

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0435-04

· 实验研究 ·

## $\beta$ 受体介导肾上腺素对 THP-1 源性巨噬细胞 清道夫受体 AI 与 ABCA1 基因表达的影响

张恺芳<sup>1</sup>, 郭小芳<sup>2</sup>, 张彩平<sup>2</sup>, 田 英<sup>2</sup>

(南华大学 1. 医学院生理学教研室, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 肾上腺素; THP-1 细胞; 清道夫受体 AI; ATP 结合盒转运体 A1;  $\beta$  受体肾上腺素

[摘要] 目的 探讨肾上腺素对 THP-1 源性巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 与清道夫受体 AI mRNA 表达影响的  $\beta$  受体介导作用。方法 分别用  $\beta$ 1 受体拮抗剂美托洛尔(10 nmol/L~100  $\mu$ mol/L)和  $\beta$ 2 受体拮抗剂丁氧胺(2.5 nmol/L~25  $\mu$ mol/L)预处理细胞 1 h,再加入终浓度为 1  $\mu$ mol/L 肾上腺素继续孵育 24 h,检测受试基因的表达。结果 1  $\mu$ mol/L 的肾上腺素上调清道夫受体 AI mRNA 水平和下调 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平,与各自对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而终浓度为 1  $\mu$ mol/L 肾上腺素分别与不同浓度的  $\beta$  肾上腺素能受体拮抗剂美托洛尔和丁氧胺联合使用时,随着美托洛尔和丁氧胺浓度加大,各组 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的表达升高而清道夫受体 AI mRNA 的表达随浓度升高呈下降趋势,与 1  $\mu$ mol/L 肾上腺素组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且丁氧胺对肾上腺素的拮抗作用在 2.5  $\mu$ mol/L 达到平台期。结论 肾上腺素可能通过  $\beta$ 1 和  $\beta$ 2 肾上腺素能受体介导从而上调 THP-1 源性巨噬细胞清道夫受体 AI mRNA 水平和下调 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Adrenaline on Scavenger Receptor AI mRNA and ATP Binding Cassette Transporter A1 mRNA Expression in THP-1-derived Macrophages Mediated by Beta-adrenoceptor

ZHANG Kai-Fang<sup>1</sup>, GUO Xiao-Fang<sup>2</sup>, ZHANG Cai-Ping<sup>2</sup>, and TIAN Ying<sup>2</sup>

(1. Department of Physiology, 2. Department of Biochemistry &amp; Molecular Biology, the Medical College of University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Adrenaline; THP-1 cells; Scavenger Receptor AI; ATP Binding Cassette Transporter A1; Beta-Adrenoceptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of adrenaline on the expression of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA and scavenger receptor AI (SR-AI) mRNA in THP-1 macrophages and to identify its possible mechanism mediated by  $\beta$ -adrenoceptor. **Methods** THP-1 derived macrophages were preincubated for an hour with a  $\beta$ 1-adrenoceptor antagonist metoprolol (10 nmol/L to 100  $\mu$ mol/L) and a  $\beta$ 2-adrenoceptor antagonist butoxamine (2.5 nmol/L to 25  $\mu$ mol/L), respectively, before treatment with 1  $\mu$ mol/L adrenaline for 24 h. Then ABCA1 and SR-AI mRNA expression were determined by RT-PCR. **Results** RT-PCR analysis showed that compared with control (without adrenaline), 1  $\mu$ mol/L adrenaline significantly decreased ABCA1 mRNA expression and significantly increased SR-AI mRNA expression ( $P < 0.05$ ). These stimulatory effects of adrenaline on ABCA1 mRNA and SR-AI mRNA expression in THP-1 macrophages were reversed by the  $\beta$ 1-adrenoceptor antagonist metoprolol or the  $\beta$ 2-adrenoceptor antagonist butoxamine in a concentration-dependent manner. Furthermore, the effect of the  $\beta$ 2-adrenoceptor antagonist butoxamine reached a platform at the concentration of 2.5  $\mu$ mol/L. **Conclusion** Adrenaline up-regulates SR-AI mRNA expression and down-regulates ABCA1 mRNA expression, probably being mediated via  $\beta$ 1-adrenoceptor or  $\beta$ 2-adrenoceptor activation.

心理社会应激在现代社会人群中普遍存在,流行病学调查研究表明,大约 40% 的动脉粥样硬化

(atherosclerosis, As) 患者,没有传统的危险因素如吸烟、高血压、糖尿病、冠心病家族史等,其发病与心理社会因素密切相关<sup>[1]</sup>。应激性激素如包括肾上腺素(adrenaline, AD)在内的儿茶酚胺类激素可能是应激与心血管疾病之间联系的关键纽带<sup>[2]</sup>。泡沫细胞的形成是 As 发生发展的核心环节,胆固醇代谢失衡贯穿于泡沫细胞形成的整个过程。研究表明,巨噬细胞 A 类清道夫受体(scavenger receptor AI, SR-AI)在 As 泡沫细胞形成中起到重要作用<sup>[3]</sup>,ATP

[收稿日期] 2008-10-12 [修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 湖南省教育厅基金项目(07C632)

[作者简介] 张恺芳,硕士,副教授,从事脂蛋白与动脉粥样硬化的研究, E-mail 为 kfzhang2004@hotmail.com。郭小芳,硕士。张彩平,硕士,讲师,从事脂蛋白与动脉粥样硬化的研究。通讯作者田英,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化的研究, E-mail 为 tianying@nhu.edu.cn。

结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 是介导细胞内胆固醇流出的重要调节蛋白<sup>[46]</sup>。本实验探讨一定浓度的肾上腺素影响巨噬细胞胆固醇转运相关基因 SR-A1 与 ABCA1 表达的  $\beta$  受体介导作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

THP-1 人单核细胞 (ACTT, TIB-202) 由中国科学院上海细胞库提供; 逆转录多聚酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品; 佛波酯、美托洛尔 (metoprolol) 和丁氧胺为 Sigma 公司产品; Trizol 为 Invitrogen 公司产品; 2XTaq PCR MasterMix 为北京天为时代公司产品; ABCA1、SR-A1 和 GAPDH 引物均由上海生物工程公司合成; 其他试剂均为进口或国产分析纯。2300 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (SHELLAB 公司), 天能紫外凝胶拍摄仪 (上海天能公司), 梯度 PCR 仪 (Eppendorf 公司), 蛋白质/核酸分析仪 (BECKMEN COULTER)。

### 1.2 细胞培养及分化

THP-1 单核细胞用含有 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。培养液中加入青霉素和链霉素各  $1.0 \times 10^5$  IU/L, 在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯培育 THP-1 细胞 ( $1 \times 10^7$  个细胞/瓶) 72 h, 诱导使其分化成巨噬细胞。

### 1.3 $\beta$ 受体拮抗剂对巨噬细胞表达清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 的影响观察

THP-1 细胞分化为巨噬细胞后, PBS 洗涤细胞, 更换为含不同受体拮抗剂的无血清培养液孵育 24 h, 收集细胞进行检测。每次实验设复孔, 实验重复 6 次。加入  $\beta_1$  受体拮抗剂美托洛尔或  $\beta_2$  受体拮抗剂丁氧胺的细胞各分为 6 组, 除对照组外, 其他各组分别加入浓度为 10、100 nmol/L、1、10、100  $\mu$ mol/L 美托洛尔或 2.5、25 nmol/L、0.25、2.5、25  $\mu$ mol/L 丁氧胺。

### 1.4 $\beta$ 受体拮抗剂与肾上腺素合用对巨噬细胞表达清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 的影响观察

THP-1 细胞分化为巨噬细胞后, PBS 洗涤细胞, 更换为含不同受体拮抗剂的无血清培养液, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中预孵育 1 h 后, 再加入浓度为 1  $\mu$ mol/L 的肾上腺素孵育 24 h, 收集细胞进行检测。每次实验设复孔, 实验重复 6 次。联合作用的细胞分为 7 组, 除对照组外, 其他各组分别加入

浓度为 1  $\mu$ mol/L AD 及  $\beta_1$  受体拮抗剂美托洛尔 0、10、100 nmol/L、1、10、100  $\mu$ mol/L; 或者分别加入 1  $\mu$ mol/L AD 及  $\beta_2$  受体拮抗剂丁氧胺 0、2.5、25 nmol/L、0.25、2.5、25  $\mu$ mol/L。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测

收集各组细胞。按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 1  $\mu$ g 各组细胞总 RNA 按 Promega 公司试剂盒说明逆转录合成 cDNA, 再取 1  $\mu$ L 逆转录产物进行 PCR 扩增。PCR 扩增的条件为: 94℃ 温育 4 min → 94℃ 变性 1 min → 60℃ (GAPDH)、59℃ (SR-AI) 和 63℃ (ABCA1) 复性 1 min → 72℃ 延伸 1 min, GAPDH 28 个循环, SR-AI 和 ABCA1 各 34 个循环, 末次循环后 72℃ 再延伸 10 min。SR-AI 的引物序列为上游 5'-CTC CTG AAG TGG GAA ACG AAG-3', 下游 5'-GAG GTT GGC TTC CAT GTC TAA-3', 扩增产物长度为 183 bp。ABCA1 的引物序列为上游 5'-TAA ACG CCC TCA CCA AAG AC-3', 下游 5'-AGC CGC CAT ACC TAA ACT CA-3', 扩增产物长度为 390 bp。GAPDH 的引物序列为上游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 下游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 扩增产物长度为 696 bp。反应结束后, 取反应产物 5  $\mu$ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表各基因表达的相对变化。

### 1.6 统计学处理

实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 经方差齐性检验后, 采用单因素方差分析或 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。统计软件用 SPSS11.0。

## 2 结果

### 2.1 $\beta$ 受体拮抗剂对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响

2.1.1  $\beta_1$  受体拮抗剂美托洛尔的影响 10 nmol/L ~ 100  $\mu$ mol/L 的美托洛尔作用 THP-1 源巨噬细胞 24 h, 各组 SR-AI 表达与对照组比较差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ); 各组 ABCA1 mRNA 表达与对照组比较差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ; 图 1, 表 1)。

2.1.2  $\beta_2$  受体拮抗剂丁氧胺的影响 2.5 nmol/L ~ 25  $\mu$ mol/L 的丁氧胺作用 THP-1 源性巨噬细胞 24 h, 各组 SR-AI 表达与对照组比较差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ); 各组 ABCA1 mRNA 表达与对照组比较差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ; 图 2, 表 1)。

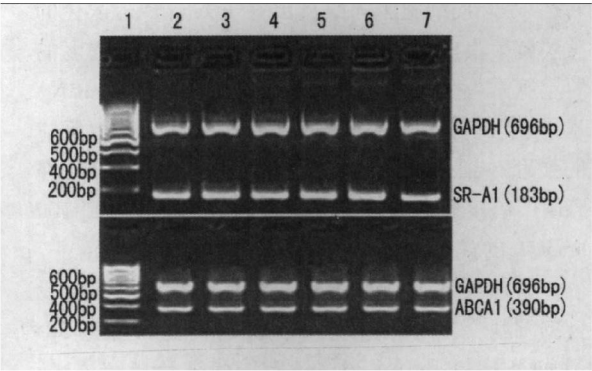


图 1. 美托洛尔对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响 1 为标准品,2 为对照组,3 为 10 nmol/L 美托洛尔组,4 为 100 nmol/L 美托洛尔组,5~7 为 1、10、100 μmol/L 美托洛尔组。

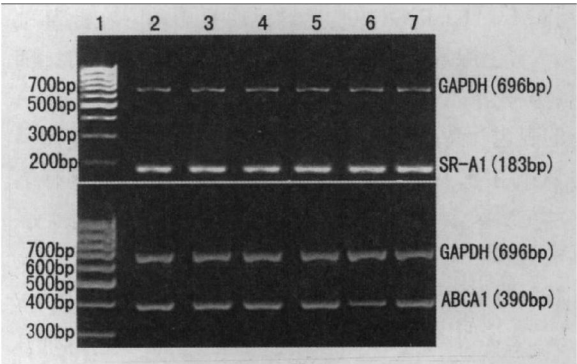


图 2. 丁氧胺对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响 1 为标准品,2 为对照组,3 为 2.5 nmol/L 丁氧胺组,4 为 25 nmol/L 丁氧胺组,5 为 250 nmol/L 丁氧胺组,6 为 2.5 μmol/L 丁氧胺组,7 为 25 μmol/L 丁氧胺组。

表 1. 美托洛尔与丁氧胺对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	SR-AI	ABCA1
美托洛尔对照组	0.86 ± 0.04	1.02 ± 0.05
10 nmol/L 美托洛尔	0.89 ± 0.03	1.04 ± 0.08
100 nmol/L 美托洛尔	0.84 ± 0.04	1.04 ± 0.10
1 μmol/L 美托洛尔	0.89 ± 0.03	1.08 ± 0.04
10 μmol/L 美托洛尔	0.85 ± 0.07	1.04 ± 0.08
100 μmol/L 美托洛尔	0.83 ± 0.05	1.09 ± 0.05
丁氧胺对照组	0.98 ± 0.16	0.91 ± 0.07
2.5 nmol/L 丁氧胺	0.97 ± 0.12	0.90 ± 0.06
25 nmol/L 丁氧胺	0.98 ± 0.14	0.90 ± 0.06
250 nmol/L 丁氧胺	0.97 ± 0.11	0.91 ± 0.04
2.5 μmol/L 丁氧胺	0.99 ± 0.13	0.89 ± 0.07
25 μmol/L 丁氧胺	1.00 ± 0.19	0.91 ± 0.06

2.2 受体拮抗剂与肾上腺素联合作用对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响

2.2.1 美托洛尔的影响 在 1 μmol/L 的肾上腺素作用前将 THP-1 源性巨噬细胞与 10 nmol/L ~ 100 μmol/L 的 β1 受体拮抗剂美托洛尔预孵育 1 h。结果发现,随美托洛尔浓度加大各组 SR-AI mRNA 的表达随美托洛尔浓度升高而呈下降趋势;ABCA1 mRNA 的表达随美托洛尔浓度升高而逐渐上升,与 1 μmol/L 肾上腺素组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 3 和表 2)。

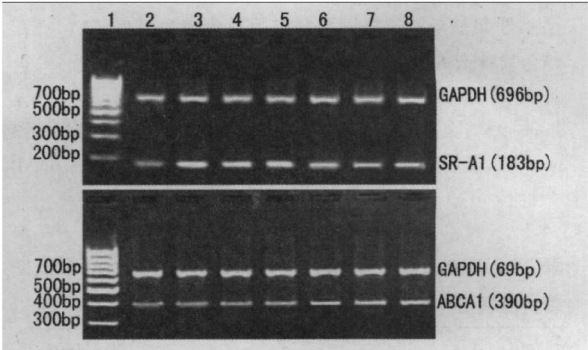


图 3. 美托洛尔与肾上腺素联合作用对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响 1 为标准品,2 为空白对照组,3 为 AD 对照组,4 为 AD + 10 nmol/L 美托洛尔组,5 为 AD + 100 nmol/L 美托洛尔组,6 为 AD + 1 μmol/L 美托洛尔,7 为 AD + 10 μmol/L 美托洛尔组,8 为 AD + 100 μmol/L 美托洛尔组,其中 3~8 组所加 AD 浓度均为 1 μmol/L。

表 2. 美托洛尔与肾上腺素联合作用对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	SR-AI	ABCA1
空白对照组	0.85 ± 0.09	1.09 ± 0.07
AD 对照组	0.95 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.04 <sup>b</sup>
AD + 10 nmol/L 美托洛尔	0.94 ± 0.12	0.96 ± 0.05
AD + 100 nmol/L 美托洛尔	0.93 ± 0.16	0.97 ± 0.06 <sup>c</sup>
AD + 1 μmol/L 美托洛尔	0.90 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.04 <sup>d</sup>
AD + 10 μmol/L 美托洛尔	0.88 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.03 ± 0.07 <sup>d</sup>
AD + 100 μmol/L 美托洛尔	0.87 ± 0.08 <sup>d</sup>	1.04 ± 0.07 <sup>d</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较;c 为  $P < 0.05$ ,d 为  $P < 0.01$ ,与 AD 对照组比较。所加 AD 浓度均为 1 μmol/L。

2.2.2 丁氧胺的影响 随丁氧胺浓度加大各组 SR-AI mRNA 的表达随丁氧胺浓度升高而呈下降趋势,ABCA1 mRNA 的表达随丁氧胺浓度升高而逐渐上升,与 1 μmol/L 肾上腺素组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 4 和表 3)。

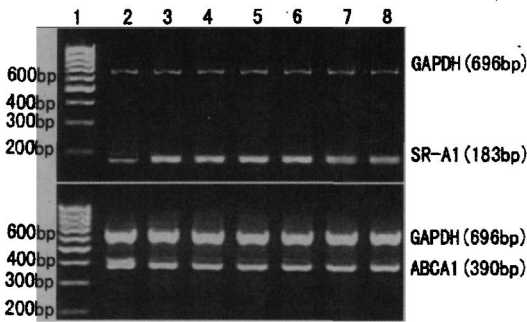


图4. 丁氧胺与肾上腺素联合作用对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响 1 为标准品,2 为空白对照组,3 为 AD 对照组,4 为 AD+2.5 nmol/L 丁氧胺组,5 为 AD+25 nmol/L 丁氧胺组,6 为 AD+250 nmol/L 丁氧胺组,7 为 AD+2.5 μmol/L 丁氧胺组,8 为 AD+25 μmol/L 丁氧胺组,其中 3~8 组 AD 浓度均为 1 μmol/L。

表3. 丁氧胺与肾上腺素联合作用对清道夫受体 AI 和 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	SR-AI	ABCA1
空白对照组	0.90 ± 0.07	1.11 ± 0.09
AD 对照组	1.06 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.94 ± 0.03 <sup>b</sup>
AD+2.5 nmol/L 丁氧胺	1.06 ± 0.12	0.94 ± 0.05
AD+25 nmol/L 丁氧胺	1.05 ± 0.17	0.95 ± 0.06
AD+250 nmol/L 丁氧胺	1.04 ± 0.14 <sup>c</sup>	0.96 ± 0.04 <sup>c</sup>
AD+2.5 μmol/L 丁氧胺	1.03 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.97 ± 0.08 <sup>d</sup>
AD+25 μmol/L 丁氧胺	1.03 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.97 ± 0.07 <sup>d</sup>

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与空白对照组比较; c 为  $P<0.05$ , d 为  $P<0.01$ , 与 AD 对照组比较。所加 AD 浓度均为 1 μmol/L。

3 讨论

肾上腺素是心理社会应激时交感-肾上腺髓质系统激活后,由肾上腺髓质的嗜铬细胞合成释放入血的儿茶酚胺类激素,可使血浆脂质浓度升高,在应激时出现致 As 脂质相改变<sup>[7]</sup>,从而促进 As 的发展。As 是一个多因素参与、多基因异常调控的复杂病理过程。泡沫细胞的形成是 As 发生发展的核心环节。巨噬细胞清道夫受体被认为在 As 性泡沫细胞形成中起到了重要作用。已鉴定的巨噬细胞清道夫受体主要有两种,即 A 类和 B 类清道夫受体。SR-A 是一种细胞表面的糖蛋白,广泛分布于巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞等处,具有多种生物学功能,并在 As 斑块的发生、发展中起重要作用<sup>[3]</sup>。ABCA1 是一种整合膜蛋白,它以 ATP 为能源,促进细胞内游离胆固醇和磷脂转运至载脂蛋白 A1,形成新生的高密度脂蛋白,实现胆固醇的跨膜

转运,是外周细胞胆固醇流出并进入逆转运途径的重要调节蛋白<sup>[4,6]</sup>。作者以往结果表明一定浓度的肾上腺素可上调 THP-1 源性巨噬细胞 SR-AImRNA 水平,下调其 ABCA1mRNA 水平,并提示应激反应的强度对细胞功能的影响。而国外有人报导,在 THP-1 单核细胞的体外培养实验中,浓度达到 100 nmol/L 的肾上腺素能显著诱导核因子 B 的激活<sup>[8]</sup>。

研究表明,巨噬细胞是一类有 β 肾上腺素能受体的细胞<sup>[9]</sup>。因此,为进一步探讨肾上腺素对 SR-AI 和 ABCA1 mRNA 表达影响的受体介导作用,作者选用了 β1 受体拮抗剂美托洛尔和 β2 受体拮抗剂丁氧胺,观察分别阻断相应受体后肾上腺素对受试基因表达影响的改变情况。结果表明不同浓度的肾上腺素能受体拮抗剂美托洛尔和丁氧胺对 SR-AI 和 ABCA1 mRNA 的表达均无明显影响。在此基础上,肾上腺素分别与 β 受体拮抗剂联合作用时,随着美托洛尔和丁氧胺浓度加大,各组 ABCA1 mRNA 的表达升高而 SR-AI mRNA 的表达随浓度升高而呈下降趋势,与 1 μmol/L 肾上腺素组比较差异具有统计学意义,表明美托洛尔和丁氧胺均能拮抗肾上腺素对 SR-AI 和 ABCA1 mRNA 表达的影响。且丁氧胺对肾上腺素的拮抗作用在 2.5 μmol/L 达到平台期,这说明随着丁氧胺浓度增高到一定程度时,所有的 β2 受体都与该配体分子结合,即达到饱和。本实验表明肾上腺素上调 THP-1 源巨噬细胞 SR-AI mRNA 水平和下调 ABCA1 mRNA 水平,可能通过 β1 和 β2 肾上腺素能受体介导。

[参考文献]

[1] Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy [J]. *Circulation*, 1999, 99 (16): 2 192-217.

[2] Mancía G, Bousquet P, Elghozi JL, et al. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome [J]. *Hypertension*, 2007, 25 (5): 909-920.

[3] Menno PJ, Ko Willems van Dijk, Louis MH, et al. Macrophages scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (2): 290-297.

[4] Oram JF, Lawn RM. ABC-A1, the gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol [J]. *Lipid Res*, 2001, 42 (8): 1 173-179.

[5] 唐朝克, 易光辉, 唐国华, 等. ATP 结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (4): 304-308.

[6] Cavellier C, Lorenzi I, Rohrer L, et al. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1 761 (7): 655-666.

[7] Stoney CM, Bauserman L, Niaura R, et al. Lipid reactivity to stress: II. Biological and behavioral influences [J]. *Health Psychol*, 1999, 18 (3): 251-261.

[8] Angelika Bierhaus, Jutta Wolf, Martin Andrassy, et al. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation [J]. *PNAS*, 2003, 100 (4): 1 920-925.

[9] 刘正湘. 实用心血管受试学[M]. 北京: 科学出版社, 2001:106-141. (此文编辑 李玲玲)