

Toll 样受体 9 对巨噬细胞脂周素 2 表达的影响

范 斌¹, 谷剑秋², 张 锦², 生山祥一郎³

(中国医科大学 1. 附属盛京医院神经内科, 2. 附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110004;

3. 日本九州大学生体防御医学研究所免疫病态学分野 874-0838 日本)

[关键词] Toll 样受体; 泡沫细胞; 动脉粥样硬化; 脂周素 2

[摘要] **目的** 研究 ODN1826 对巨噬细胞脂周素 2 表达的影响, 并揭示其调控的相关分子机制。**方法** 应用半定量 PCR 和免疫印迹法分别测定 ODN1826 对脂周素 2 mRNA 和蛋白水平表达影响。应用荧光素酶活性分析方法检测 ODN1826 对脂周素 2 启动子活性的影响。**结果** ODN1826 以剂量和浓度依赖方式上调脂周素 2 mRNA 和蛋白水平表达, 并且通过 Ets/AP-1 位点促进脂周素 2 启动子活性。**结论** 在巨噬细胞中, TLR9 信号显著诱导了脂周素 2 mRNA 和蛋白的表达, 并且脂周素 2 启动子区域的 Ets/AP-1 位点参与了这一诱导过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of ODN1826, a TLR9 Ligand, on the Expression of Perilipin2 in Macrophages

FAN Bin¹, GU Jian-Qiu², ZHANG Jin², and IKUYAMA Shoichiro³

(1. Department of Neurology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 11004, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 11004, China; 3 Division of Clinical Immunology, Department of Immunology and Neuroscience, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 874-0838, Japan)

[KEY WORDS] Toll-like Receptor; Foam Cell; Atherosclerosis; Perilipin 2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ODN1826, a TLR9 ligand, on perilipin 2 expression in macrophages. **Methods** Real-time PCR and Western blotting were performed to detect perilipin 2 expression. Transient transfection and luciferase assay were employed to measure the perilipin 2 promoter activity. **Results** ODN1826 significantly induced perilipin 2 expression in a dose and time dependent manner in macrophages. ODN1826 markedly enhanced perilipin 2 promoter activity, and this process requires Ets/AP-1 activity. **Conclusions** TLR9 signal pathway stimulated perilipin 2 expression in macrophages, in addition, ODN1826-induced perilipin 2 promoter activity requires Ets/AP-1 activity.

以动脉粥样硬化为病理基础的心脑血管疾病严重威胁着人类的健康, 过多的脂质聚集在巨噬细胞导致泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化发生、发展的关键步骤^[1,2]。

PAT 家族蛋白成员脂周素 2 (adipose differentiation-related protein, perilipin 2; 以前称为 ADRP) 广泛表达在细胞内脂肪滴的表面, 尤其在巨噬细胞, 泡沫细胞中高水平的表达^[3,4]。在使用动脉粥样硬化动物模型 ApoE^{-/-} 鼠的实验中, 敲除脂周素 2 基因

显著抑制泡沫细胞的形成, 提示脂周素 2 在泡沫细胞的形成中扮演着重要作用^[5]。但关于脂周素 2 在巨噬细胞中表达的调控机制的研究却十分有限。巨噬细胞可以被病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecule patterns, PAMP) 通过 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 激活。人和鼠的 TLR 家族至少包括 13 名成员^[6]。其中 TLR2 和 TLR4 信号通路已被证明参与动脉粥样硬化斑块的形成^[7,8]。最近的研究表明 TLR9 信号通路促进巨噬细胞向泡沫

[收稿日期] 2010-10-31

[作者简介] 范斌, 博士, 主治医师, 研究方向脑血管疾病及血脂代谢与动脉粥样硬化, 联系电话为 024-96615-28111, E-mail 为 fanbin@hotmail.co.jp。谷剑秋, 博士, 讲师, 研究方向糖尿病与血脂代谢, E-mail 为 gujianqiu@hotmail.co.jp。张锦, 硕士, 博士研究生导师, 研究方向为血脂代谢 E-mail 为 zhangjininsy@gmail.com。

细胞的转化,但并未揭示 TLR9 信号通路诱导泡沫细胞形成的作用机制^[9,10]。因此本研究检测 TLR9 配体 ODN1826 (oligodeoxynucleotide) 是否可以诱导脂周素 2 在巨噬细胞中表达,并进一步揭示其诱导脂周素 2 表达作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

ODN1826 (Invitrogen, 美国), perilipin2 单克隆抗体 (PROGEN Biotechnik, 德国), GAPDH 单克隆抗体, 过氧化物酶偶联羊抗豚鼠 IgG 及羊抗鼠抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 美国), Western blotting 检测试剂盒 (GE Healthcare), 转染试剂, Lipofectamine PLUS reagent (Invitrogen), 荧光素发光检测试剂盒 (Promega), 逆转录 ReverTra Ace-a kit 试剂盒 (Toyobo, Osaka 日本), Real time PCR SYBR Green 试剂盒 (Bio-Rad), 空白 pGL3 荧光素酶报告质粒, 包含脂周素 2 启动子 -2 090 bp 区域及 A, E, AE 位点突变的 -2 090 bp 启动子区域的 pGL3 质粒, 对照 pRL-TK 质粒由生山祥一郎教授慷慨提供。

1.2 细胞培养

RAW264.7 鼠巨噬细胞株 (RIKEN, 日本), 1×10^6 RAW264.7 细胞接种于 10 mL α -MEM 培养基中 (100 mL/L 胎牛血清, 1×10^5 U/L 青霉素) 置于 37°C CO₂ 恒温培养箱中。1~2 天传代 1 次。

1.3 实时 PCR

使用 Isogen, 按说明书提取总 RNA, 取 0.5 μ g/mL 总 RNA, 用逆转录 ReverTra Ace-a kit 试剂盒, 按使用说明书操作合成单链 cDNA, 鼠脂周素 2 上游引物序列 5'-CTGTCTACCAAGCTCTGCTC-3', 下游引物序列 5'-CGATGCTTCCTTCCACTCC-3'。GAPDH, 上游引物序列为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物序列为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTTA-3', 用 SABR Green Real-time PCR 荧光试剂盒, 按说明书操作, 总反应体积为 25 μ L (12.5 μ L SYBER Green supermix, 5 μ L, 1:20 倍稀释的 cDNA, 各引物的终浓度为 320 nmol/L), 以 GAPDH 为内参照物, 脂周素 2 表述量以对 GAPDH 相对诱导倍数表示。

1.4 Western blotting

用 4°C 预冷裂解液 (含 pH 7.5 50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 g/L Nonidet 40, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 100 mL/L 甘油, 50 mmol/L 氟化钠, 10 mmol/L 焦磷酸钠, 1 mmol/L 硫酸钠, 80

μ mol/L β -甘油磷酸, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/L aprotinin, 100 mg/L soybean trypsin inhibitor 和 10 mg/L leupeptin) 裂解细胞。取 25 μ g 蛋白, 95°C 变性 5 min 后经 12% SDS-PAGE 行垂直电泳, 100 V \times 90 min, 室温 100 V \times 100 min 转膜, 50 g/L 牛奶室温封闭 1 h。结合一抗 (豚鼠抗鼠 ADRP mAb, 1:200 稀释), 室温 1 h, 结合二抗 (羊抗豚鼠, 或羊抗鼠多克隆抗体, 1:20 000 稀释), 室温 1 h。感光、洗片, 蛋白条带扫描后行光密度分析。

1.5 临时转染及荧光素酶活性分析

用 Lipofectamine PLUS reagent 转染试剂, 按使用说明书进行操作, RAW264.7 细胞 2×10^5 /孔, 接种于 12 孔板, 培养 24 h 后, 改为无血清培养液培养, 转染混合液 50 μ L (Lipofectamine 2 μ L, PLUS reagent 5 μ L, 1 μ g 荧光素酶报告质粒, 0.4 μ g pRL-TK 质粒, 用无血清培养液调整至 50 μ L), 37°C 转染 4 h。1 \times PBS 洗涤, 改为含胎牛血清 α -MEM 培养液及相应浓度 ODN1826 培养 24 h, 收集并裂解细胞, 使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System 荧光素酶检测系统, 按说明书操作进行荧光素酶活性检测。根据对照质粒 pRL-TK Renilla 活性标准化转染效率。

1.6 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Toll 样受体 9 信号通路对巨噬细胞脂周素 2 表达的影响

首先在鼠 RAW264.7 巨噬细胞系中检测了 TLR9 配体 ODN1826 对脂周素 2 表达的影响。结果显示, ODN1826 以剂量依赖的方式显著增加了脂周素 2 mRNA 和蛋白的表达水平 (图 1, Figure 1), 由于 2.5 mg/L ODN1826 诱导脂周素 2 的表达最显著且未见毒性作用, 因此选用该浓度进行下一步研究。该浓度下 ODN1826 以时间依赖的方式显著诱导了脂周素 2 mRNA 和蛋白的表达 (图 2, Figure 2), 刺激后 24 h 诱导表达最明显。

2.2 ODN1826 提高巨噬细胞脂周素 2 启动子的活性

进一步检测了 ODN1826 对脂周素 2 启动子活性的影响, 荧光素酶表达分析显示, ODN1826 以剂量依赖的方式显著提高了 perilipin2 的 -2090 bp 启动子活性 (图 3, Figure 3), 说明 ODN1826 通过直接的方式诱导脂周素 2 的表达。

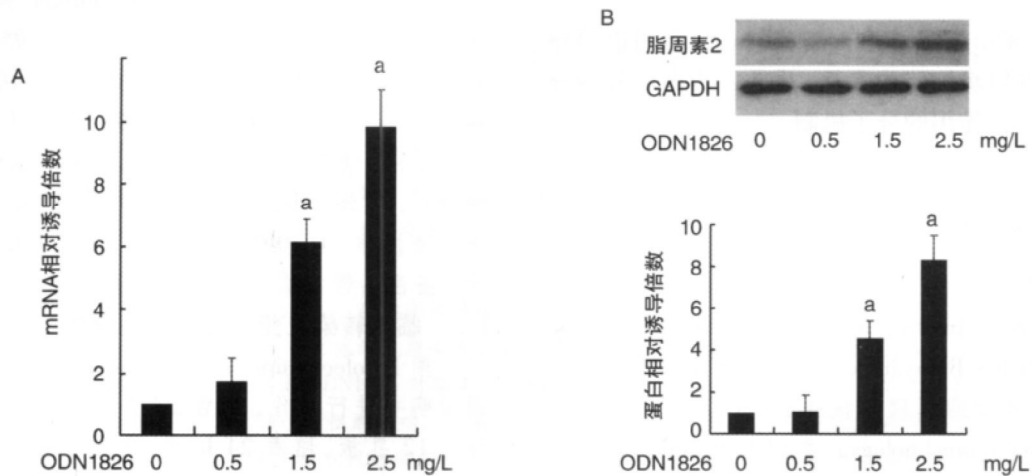


图 1. ODN1826 以浓度依赖方式上调 RAW264.7 细胞脂周素 2 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L 组比较。

Figure 1. ODN1826 stimulates perilipin 2 expression in a dose-dependent manner

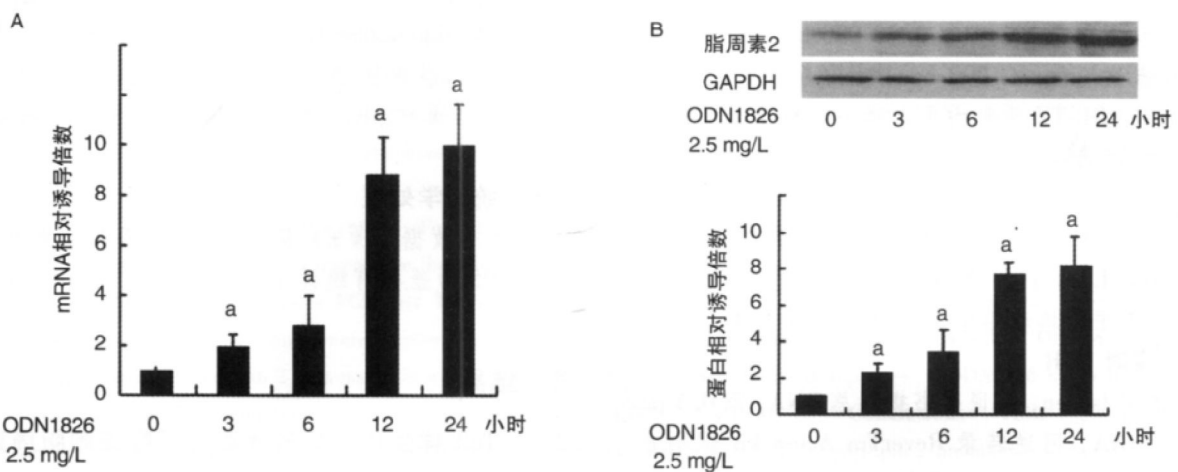


图 2. ODN1826 以时间依赖方式上调 RAW264.7 细胞脂周素 2 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 2. ODN1826 stimulates perilipin2 expression in a time-dependent manner

2.3 ODN1826 诱导脂周素 2 的表达, 需要 Ets/AP-1 位点的活性

既往研究发现在鼠脂周素 2 启动子 -2 090 bp 至 -2 005 bp 区域中存在 Ets/AP-1 位点^[11-13]。因此本研究检测了是否 Ets/AP-1 参与了 ODN1826 诱导的脂周素 2 的表达。荧光素酶表达分析显示, Ets 位点突变, AP-1 位点突变, 及 Ets/AP-1 位点突变显著抑制了 ODN1826 诱导的启动子活性 (图 4, Figure 4), 提示 ODN1826 诱导脂周素 2 的表达需要 Ets/AP-1 的活性。

3 讨论

最近研究表明, 一系列蛋白镶嵌在细胞内脂肪滴的表面, 参与脂质的生物合成, 储存, 利用和降解, 而在其中脂周素 2 是脂肪滴外周含量最高的一种不完全包被蛋白。

脂周素 2 属脂肪滴周围蛋白 PAT 家族成员; 研究表明脂周素 2 具有多个脂滴结合结构域。作为胞质脂滴的一个不完全包被蛋白, 脂周素 2 分布于多种细胞系中, 如单核巨噬细胞、内皮细胞、肌细胞和上皮细胞。然而, 在组织中脂周素 2 的表达却限于某些特定的细胞, 如外周血的单核细胞、动脉粥样

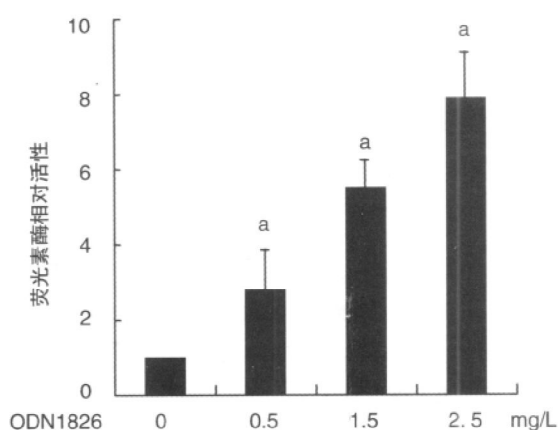


图3. ODN1826 提高脂周素 2 启动子活性 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 3. ODN1826 enhances the perilipin 2 promoter activity in a dose-dependent manner

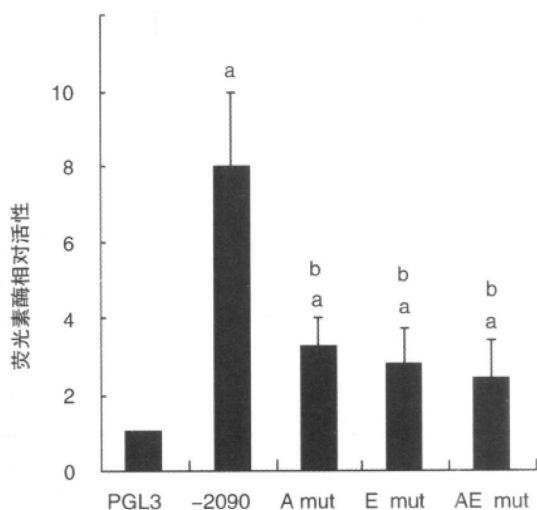


图4. ODN1826 诱导脂周素 2 启动子活性需要 Ets/AP-1 的参与 PGL3 为空白荧光素酶报告质粒; -2 090 为包含脂周素 2 启动子区域 -2 090 bp 的荧光素酶报告质粒; A mut、E mut 及 AE mut 为分别引入 AP-1、Ets 及 Ets/AP-1 位点突变的荧光素酶报告质粒。a 为 $P < 0.05$, 与 pGL3 比较; b 为 $P < 0.05$, 与 -2 090 比较。

Figure 4. ODN1826-induced enhancement of the perilipin 2 promoter activity requires Ets/AP-1 function

硬化斑块区的巨噬细胞、发生脂肪变的肝细胞及类固醇激素生成细胞^[3]。体内实验表明,在巨噬细胞中上调脂周素 2 的表达,促进细胞对游离脂肪酸及胆固醇的吸收,导致细胞内过量脂质聚集及泡沫细胞的形成^[1]。此外在动物实验中,脂周素 2 基因敲除及反义寡核苷酸下调脂周素 2 基因表达均可显著阻止动脉粥样硬化的发生发展^[5,14]。这表明,脂周素 2 可能是治疗动脉粥样硬化的理想分子靶点。但

关于脂周素 2 表达调控机制的研究却较少。长链游离脂肪酸,氧化低密度脂蛋白及 PPAR 配体均可上调脂周素 2 的表达^[3]。以前的研究证明了在鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞中,PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 和 LPS 上调了脂周素 2 的表达并揭示了相关分子作用机制^[11,12]。故在本试验聚焦脂周素 2 表达调控机制的研究。

TLR 是一组病原相关的分子模式受体,迄今为止,已发现 13 个 TLR 家族成员,分别命名为 TLR1-13,TLRs 下游信号包括 MyD88 (myeloid differentiation factor 88) 依赖及非依赖性信号传导通路。TLR9 是近年来研究的热点。TLR9 能够识别未甲基化的 CpG 二核苷酸并与之结合,通过 MyD88 依赖性信号传导通路参与免疫调节。研究表明 MyD88 依赖性信号传导通路在动脉粥样硬化发生中扮演重要作用^[15]。动物实验已证明 TLR2 和 TLR4 参与动脉粥样硬化斑块的形成^[7,8]。最近的研究表明,在巨噬细胞中,TLR9 信号通路可以上调 Lox-1 (lectin-like ox-LDL receptor-1) 和 Nox-1 (NADPH oxidase 1) 的表达,从而导致泡沫细胞的形成^[9]。最近的研究表明,联合 ODN1826 和 ox-LDL 可显著刺激 RAW264.7 细胞向泡沫细胞的转换^[10]。但是关于 ODN1826 诱导泡沫细胞形成的分子机制研究的较少,鉴于脂周素 2 在泡沫细胞形成中扮演的重要作用,推测 ODN1826 影响脂周素 2 的表达。

既往研究结果表明 ODN1826 刺激了脂周素 3 (以前称为 TIP47) 的表达^[10]。本实验结果显示,ODN1826 以剂量及浓度依赖方式刺激脂周素 2 mRNA 及蛋白的表达。2.5 mg/L ODN1826 诱导了最明显的表达,此结果提示脂周素 2 至少参与 ODN1826 诱导泡沫细胞形成的过程。

下一步研究了 ODN1826 刺激脂周素 2 表达的分子机制。在既往研究中在脂周素 2 启动子区域鉴定了一个 Ets/AP-1 位点,并且证明 AP-1 及 PU-1 选择性结合此位点,参与 LPS, PMA 诱导的脂周素 2 的表达^[11,12]。故在本次试验检测了 Ets/AP-1 位点的作用。ODN1826 以浓度依赖的方式显著刺激了脂周素 2 启动子的活性,与对照相比 2.5 mg/L ODN1826 诱导了约 8 倍荧光素酶活性,提示 ODN1826 以直接的方式诱导脂周素 2 的表达,当引入点突变到 Ets 位点 (E mut), AP-1 位点 (A mut), Ets/AP-1 位点 (AE mut),抑制了 ODN1826 诱导的荧光素酶活性,提示 ODN1826 诱导脂周素 2 的表达需要 Ets/AP-1 的活性。此外,Ets/AP-1 位点突变并没有完全抑制 ODN1826 诱导的荧光素酶活性(抑制

约 75%)，提示脂周素 2 -2 090 bp 启动子区域可能存在其他顺式作用元件。这种可能性需要进一步研究。

总之，本研究证明了，在巨噬细胞中，TLR9 信号显著诱导了脂周素 2 mRNA 和蛋白的表达，并进一步揭示脂周素 2 启动子区域的 Ets/AP-1 位点参与了这一诱导过程。本研究结果建立了一个新的分子机制，通过脂周素 2 蛋白联系 TLR9 信号通路和动脉粥样硬化形成。同时提示，具有抗炎，抑制 AP-1 活性的植物提取物有可能通过抑制脂周素 2 表达从而抑制 TLRs 诱导的动脉粥样硬化形成，这值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Larigauderie G, Furman C, Jouye 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.
- [2] 沈驰斌, 卢德赵, 沃兴德, 等. RAW264.7 细胞泡沫化前后差异蛋白质组分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (3) : 197-201
- [3] Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, et al. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38 (5) : 2 249-2263.
- [4] Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, et al. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular, lipid storage droplet proteins [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51 (3) : 468-471.
- [5] Paul A, Chang BH, Li L, et al. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2008, 102 (12) : 1 492-501.
- [6] Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (2) : 588-593.
- [7] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (29) : 10 679-684.
- [8] Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2 [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115 (11) : 3 149-156.
- [9] Lee JG, Lim EJ, Park DW, et al. A combination of Lox-1 and Nox1 regulates TLR9-mediated foam cell formation [J]. *Cell Signal*, 2008, 20 (12) : 2 266-275.
- [10] Gu JQ, Wang DF, Yan XG, et al. A Toll-like receptor9-mediated pathway stimulates perilipin3 (TIP47) expression and induces lipid accumulation in macrophages [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299 (4) : E593-600.
- [11] Wei P, Taniguchi S, Sakai Y, et al. Expression of adipose differentiation-related protein is conjointly regulated by PU. 1 and AP-1 in macrophages [J]. *J Biochem*, 2005, 138 (4) : 399-412.
- [12] Gu JQ, Ikuyama S, Wei P, et al. Pycnogenol, an extract from French maritime pine, suppresses Toll-like receptor 4-mediated expression of adipose differentiation-related protein in macrophages [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295 (6) : E1 390-400.
- [13] Fan B, Ikuyama S, Gu JQ, et al. Oleic acid-induced AD-RP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol, Metab*, 2009, 297 (1) : 112-123.
- [14] Imai Y, Varela GM, Jackson MB, et al. Reduction of hepatosteatosis and lipid level by an adipose differentiation-related protein antisense oligonucleotide [J]. *J Gastroenterology*, 2007, 132 (5) : 1 947-954.
- [15] Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (4) : 416-421.

(此文编辑 李小玲)