

TIP47 对巨噬细胞内脂肪滴形成及甘油三酯的影响

范斌¹, 谷剑秋², 张锦²

(1. 中国医科大学附属盛京医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110004; 2 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 脂肪滴; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化; TIP47

[摘要] **目的** 探讨 RNA 干扰技术对巨噬细胞 TIP47 蛋白的抑制作用, 并进一步研究其对细胞内脂肪滴形成及甘油三酯的影响。**方法** 应用 siRNA 技术选择性抑制 TIP47 表达, Western blot 分别测定 TIP47 和 ADRP 蛋白表达。油红 O 染色检测细胞内脂肪滴形成。**结果** TIP47 siRNA 选择性抑制 TIP47 蛋白表达, 但对 ADRP 蛋白表达无影响, TIP47 siRNA 抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的细胞内脂肪滴形成, 下调甘油三酯含量。**结论** 应用 TIP47 siRNA 转染明确抑制 TIP47 蛋白表达, 选择性下调 TIP47 抑制巨噬细胞内脂肪滴形成及降低甘油三酯含量, 从而可能抑制泡沫细胞的形成, 提示 TIP47 有可能是动脉粥样硬化相关性疾病预防的分子目标。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Effect of TIP47 on the Formation of Lipid-droplets and the Accumulation of Triglycerides in Macrophages

FAN Bin¹, GU Jian-Qiu², and ZHANG Jin²

(1. Department of Neurology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Lipid-droplets; Macrophage; Atherosclerosis; TIP47

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of tail interacting protein of 47 kDa (TIP47) on lipid-droplets (LDs) formation and triglyceride accumulation in Macrophages. **Methods** Western blot was performed to detect the effects of TIP47 siRNA on the expression of TIP47 and adipose differentiation-related protein (ADRP). Oil-red O staining and lipid analysis were employed to measure the formation of LDs and accumulation of triglycerides in Macrophages. **Results** TIP47 siRNA clearly inhibited TIP47 protein expression, but did not affect the expression of ADRP protein. Furthermore, TIP47 siRNA suppressed ox-LDL induced LDs formation and triglycerides accumulation in macrophages. **Conclusions** The results indicates that TIP47 should be preventive or therapeutic target for diseases caused by excessive lipid accumulation through suppression of foam cells formation, such as atherosclerosis.

单核细胞通过内皮细胞间隙移入内膜下并分化成巨噬细胞, 巨噬细胞吞噬体内过剩的脂质后转化为泡沫细胞, 泡沫细胞聚集并形成斑块是动脉粥样硬化发生、发展的主要病理基础^[1,2]。对泡沫细胞形成机制进行研究, 以期明确抑制泡沫细胞形成的分子靶点, 是目前动脉粥样硬化防治研究的热点。

PAT(perilipin、ADRP 和 TIP47) 家族蛋白是镶嵌在细胞内脂肪滴表面, 调控脂肪滴和脂质的生成、转运、聚集和脂肪分解的一类蛋白。其中对 AD-

RP 的研究较为广泛, 在动脉粥样硬化动物模型 ApoE^{-/-} 鼠的实验中, 敲除 ADRP 基因能显著抑制泡沫细胞及斑块的形成^[3], 提示下调 ADRP 的表达有助于减少泡沫细胞的形成, ADRP 是治疗动脉粥样硬化的理想分子目标。而对与其分布规律及结构存在高度一致性的 TIP47 的研究却较少, 本研究选用 siRNA 技术选择性抑制 TIP47 表达, 进而观察其对巨噬细胞内脂肪滴形成及甘油三酯含量的影响, 明确其在泡沫细胞形成中的作用。

[收稿日期] 2011-12-23

[作者简介] 范斌, 博士, 主治医师, 研究方向为脑血管疾病、血脂代谢与动脉粥样硬化, E-mail 为 fanbin@hotmail. co. jp。谷剑秋, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病与血脂代谢, 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。

1 材料和方法

1.1 试剂

油红 O 试剂(上海迈坤化工有限公司),甘油三酯检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),ADRP 单克隆抗体(PROGEN Biotechnik),TIP47、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),Western blot 检测试剂盒(GE Healthcare),TIP47 siRNA(Qiagen HP-guaranteed siRNA; Hilden),TIP47 siRNA 序列为 5'-AAC AGC ACA GAG AAU GAG GAG-3',阴性对照干扰片断 5'-GCG UGU CCA AUC AGU CAU-3'。转染试剂 Lipofectamine2000(Invitrogen)。

1.2 细胞培养及处理

RAW264.7 鼠巨噬细胞株(RIKEN,日本) 1×10^6 个接种于 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,5% CO₂ 恒温培养箱中。1~2 天传代 1 次。TIP47 siRNA 或阴性对照 siRNA 转染细胞 12 h、24 h 后,Western blot 检测 TIP47 蛋白的表达水平或继续 50 mg/L ox-LDL 刺激 24 h 后,Western blot 检测 ADRP 蛋白的表达水平。

1.3 Western blot 检测

用 4°C 预冷裂解液(含 pH7.5 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 120 g/L SDS2PAGE 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,1:20000 稀释),室温 1 h。感光、洗片,蛋白条带扫描后行光密度分析。

1.4 瞬时转染

用 Lipofectamine2000 转染试剂,按使用说明书进行操作,将 RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 12 孔板,培养 24 h 后,改为去除胎牛血清培养液培养,转染混合液 50 μ L(Lipofectamine2000 1 μ L, siRNA 40 pmol,用去除胎牛血清培养液调整至 50 μ L),37°C 转染 12 h 或 24 h。

1.5 油红 O 染色

细胞转染 siRNA 12 h 后,50 mg/L ox-LDL 或 DMSO 刺激细胞 48 h,细胞培养于放有无菌盖玻片

的 6 孔培养板内,各组予相应处理后,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.5% 油红 O 染液室温染色 30 min,60% 异丙醇漂洗后苏木素染色 30 s,明胶甘油封片。于倒置显微镜下观察细胞内橘红色脂滴形成情况。

1.6 细胞内甘油三酯含量测定

胰酶消化收集 6 孔培养板内细胞,细胞裂解液充分裂解后,取上清加异丙醇处理后,使用甘油三酯检测试剂盒,按说明书操作测定细胞内甘油三酯含量。

1.7 统计学方法

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

2 结果

2.1 TIP47 和 ADRP 蛋白表达

siRNA 组转染 12 h 时,TIP47 蛋白表达明显受抑制,抑制率为 67.2% ($P < 0.05$),在转染 24 h 时,TIP47 蛋白表达开始恢复,阴性对照组未见明显抑制效果($P > 0.05$;图 1)。选择性下调 TIP47 并没有影响 ox-LDL 诱导的 ADRP 蛋白表达($P > 0.05$;图 2)。

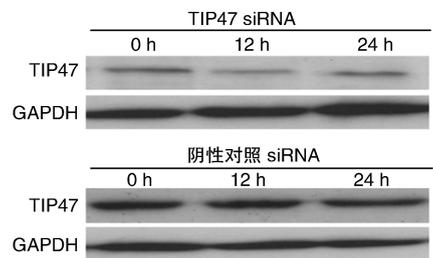


图 1. TIP47 siRNA 对 TIP47 蛋白表达的影响

Figure 1. The effect of TIP47 siRNA transfection on TIP47 protein expression

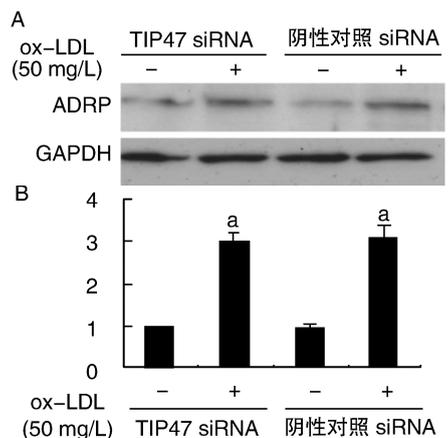


图 2. TIP47 siRNA 对 ox-LDL 诱导的 ADRP 蛋白表达的影响 a 为 $P < 0.05$,与对照组比较。

Figure 2. The effect of TIP47 siRNA transfection on ox-LDL-induced ADRP protein expression

2.2 TIP47 对细胞内脂肪滴形成的影响

对照组细胞内可见大量大小不等的橘红色脂肪滴聚集, TIP47 siRNA 转染显著抑制了 ox-LDL 诱导的细胞内脂肪滴聚集, 而阴性对照 siRNA 对此无影

响(图 3)。

2.3 TIP47 对细胞内甘油三酯含量的影响

TIP47 siRNA 转染降低细胞内甘油三酯含量, 下降约 41% ($P < 0.05$; 图 4)。

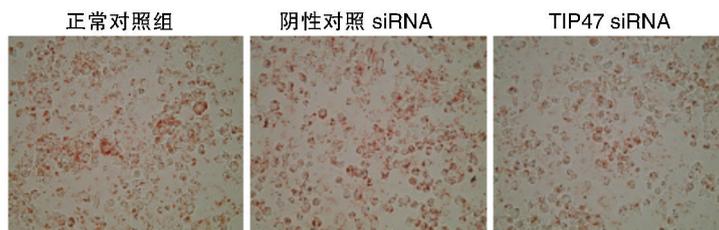


图 3. TIP47 siRNA 对 ox-LDL 诱导的细胞内脂肪滴形成的影响

Figure 3. The effect of TIP47 siRNA transfection on ox-LDL induced lipid-droplets formation

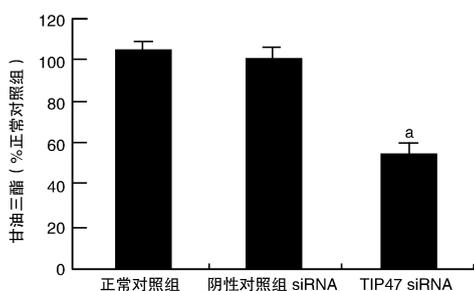


图 4. TIP47 siRNA 对 ox-LDL 诱导的甘油三酯的影响

为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 4. The effect of TIP47 siRNA transfection on ox-LDL induced triglyceride accumulation

3 讨论

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化发生、发展的关键步骤^[4,5]。细胞内脂肪滴由覆盖在表面的单层磷脂和甘油三酯构成的核心两部分组成, 在单层磷脂内镶嵌多种蛋白, 这些蛋白被命名为脂滴表面蛋白。PAT 家族蛋白是其中表达最为丰富的蛋白, 调控脂肪滴和脂质的生成、转运、聚集和脂肪分解。包括 perilipin、ADRP 和 TIP47, 其中 ADRP 和 TIP47 结构最为相似, 表达最为广泛, 几乎在所有的组织中均有表达, 尤其在巨噬细胞、动脉硬化斑块、肝细胞中表达最为丰富^[6,7]。TIP47 又称甘露醇-6-磷酸受体结合蛋白 1 (M6PRBP1), 是脂滴相关蛋白 PAT 家族成员之一, 在脂肪细胞中呈一定的时空表达规律, 在基础状态下 TIP47 主要分布在靠近胞膜的胞浆中, 当生成新生的脂肪滴时, 新生脂肪滴靠近胞膜, TIP47 结合到脂肪滴表面并包裹脂肪滴, 主要参与新生脂肪滴的快速装配。随着脂肪滴逐渐增大并向细胞核周围靠近, TIP47 逐渐减少至消失, 说明

TIP47 可能在脂肪细胞分化初期对脂肪滴的形成和增大起重要作用^[8,9]。近年来对 ADRP 研究较为广泛, 动物实验中, ADRP 敲除及反义寡核苷酸下调 ADRP 表达均可显著阻止动脉粥样硬化的发生发展^[3,10]。这表明, ADRP 可能是治疗动脉粥样硬化的分子靶点。而对 TIP47 的研究却较少。故本研究中, 我们选用 siRNA 技术, 选择性抑制 TIP47 的表达, 进而观察其对巨噬细胞内脂肪滴形成及甘油三酯含量的影响。

RNA 干扰技术是研究基因功能和基因治疗的重要工具, 被形象地称为基因敲低 (knock-down) 或基因沉默 (gene-silencing) 技术。siRNA 技术具有高特异性、高效性、高稳定性、可传播性和可遗传性等分子生物学特性。同时, 作为基因治疗的工具还具有针对性强, 副作用小, 周期较短的好处。我们应用 TIP47 siRNA 转染方法有效抑制了 TIP47 蛋白的表达。在转染 12 h 后, TIP47 蛋白表达明显降低, 抑制率为 67.2%, 在转染 24 h 后 TIP47 蛋白开始恢复。

最近的研究表明, 选择性下调 TIP47 表达可引起 ADRP 代偿性增加, 从而可能弥补 TIP47 的功能缺陷^[11]。因此, 我们检测了 TIP47 siRNA 是否可引起 ox-LDL 诱导的 ADRP 代偿性增加, 我们的结果提示, 在转染后的各个时间点均未影响 ADRP 的表达。产生以上研究结果不同的原因考虑与所选择的细胞系、siRNA 序列的不同有关。

接下来, 我们检测了 TIP47 对巨噬细胞内脂肪滴形成的影响。油红 O 染色结果显示, TIP47 siRNA 显著抑制了 ox-LDL 诱导的脂肪滴聚集, 由于脂肪滴内主要成份为甘油三酯, 我们进一步检验了其对细胞内甘油三酯的影响, 和对脂肪滴抑制作用相一

致, TIP47 siRNA 明显降低了细胞内甘油三酯含量。我们的结果清楚的显示, 下调 TIP47 蛋白表达减少了巨噬细胞内脂肪滴形成及甘油三酯含量。

总之, 本研究结果表明, 我们应用 TIP47 siRNA 转染方法明确抑制了 TIP47 蛋白表达并对 ADRP 表达未产生任何影响。更为重要的是, 我们发现选择性下调 TIP47 蛋白表达抑制了巨噬细胞内脂肪滴形成及下调了甘油三酯含量, 从而可能抑制泡沫细胞的形成, 提示 TIP47 有可能是动脉粥样硬化相关性疾病防治的分子目标。但关于其调节成脂过程的机制仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Liu PS, Ying YS, Zhao YM, et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid drop lets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (5): 33 787-792.
- [2] Kumi TS, Shintaro O, Toshiaki H, et al. The surface of lipid drop lets is a phospholipids monolayer with a unique fatty acid composition[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (46): 44 507-512.
- [3] 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.
- [4] 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.

- [5] 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.
- [6] Kimmel AR, Brasaemlle 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 (2): 468-471.
- [7] 范斌, 谷剑秋, 张锦, 等. Toll 样受体 9 对巨噬细胞脂周素 2 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (2): 100-104.
- [8] Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, et al. S3212, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (19): 19 146-155.
- [9] Liu MF, Xu GH. Function of PAT family proteins in the lipid metabolism[J]. *Prog Physiol Sci*, 2006, 37 (2): 103-107.
- [10] 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.
- [11] Carole S, Ming B, Lu XY, et al. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (45): 34 341-348.

(此文编辑 文玉珊)