ox-LDL 及 10 mg/L 丙洋尼地各处理 24 h, 结果发现, 各转染组加入 ox-LDL 后, ACAT1 的表达均有上调, 其中 pcDNA3.1-HA-ADRP 转染组表达最高; 不使用 ox-LDL 处理的各组, pcDNA3.1-HA-ADRP 转染能上调 ACAT1 表达, 加入 ACAT 抑制剂丙洋尼地后, 这种上调作用受到抑制; 而作为对照的 pcDNA3.1 转染组对 ACAT1 表达无影响(表2和图6)。

使用 HPLC 观察高表达 ADRP 后对细胞内胆固醇酯的变化, 与各自的未加 ox-LDL 组相比, 加入 ox-LDL 后, 细胞内胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)/总胆固醇(total cholesterol, TC)比值均有明显增加, 其中 pcDNA3.1-HA-ADRP 转染组增加幅度最大; 有趣的是在不加 ox-LDL 的情况下, 高表达 ADRP 的细胞内 CE/TC 最大, 加入丙洋尼地后, 这种作用受到抑制。作为对照的 pcDNA3.1 转染组不影响细胞内脂质蓄积(表2)。

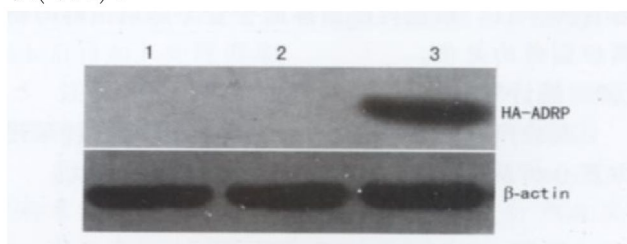


图5. pcDNA3.1-HA-ADRP 转染 THP-1 巨噬细胞后脂肪分化相关蛋白表达的改变 1 为对照组, 2 为 pcDNA3.1 转染组, 3 为 pcDNA3.1-HA-ADRP 转染组。

表 2. 高表达脂肪分化相关蛋白的 THP-1 巨噬细胞中酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 的表达和胆固醇酯/总胆固醇的比值

分 组	ACAT1(<i>n</i> = 3)		CE/TC(<i>n</i> = 5)	
	未加 ox-LDL	加 ox-LDL	未加 ox-LDL	加 ox-LDL
空白对照组	1.31 ± 0.03	2.13 ± 0.07 ^b	41.2 ± 5.6	60.5 ± 4.3 ^b
pcDNA3.1 组	1.37 ± 0.04	2.24 ± 0.08 ^b	42.1 ± 3.6	61.7 ± 5.5 ^b
pcDNA3.1-HA-ADRP 组	1.95 ± 0.06 ^a	3.02 ± 0.10 ^{ab}	55.3 ± 4.7 ^a	75.8 ± 4.0 ^{ab}
pcDNA3.1-HA-ADRP+ 丙泮尼地组	1.67 ± 0.06 ^a	2.38 ± 0.10 ^{ab}	48.9 ± 5.1 ^a	67.7 ± 6.0 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与未加 ox-LDL 组比。

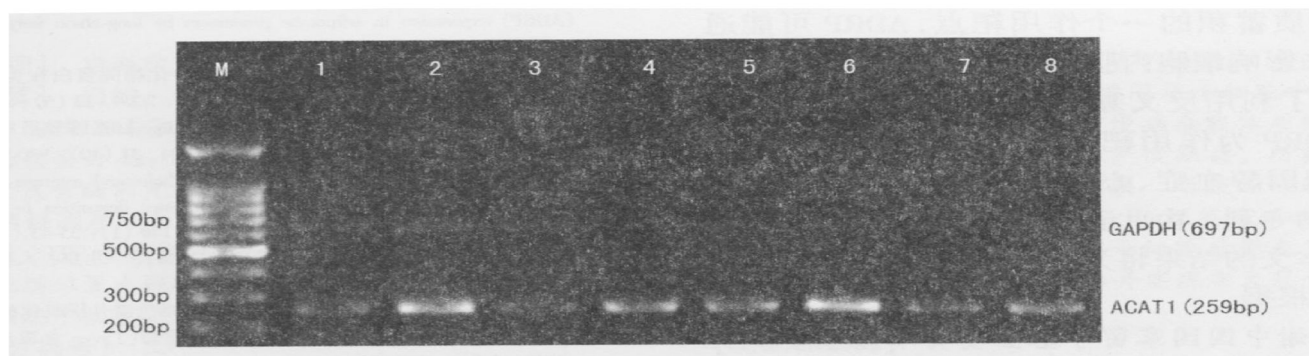


图 6. 高表达脂肪分化相关蛋白的 THP-1 巨噬细胞中酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 表达的改变 M 为相对分子质量, 1 为空白对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 pcDNA3.1 组, 4 为 ox-LDL+ pcDNA3.1 组, 5 为 pcDNA3.1-HA-ADRP 组, 6 为 ox-LDL+ pcDNA3.1-HA-ADRP 组, 7 为 pcDNA3.1-HA-ADRP+ 丙泮尼地组, 8 为 ox-LDL+ pcDNA3.1-HA-ADRP+ 丙泮尼地组。

3 讨论

脂肪分化相关蛋白(ADRP)与泡沫细胞形成关系密切, Larigauderie 等^[14]发现, 高表达 ADRP 的 THP-1 巨噬细胞与 100 mg/L 乙酰化 LDL 共孵育后 48 h, 细胞内三酰甘油及胆固醇分别上升 43% 和 67%。用小干扰 RNA 使 ADRP 表达降低后, 两者的蓄积均明显下降。但是, ADRP 促使泡沫细胞形成是通过胆固醇代谢通路上的哪个环节而发生作用的尚不清楚。

本实验发现, 随着 ox-LDL 浓度的不断增加, THP-1 巨噬细胞中 ADRP 及 ACAT1 的 mRNA 水平也随之上调, 二者存在平行关系。实验表明丙泮尼地能有效抑制巨噬细胞中 ACAT 参与的脂质蓄积^[15]。丙泮尼地处理荷脂 THP-1 巨噬细胞 24 h, 随着浓度增高, ox-LDL 诱导的 ACAT1 表达上调逐渐受到抑制, 且随处理时间延长, ACAT1 表达逐渐减少。油红 O 染色发现, 它还能有效抑制细胞内脂质蓄积。

为了研究 ADRP 能否调控 ACAT1, 我们使 THP-1 巨噬细胞高表达 ADRP, 加入 ox-LDL 后, 发现 ACAT1 表达大幅增加。这种现象的产生存在几种可能性: 第一, ADRP 通过协同促进 ox-LDL 诱导的脂质蓄积, 使作为 ACAT1 底物的细胞内胆固醇净含量增加, 因而促进 ACAT1 表达。第二, ADRP 自身就能上调

ACAT1 表达。第三, 以上两种因素都起到了作用。对照组的结果似乎更支持第三种可能性。同为高表达 ADRP 组, 加入 ox-LDL 后, 其 ACAT1 上升幅度较单纯加入 ox-LDL 要大, 提示 ADRP 与 ox-LDL 存在协同效应。而与空白对照组比, 不与 ox-LDL 孵育的高表达 ADRP 细胞也能上调 ACAT1 表达, 提示 ADRP 上调 ACAT1 表达不依赖细胞内胆固醇含量, 其自身就有这种作用。空白对照组与空质粒转染组比, 无论是否存在 ox-LDL, ACAT1 的表达差异都无显著性, 说明 pcDNA3.1 转染对 ACAT1 的表达没有影响, pcDNA3.1-HA-ADRP 转染组上调 ACAT1 表达是由外源性 ADRP 基因引起的, 而与转染试剂及载体无关。令人感兴趣的是, 在丙泮尼地存在的情况下, 高表达 ADRP 的细胞无论是否与 ox-LDL 孵育, ACAT1 的表达都是下调的。这一现象支持 ADRP 为 ACAT1 上游调控基因的假设。因为高表达 ADRP 可上调 ACAT1 表达, 表明 ADRP 有调控 ACAT1 表达的能力, 而使用 ACAT 抑制剂后, 转染引起的上调即受到抑制, 表明 ADRP 的这种调控作用位于 ACAT 抑制剂作用点的上游, 即 ADRP 可能为 ACAT1 上游调控基因。

高表达 ADRP 后, THP-1 巨噬细胞内脂质也发生了变化。加入 ox-LDL 后, 细胞内 CE/TC 值有明显

增加,其中又以高表达 ADRP 组增加幅度最大。即使是不加入 ox-LDL,高表达 ADRP 也能增加细胞内胆固醇酯的量,表明 ADRP 自身也能促进细胞内的脂质蓄积。使用丙炔尼地后,无论是否存在 ox-LDL,高表达 ADRP 的细胞内胆固醇酯均下降。该结果进一步支持 ADRP 可能为 ACAT1 上游调控基因这一假设。

综合实验结果,ACAT1 可能是 ADRP 促 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的一个作用靶点,ADRP 可能通过 ACAT1 来影响细胞内脂质代谢。目前,已有研究者^[16,17]申请了利用反义寡核苷酸和小干扰 RNA 技术,针对 ADRP 为作用靶点,治疗 ADRP 相关疾病(如 As、高胆固醇血症、心肌梗死、脑缺血及外周血管疾病等)的专利。由此看来,ADRP 正成为防治 As 的新靶点,本文的结果将为 As 的发病机制和治疗提供新的理论根据。

[致谢] 感谢中国国家留学基金委对本文的完成提供生活上的帮助。感谢美国北卡罗来纳大学医学院卡罗来纳心血管生物学中心 Runge 实验室对本文部分工作的完成提供实验场所和仪器。

[参考文献]

- [1] 杨永宗,阮长耿,唐朝枢,等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004; 51-52.
- [2] Liu P, Ying Y, Zhao Y, et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (5): 3 787-792.
- [3] Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (46): 44 507-512.
- [4] Wang X, Reape TJ, Li X, et al. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions [J]. *FEBS Lett*, 1999, **462** (1-2): 145-150.
- [5] Chang C, Dong R, Miyazaki A, et al. Human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its potential as a target for pharmaceutical intervention against atherosclerosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2006, **38** (3): 151-156.
- [6] Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, et al. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (8): 1 711-717.
- [7] Gao J, Ye H, Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids [J]. *J Cell Physiol*, 2000, **182** (2): 297-302.
- [8] 袁中华, 杨永宗, 尹卫东, 等. 脂肪分化相关蛋白在兔动脉粥样硬化模型中的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (5): 529-532.
- [9] 袁中华, 杨永宗, 尹卫东, 等. 反义 adipophilin 寡核苷酸降低 ACAT 活性[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31** (10): 930-935.
- [10] Yu H, Gutman RL, Ryu BH, et al. Cholesteryl esterase-treated LDL augments oxidized LDL-mediated cholesteryl ester deposition in mouse peritoneal macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **140** (1): 35-43.
- [11] 杜卓明. 实用组织学技术(第2版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998; 312-313.
- [12] 王佐, 李全忠, 杨向东, 等. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯[J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, **6** (4): 317-320.
- [13] 王中群, 杨永宗, 王佐, 等. 蛋白激酶 C 活性变化对 adipophilin 介导 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34** (10): 1 055-064.
- [14] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 504-510.
- [15] Gaus K, Kritharides L, Schmitz G, et al. Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages [J]. *Faseb J*, 2004, **18** (3): 574-576.
- [16] Dobie KW. Modulation of adipophilin expression [P]. USA: PCT/US2003/039261, 2004-06-24.
- [17] Larigauderie G. Methods for screening compounds modulating cholesterol flux and uses thereof [P]. France: PCT/FR2003/003303, 2004-06-03.

(此文编辑 许雪梅)