

THP-1源性巨噬细胞泡沫化过程中肝 X受体- α 乙酰化修饰改变与 SIRT1有关

张弛¹, 黄靓², 屈顺林¹, 韦星¹, 唐志晗¹, 余美华¹

(南华大学 1. 心血管病研究所动脉硬化化学湖南省重点实验室; 2 外科学总论教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] THP-1 源性巨噬细胞; 肝 X受体- α ; SIRT1; 乙酰化修饰; 泡沫细胞

[摘要] 目的 为研究 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中, SIRT1与肝 X受体- α 是否发生相互作用、肝 X受体- α 的乙酰化修饰如何改变及其与细胞内胆固醇含量的关系。方法 采用体外培养的 THP-1 细胞构建泡沫细胞模型, 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量的变化, 免疫共沉淀检测肝 X受体- α 与 SIRT1是否结合, 免疫印迹法检测肝 X受体- α 的乙酰化修饰改变及 SIRT1的表达改变。结果 在氧化低密度脂蛋白诱导细胞分化 12、24 h和 48 h后, 细胞内胆固醇含量增加, SIRT1与肝 X受体- α 共沉降, 去乙酰化的肝 X受体- α 蛋白水平升高, SIRT1蛋白的表达增加。结论 THP-1 源性泡沫细胞形成过程中, 肝 X受体- α 与 SIRT1存在相互作用, 肝 X受体- α 的乙酰化修饰逐渐降低, 其机制与 SIRT1的水平升高有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Level of LXR- α Acetylation During THP-1 Macrophages Foam-cell Formation

ZHANG Ch¹, HUANG Liang², QU Shun-Lin¹, WEI Xing¹, TANG Zhi-Han¹, and SHE Mei-Hua¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province; 2. Department of Operative Surgery, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] THP-1 Macrophages; Liver X Receptor- α ; SIRT1; Acetylation; Foam-cell

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether SIRT1 interacts with liver X receptor- α , the level of liver X receptor- α acetylation and the relationship between liver X receptor- α acetylation and intracellular cholesterol content during THP-1 macrophages foam-cell formation. **Methods** THP-1 macrophages were used to build foam-cell model, the changes of intracellular cholesterol content was detected by high performance liquid chromatography, the level of liver X receptor- α acetylation, the level of SIRT1 expression, and the interaction between liver X receptor- α and SIRT1 were detected by western blot and co-immunoprecipitation respectively. **Results** After oxidized low-density lipoprotein treated for 12 h, 24 h, 48 h, the cellular cholesterol content of THP-1 macrophages cell was increased gradually, SIRT1 interact with liver X receptor- α , liver X receptor- α acetylation decreased, whereas SIRT1 expression increased. **Conclusion** During THP-1 macrophages foam-cell formation, decreased level of acetylated liver X receptor- α was related to up-regulated expression of SIRT1.

肝 X受体- α (liver X receptor, LXR- α)属于核受体超家族成员, LXR在胆固醇逆向转运过程中起到重要的作用^[1,2]。它与靶基因上游的 LXR反应元件 (LXR response element, LXRE)结合, 调节特定基因的表达, 通过胆固醇逆向转运, 由高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)将外周组织中的胆固醇酯携带进入肝脏以胆汁酸的形式排出体外, 因而促进巨噬细胞的胆固醇流出, 阻止泡沫细胞的形

成。通过周围细胞的固醇流出, 增加高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), 从而维持机体正常的胆固醇平衡。沉默信息调节因子 2 (silent information regulator 2, SIR2)首先发现于酵母细胞, 其功能与酵母交配型基因沉默、端粒区基因沉默和重组, 基因的稳定性, 及物质代谢和长寿有着很大的关系, 进一步研究发现 SIR2在转录调节过程中具有关键的催化作用即组蛋白去乙酰化酶活性。SIRT1是 SIR2在哺乳动物中的同源基因, 能够使一些非组蛋白的转录因子底物, 如过氧化物酶体增生物激活受体 γ ^[3]、过氧化物酶体增生物激活受体 γ 共激活物 1等^[4]去乙酰化。因此, SIRT1在体内糖脂代谢的调节方面发挥重要作用。

有文献报道, SIRT1与 LXR- α 为相互作用蛋白, SIRT1与 LXR- α 结合后, 可促使 LXR- α 去乙酰

[收稿日期] 2009-10-30 [修回日期] 2010-01-12

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (07JJ6162)项目; 衡阳市科技局基础研究计划项目 (2008KJ002, 2008KJ003)

[作者简介] 张弛, 博士研究生, 讲师, 研究方向为脂代谢与动脉粥样硬化, E-mail为 zhangch9966@163.com。黄靓, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化炎症反应机制, E-mail为 huangliang0530@163.com。屈顺林, 讲师, 博士研究生, 研究方向为氧化应激与动脉粥样硬化, E-mail为 qushunlin78@126.com。

化;而敲除 SIRT1 基因后,将导致 LXR- α 的靶基因如 ABCA1 的表达减少,细胞内胆固醇流出减少^[5]。由于动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 病变的形成是一个慢性的病理过程,而巨噬细胞源性泡沫细胞的形成在 As 的发生和发展中起关键性作用^[6]。因此,通过动态观察 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程,探讨 SIRT1 与 LXR- α 的相互作用及其与细胞内胆固醇含量的关系,将从新的视角评价 SIRT1 在动脉粥样硬化性的疾病发生、发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心,在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯 (PMA, sigma 公司) 处理 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。

1.2 脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。先用超速离心法制备低密度脂蛋白,取部分用 10 μ mol/L CuSO₄ 氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein ox-LDL), 4℃ 保存。0.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定氧化与否。

1.3 THP-1 源性泡沫细胞模型的制备及实验分组

THP-1 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 (Gibco 公司) 培养基,常规静置培养。在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 72 h,使其诱导分化成巨噬细胞后,再向 RPMI 1640 培养基 (含 0.3% BSA) 中加入 50 mg/L 的 ox-LDL,分别静置培养 12、24 h 和 48 h,诱导其向泡沫细胞分化。实验共分 4 组: 对照组,不加 ox-LDL 处理; 50 mg/L ox-LDL 处理 12 h 组; 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h 组; 50 mg/L ox-LDL 处理 48 h 组。

1.4 细胞内总胆固醇含量测定

采用文献 [7] 报道的方法。处理结束后,弃去培养基,用 PBS 将细胞洗 3 遍,加入 0.1 mol/L NaOH 500 μ L,反复冻融 3 次以裂解细胞,BCA 法蛋白定量后,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。以豆甾醇为内标绘制标准曲线,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,加入 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,用 1.5 mol/L 三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥,100 μ L 乙腈-异丙醇 (80:20) 溶解样品,

上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱,柱温 4℃,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 mg/g 细胞蛋白为单位。胆固醇酯/总胆固醇值 = [细胞内总胆固醇含量 - 细胞内游离胆固醇含量 (mg/g)] $\div$ 细胞内总胆固醇含量 (mg/g) $\times$ 100%。

1.5 乙酰化肝 X 受体- α 的检测

乙酰化 LXR- α 的检测参考文献 [8]。过程简述如下: 采用 LXR- α 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司) 经免疫共沉淀将 LXR- α 蛋白沉淀分离出来,然后采用识别乙酰化赖氨酸的抗体 (α -Ack, 购自 cell signaling 公司) 检测沉淀物中 LXR- α 的乙酰化状态。

1.6 免疫共沉淀

收集各时间点细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,加 RIPA 裂解液 (0.05 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.001 mol/L DTT, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin, 2 mg/L Leupeptin, 0.1 mmol/L 正钒酸钠) 裂解 30 min, 10 kr/min 离心 10 min, 取上清液,即为细胞总蛋白。以 BCA 法进行蛋白定量,用免疫共沉淀法,从总细胞蛋白中分离 LXR- α 和 SIRT1 蛋白复合物。方法简述如下: 40 μ L Protein A/G-agarose 用 RIPA 液洗涤 3 次,加入 30 μ L (200 mg/L) LXR- α 或 SIRT1 单抗, 4℃ 摇床孵育 4 h,离心,回收未结合的 LXR- α 或 SIRT1 单抗, LXR- α 或 SIRT1 单抗与 Protein A/G-agarose 复合物用 RIPA 液洗涤 3 次,加入细胞总蛋白 300 μ L 与该复合物 4℃ 摇床孵育过夜后,离心弃上清, RIPA 液洗涤沉淀,反复 3 次,相互偶联的 LXR- α 与 SIRT1 存在于沉淀复合物中,在该复合物中加入 30 μ L 1 $\times$ SDS 样品缓冲液 [0.05 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 2% (W/V) SDS, 0.0025 g 溴酚蓝, 5% (V/V) β -巯基乙醇], 100℃ 煮沸 10 min, 所得样品用 Western blot 检测。

1.7 免疫印迹

收集各时间点细胞,经预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解液裂解细胞,置于冰上 20 min 后,于 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min,小心吸出上清液,用 BCA 法进行蛋白质定量,每条泳道取 50 μ g 蛋白质/泳道加入等体积 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白质变性。80 V 积层胶, 120 V 分离胶,电泳分离蛋白质, 35 mA 16 h 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。2% BSA 室温封闭 2 h,加入 SIRT1 一抗 (购自 upstate 公司), 4℃ 16 h。TBST 洗膜 15 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h。TBST 洗膜 15 min 后,加 DAB 染液于膜上,显影后扫描图像进

行统计分析。

1.8 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用方差分析和 t 检验, 由 SPSS 11.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对胆固醇含量的影响

THP-1 源性巨噬细胞经 50 mg/L ox-LDL 处理不同时间 (12、24 h 和 48 h) 发现, 随着 ox-LDL 作用时间延长, 细胞内总胆固醇含量和游离胆固醇含量不断增加 ($P < 0.05$); 胆固醇酯/总胆固醇值也不断上升, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. 细胞内总胆固醇、游离胆固醇含量的变化

分 组	总胆固醇 (mg/g)	游离胆固醇 (mg/g)	胆固醇酯 / 总胆固醇
对照组	189 ± 12	136 ± 9	$27.7\% \pm 4.2\%$
12 h 组	210 ± 15	142 ± 10	$31.8\% \pm 9.5\%$
24 h 组	286 ± 27^a	181 ± 17^a	$36.5\% \pm 5.6\%$
48 h 组	459 ± 42^a	260 ± 18^a	$43.0\% \pm 7.3\%^a$

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较, $n = 3$ 。

2.2 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中肝 X 受体- α 的乙酰化程度降低

THP-1 源性巨噬细胞经 ox-LDL 处理 12、24 h 和 48 h 后, LXR- α 蛋白的乙酰化程度与对照组比较, 分别下降了 18.05%、31.12% 和 38.23%, 24 h 组、48 h 组与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1 和表 2)。

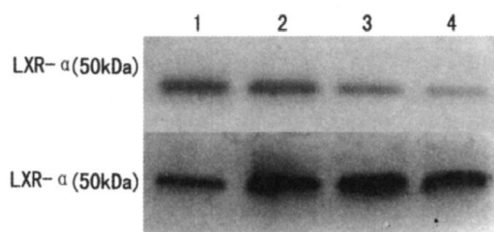


图 1. THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中乙酰化 LXR- α 蛋白水平降低 上图为乙酰化后 LXR- α 蛋白, 下图为总 LXR- α 蛋白。1 为对照组, 2、3、4 分别为 12 h、24 h 和 48 h 组。

2.3 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中肝 X 受体- α 可与 SIRT1 交互作用

图 2 为免疫共沉淀检测结果。以 LXR- α 特异

抗体作为捕获抗体, 以 SIRT1 特异性抗体作为检测抗体进行 Western blot 检测。实验结果显示 LXR- α 可与 SIRT1 相互结合, 形成免疫复合物而被沉淀。进一步以 SIRT1 抗体作为捕获抗体, 以 LXR- α 特异性抗体作为检测抗体进行 Western blot 检测, 结果同样显示 SIRT1 具有和 LXR- α 蛋白结合的能力。

表 2 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中乙酰化 LXR- α 蛋白水平

分 组	乙酰化 LXR- α 蛋白水平的相对值
0 h 组	0.79 ± 0.09
12 h 组	0.65 ± 0.07
24 h 组	0.55 ± 0.04^a
48 h 组	0.49 ± 0.05^a

a 与对照组比较, $P < 0.05$, $n = 3$ 。

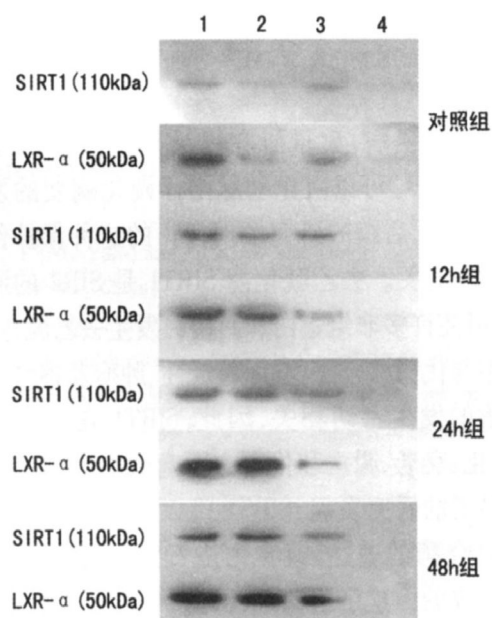


图 2 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中 SIRT1 与 LXR- α 存在交互作用 1 为裂解细胞后的总蛋白, 2 为以 LXR- α 特异抗体作为捕获抗体沉淀目的蛋白, 3 为以 SIRT1 特异抗体作为捕获抗体沉淀目的蛋白, 4 为以 IgG 作为阴性对照。

2.4 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中 SIRT1 的表达

THP-1 源性巨噬细胞经 ox-LDL 处理 12 h、24 h、48 h 后, SIRT1 的蛋白水平与对照组比较, 分别增加了 50.98%、121.73%、207.11%, 24 h 组、48 h 组与对照组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$, 表 3)。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种与血脂异常有关的慢性免

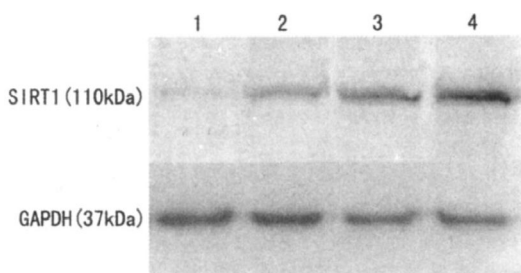


图 3 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中 SIRT1 蛋白水平
1 为对照组, 2、3、4 分别为 12、24 h 和 48 h 组。

表 3 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中 SIRT1 蛋白水平

分 组	SIRT1 蛋白表达水平的相对值
0 h 组	0.40 ± 0.05
12 h 组	0.61 ± 0.07
24 h 组	0.90 ± 0.10 ^a
48 h 组	1.24 ± 0.23 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较 ($n = 3$)。

疫一炎症性疾病, 大量研究揭示热量限制 (caloric restriction, CR) 可以阻止动脉粥样硬化病变的发生并延长寿命, 后续的研究发现, CR 的这种保护作用与 SIRT1 有关。去乙酰化酶 SIRT1 是 SR2 的同源蛋白, 可使许多非组蛋白和组蛋白发生去乙酰化, 这种作用与代谢综合征、基因稳定性、肿瘤及神经退行性疾病的发生密切相关, 因此, SIRT1 在细胞的增殖、分化、衰老、凋亡和代谢方面起到重要的调节作用。最近的研究发现, SIRT1 可以促进内皮细胞一氧化氮合酶的表达, 改善内皮舒张功能, 抑制 ox-LDL 导致的内皮细胞凋亡, 因此 SIRT1 可能是动脉粥样硬化性疾病治疗的新靶标^[9]。LXR- α 是一种氧化固醇激活的核受体, 在巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中起着重要的调控作用^[10]。本研究通过体外培养的 THP-1 巨噬细胞构建泡沫细胞模型, 采用免疫共沉淀方法, 发现在 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中, SIRT1 能够与 LXR- α 发生相互作用。以往的研究结果发现, 用 50 mg/L 的 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 48 h 后, LXR- α mRNA 表达增加^[11], 但是关于 THP-1 源性泡沫细胞形成过程中, LXR- α 的翻译后修饰研究, 目前仍未见文献报道。因此在这些工作的基础上, 本研究通过动态观察 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程, 探讨 LXR- α 蛋白乙酰化修饰变化及其细胞内胆固醇含量的关系, 结果发现乙酰化修饰的 LXR- α 蛋白逐渐降低。由于 SIRT1 与 LXR- α 的相互作用, 可导致 LXR- α 的乙

酰化修饰程度降低, 进而促进 LXR- α 的转录活性^[5], 我们推测 THP-1 源性巨噬细胞经 ox-LDL 处理 12、24 h 和 48 h 细胞内总胆固醇由对照组的 189 ± 12 mg/g 上升到 48 h 的 459 ± 42 mg/g 同时胆固醇酯也大量增加, 胆固醇酯/总胆固醇的百分比由对照组的 $27.7\% \pm 4.2\%$ 上升到 48 h 的 $43.0\% \pm 7.3\%$, 为调节细胞内的胆固醇平衡, LXR- α 的乙酰化修饰程度降低, LXR- α 的转录活性增强, 从而促进细胞内胆固醇流出。最后, 为了解释了 LXR- α 乙酰化水平降低的原因, 我们采用 western blot 方法检测了去乙酰化酶 SIRT1 的水平变化, 结果发现 THP-1 源性巨噬细胞经 ox-LDL 处理 12、24 h 和 48 h SIRT1 蛋白表达水平逐渐增加。

综上所述, 在 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程中, SIRT1 蛋白表达量增加, SIRT1 与 LXR- α 相互结合并使其去乙酰化, 去乙酰化的 LXR- α 转录活性增强, 可使其靶基因如 ABCA1 表达增加, 但仅凭此仍不能明确 SIRT1 在巨噬细胞源性泡沫细胞形成中的作用, 下一步还需对 SIRT1 进行干预, 以观察其对巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响。

[参考文献]

- [1] Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis [J]. *J Lipid Res* 2001; 42 (11): 1717-726
- [2] Linseisen P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4 (3): 193-205
- [3] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ [J]. *Nature* 2004; 429 (6993): 771-776
- [4] Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α [J]. *J Biol Chem* 2005; 280 (16): 16456-460
- [5] Xiaoling Li, Songwen Zhang, Gil Blander, et al. SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR [J]. *Mol Cell* 2007; 28 (1): 91-106
- [6] 王飞, 戴亚蕾. 白细胞介素 10 对巨噬细胞源性泡沫细胞趋化因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; 15 (1): 19-22
- [7] 袁中华, 贾薇, 黄语非, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; 16 (2): 101-106
- [8] Westerheide SD, Ankar J, Stevens SM Jr, et al. Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1 [J]. *Science* 2009; 323 (5917): 1063-066
- [9] Wei Yu, Yu-Cai Fu, Chun-Juan Chen, et al. SIRT1 A novel target to prevent atherosclerosis [J]. *J Cell Biochem* 2009; 108 (1): 10-13
- [10] 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003; 30 (6): 940-944
- [11] Chao-ke Tang, Guang-hui Yi, Jun-hao Yang, et al. Oxidized LDL up-regulated ATP binding cassette transporter-1 in THP-1 macrophages [J]. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25 (5): 581-586

(此文编辑 李玲玲)