

锌指蛋白去磷酸化在载脂蛋白 A I 抑制脂多糖诱导的泡沫细胞炎症因子表达中的作用

李金凤¹, 涂玉林¹, 尹凯^{1,2}

(1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 2. 南华大学医学院诊断学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 锌指蛋白; 载脂蛋白 A I; 巨噬细胞源性泡沫细胞; 炎症因子

[摘要] 目的 观察载脂蛋白 A I (ApoA I) 对脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞炎症因子表达的影响, 探讨锌指蛋白 (TTP) 翻译后修饰在 ApoA I 抑制泡沫细胞炎症因子表达中的作用。方法 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞以 ApoA I 和/或脂多糖处理, 采用 ELISA 检测细胞裂解液中炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 蛋白表达; 采用实时定量 PCR 检测 IL-1 β mRNA 表达和降解率; 采用 Western blot 检测 TTP 和磷酸化 TTP (p-TTP) 的表达。结果 ApoA I 明显抑制脂多糖诱导泡沫细胞炎症因子的表达, 并影响 TTP 表达和 TTP 去磷酸化。结论 ApoA I 抑制泡沫细胞炎症因子表达机制涉及 TTP 的去磷酸化, 与 TTP 促进含有腺苷酸环尿苷酸丰富的元件 (ARE) 的 mRNA 降解有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of Tristetraprolin Dephosphorylation in the Inhibition LPS-induced Expression of Inflammatory Cytokines in Macrophage Foam Cells by ApoA I

LI Jin-Feng¹, TU Yu-Lin¹, and YIN Kai^{1,2}

(1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province; 2. Department of Diagnosis in Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Tristetraprolin; Apolipoprotein A I; Macrophage-derived Foam Cells; Inflammatory Cytokines

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of apolipoprotein A I (ApoA I) on the expression of inflammatory cytokines and explore the role of tristetraprolin (TTP)-translational modification in the ApoA I inhibition macrophage-derived foam cells expression of inflammatory cytokines. **Methods** THP-1 macrophage-derived foam cells were treated with ApoA I and/or lipopolysaccharide (LPS). Enzyme linked immunosorbent assay was used to determine levels of interleukin-1 β (IL-1 β) in cell lysates. Real-time polymerase chain reaction was used to determine mRNA and degradation rate of IL-1 β . Western blot was used to determine protein levels of TTP and p-TTP. **Results** ApoA I significantly inhibited the levels of LPS-induced macrophage-derived foam cells inflammatory cytokines, and influenced the expression of TTP and TTP dephosphorylation. **Conclusion** ApoA I inhibiting the expression of inflammatory cytokines in macrophage-derived foam cells may be involved in the dephosphorylation of TTP, which can bind and target ARE-containing mRNA for rapid degradation.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是多种心血管疾病的病理基础, 其防治成为当前医学研究领域的重要课题。As 的病理变化存在变质、渗出和增生等炎症的基本特征, 炎症反应在许多疾病特别是慢性疾病过程中存在的事实已得到公认, 其中血管壁炎症反应在 As 从发病到出现临床事件都发挥重要

作用。单核细胞进入血管壁是炎症反应激活的特征, 已被认为是 As 发生发展的关键因素^[1]。载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I) 是血浆高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要成分, 参与体内胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT), 防止泡沫细胞的形成, 因此具有抗

[收稿日期] 2013-10-22

[基金项目] 湖南省研究生科研创新项目 (2012SCX13)

[作者简介] 李金凤, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治, E-mail 为 lijinfenglibing@163.com。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者尹凯, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 kaiyinby@hotmail.com。

As 作用^[2]。近来研究发现, ApoA I 除了参与 RCT 外, 还具有显著的抗炎效应^[3], 但其机制尚不明确。

锌指蛋白(tristetraprolin, TTP)是一种具有双锌指结构域的 RNA 结合蛋白, 主要在巨噬细胞表达, 通过与多种炎症因子 mRNA 的 AU 重复序列结合, 降低 mRNA 稳定性, 促进其降解^[4]。TTP 主要功能为靶向调节体内多种与 As 相关的炎症因子, 其中包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、干扰素 γ 等^[5-7]。但炎症状态下 TTP 磷酸化位点 52 和 178 号丝氨酸发生磷酸化失活后就不具备降解炎症因子 mRNA 的效应^[8-10], 提示 TTP 表达后修饰在其功能调节中起着关键作用。研究发现, ApoA I 预处理明显增强多种炎症因子, 如 TNF- α 、IL- 1β 和 MCP-1 等的 mRNA 降解, 而且 ApoA I 明显上调脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理的巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 的表达^[11]。因此我们推测 ApoA I 促进多种炎症因子 mRNA 降解的机制可能与 TTP 去磷酸化有关。因此, 本研究观察 ApoA I 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 和磷酸化 TTP (p-TTP) 表达及其炎症因子表达的影响, 以便进一步探讨 TTP 翻译后修饰在 ApoA I 抗 As 炎症反应中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞中心; 1640 培养基、TRIzol 试剂盒购自美国 Gibco 公司; 脂多糖、佛波酯购自美国 Sigma 公司; 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 购自 Yeasen 公司; ApoA I、兔抗人 TTP (ab33058) 一抗购自 Abcam 公司; Western blot 荧光检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Hyclone Pierce 公司; X 光底片购自 Kodak 公司; 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成; PVDF 膜购自 Amersham 公司; 兔多克隆抗磷酸丝氨酸 (AB1603) 购自 Chemicon 公司; 兔抗人 β -actin 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自武汉博士德公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

人单核细胞株(THP-1)用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液在 37°C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。培养液中加 10 mmol/L HEPES 和青霉素、链霉素各 1.0 × 10⁵ U/L。在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 12 h, 使其诱导分化为巨噬细胞, 并以 50 mg/L ox-LDL 孵育细胞使其转化为 THP-1

巨噬细胞源性泡沫细胞。

1.3 Western blot 检测 TTP 和 p-TTP 的表达

培养 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞, 实验组加入 0 或 10 mg/L ApoA I 预处理细胞 2 h, PBS 洗后, 加入 0 或 10 μ g/L 脂多糖处理细胞 3 h, 对照组为不做处理的细胞, 收集各组细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 用缓冲液裂解细胞 10 min。4°C、12000 r/min 离心 10 min, 沿管壁小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白定量。取蛋白质样品加入适量 5 × SDS 上样缓冲液和 10% β -巯基乙醇, 100°C 煮 10 min, 置入 -20°C 冰箱备用。6% 或 10% SDS-PAGE 胶电泳(15 μ g 总蛋白量/泳道), 积层胶和分离胶分别为 80 V 和 120 V, 电泳后电转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:1000 加入一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次。1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h 或 4°C 冰箱过夜, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次。用 Western blot 荧光检测试剂盒显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 以内参的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较进行半定量分析。

1.4 实时定量 PCR 测定 IL-1 β mRNA 表达

不同因素处理 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞后加入放线菌素 D(act D, 5 mg/L) 终止转录, 分别在不同时间点(0、30、60、90、120 min) 收集各组细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA, 测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。用逆转录试剂盒(Fermentas 公司)合成 cDNA, 采用 Mx3000 Multiplex quantitative PCR system 系统, 以 SYBR 绿色荧光检测试剂盒进行实时定量 PCR 分析。引物序列: 人 IL-1 β 正义链 5'-TCC CTC CCT TAG TGC CAA CTA TGT-3', 反义链 5'-ACA GTC TCC ACA GTT CTG CCA TGT-3'; 人 TNF- α 正义链 5'-GCT T CC TCC AGA TGA GCTT-3', 反义链 5'-TGC TGT CCT TGC TGA GGG A-3'。所有产物应用 Melt 曲线分析。定量检测采用 $\Delta\Delta$ Ct 法, β -actin 的表达用做内参照, 根据检测受 ApoA I 影响的炎症因子 mRNA 表达值, 绘制动态曲线。

1.5 酶联免疫吸附法测定 IL-1 β 蛋白

THP-1 细胞以 5 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板, 以含 10% 的胎牛血清培养, 诱导分化为巨噬细胞后荷脂为泡沫细胞。不同因素处理细胞, 处理后收集培养基, 储存于 -20°C 冰箱备用。按说明书方法, 将 100 μ L 样品和标准品加入板孔, 盖上封板膜, 室温孵育 1 ~ 2 h。扣去孔内液体, 重复洗板 3 次。加入 50 ~ 100 μ L 生物素标记抗体, 轻轻地振荡混匀, 于

37℃温箱孵育 1~2 h。扣去孔内液体,每孔加入适量的洗涤液,轻轻地振荡 30 s,扣去孔内液体,再对着吸水纸拍几下,重复洗板 3 次。加入抗生物素蛋白链菌素-HRP,轻轻振荡混匀,静放于 37℃温箱孵育 60 min。重复洗板 3 次后,加入显色剂,37℃温箱孵育 10~20 min。加入终止液终止反应,立即于酶标仪 450 nm 波长读 OD 值。以测得的 OD 值为纵坐标,事先稀释好的标准品浓度为横坐标,输入 SPSS 表中,绘制标准曲线。根据标准曲线,计算出加入的待测样品浓度。

1.6 统计学方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

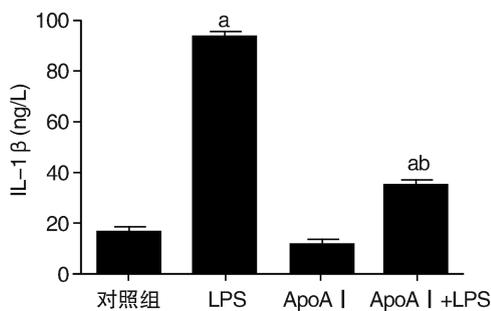


图 1. ApoA I 抑制脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 IL-1 β 蛋白和 mRNA 的表达 a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与脂多糖组比较。

Figure 1. ApoA I suppresses the expression of IL-1 β protein and mRNA in LPS-induced macrophage foam cells

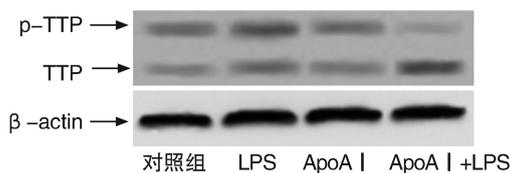


图 2. ApoA I 促进脂多糖作用下巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 去磷酸化

Figure 2. ApoA I affects the expression of TTP dephosphorylation in LPS-induced macrophage foam cells

2.3 TTP 去磷酸化介导 ApoA I 促进脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 IL-1 β mRNA 的降解

A I 显著促进脂多糖诱导的 IL-1 β mRNA 的降解,在处理 30 min 时,IL-1 β mRNA 开始降解(图 3)。

3 讨论

炎症反应参与 As 的始末,调节巨噬细胞炎症因子表达被认为是防治 As 的重要手段^[12,13]。研究发现, ApoA I 通过 ABCA1 介导的胆固醇流出可改变

2 结果

2.1 ApoA I 抑制脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞炎症因子的表达

与脂多糖处理组相比,脂多糖 + ApoA I 处理组 IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达水平显著下调,提示 ApoA I 对脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 IL-1 β 蛋白和 mRNA 表达均具有抑制作用(图 1)。

2.2 ApoA I 影响脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 去磷酸化

ApoA I 单独处理对巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 磷酸化表达没有影响,但在脂多糖作用下巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 磷酸化水平降低(图 2)。

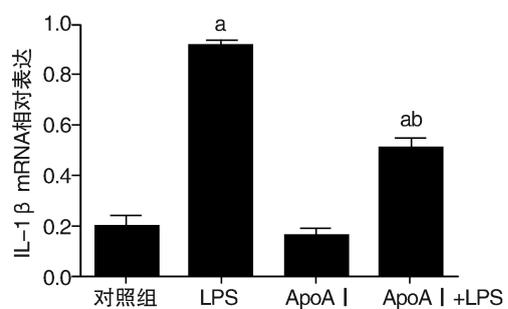


图 3. ApoA I 对脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 IL-1 β mRNA 降解的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$, 与脂多糖组比较。

Figure 3. The effects of ApoA I on the mRNA expression of IL-1 β in LPS-induced macrophage foam cells

细胞膜脂质筏结构,从而减弱 TLR4 相关的炎症信号通路^[14]。前期研究显示,用 ApoA I 处理脂多糖刺激的巨噬细胞源性泡沫细胞,发现 TTP 的表达明显上调,导致与 As 相关的炎症因子表达减少^[11]。本研究中, ApoA I 调节脂多糖处理的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞炎症因子表达与 TTP 翻译后修饰

有关,提示 ApoA I 影响 TTP 去磷酸化增强 TTP 功能,进而结合腺苷酸环尿苷酸丰富的元件 (adenylate uridylylate-rich element, ARE) 促进炎症因子 mRNA 降解。

炎症因子 mRNA 降解是调控炎症反应的一种重要形式, ARE 结合蛋白 (ARE-binding protein, ARE-BP) 与炎症因子 mRNA 的 ARE 序列相互作用是关键环节。ARE 定位于 mRNA 的 3'-UTR, 是一个具有调控表达作用的短序列-AUUUA/或富含 U 的序列^[15]。ARE 与 ARE-BP 相结合, 从而缩短或延长一些特定的 mRNA 的半衰期, 调控相关基因的表达。每一种 ARE-BP 都能独立的影响翻译或者降解含有 ARE 基序的 mRNA 分子。近来发现, TTP 可以加速含有 ARE 基序 mRNA 降解。TTP 属于 CCCH 锌指蛋白家族, 含有两个结合 RNA 所必需的 Cys-Cys-Cys-His 锌指结构, 能与多种炎症因子和趋化因子 mRNA 的 ARE 结合, 缩短 mRNA 的半衰期, 发挥其促进 mRNA 降解的作用^[16]。本研究中, ApoA I 影响脂多糖诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞 TTP 表达和 TTP 去磷酸化, 但是单独处理对 TTP 磷酸化并无明显影响, 而 TTP 被证实与含有 ARE 的 mRNA 降解有关, 提示 ApoA I 抑制泡沫细胞炎症因子表达的机制可能与 TTP 去磷酸化有关。Iwamoto 等^[17]发现 ApoA I 与其受体 ABCA1 结合后激活 Ca^{2+}/CaM 途径的下游信号, 其中包括与蛋白质磷酸化和去磷酸化相关的蛋白激酶和蛋白磷酸酶, ApoA I 是否通过此途径激活蛋白激酶和蛋白磷酸酶调节 TTP 去磷酸化还有待进一步研究。

总之, 本研究发现了 ApoA I 调节巨噬细胞源性泡沫细胞炎症因子表达的一种新的调节途径, 这为明确 TTP 磷酸化失活与机体慢性炎症状态以及 As 形成提供了新的实验依据。ApoA I 影响 TTP 去磷酸化的分子机制及其调节巨噬细胞源性泡沫细胞炎症因子表达的确切信号机制将在后续研究中进一步探讨。

[参考文献]

[1] Luo MJ, Thieringer R, Springer MS, et al. 11 β -HSD1 inhibition reduces atherosclerosis in mice by altering proinflammatory gene expression in the vasculature[J]. *Physiol Genomics*, 2013, 45 (1): 47-57.

[2] Smith JD. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2010, 11 (9): 989-996.

[3] Murphy AJ, Hoang A, Aprico A, et al. Anti-inflammatory functions of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein are preserved in

trimeric apolipoprotein A-I[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344 (1): 41-49.

[4] Patial S, Stumpo DJ, Lai WS, et al. Genetic deletion of an instability motif in the tristetraprolin (TTP) transcript: Implications for the treatment of systemic inflammation[J]. *FASEB J*, 2012, 26: 747-3.

[5] 王磊, 孙晗笑. ARE 结合蛋白 TTP 在炎症和病毒感染中的调节作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26 (7): 719-721.

[6] Schaljo B, Kratochvill F, Gratz N, et al. Tristetraprolin is required for full anti-inflammatory response of murine macrophages to IL-10 [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (2): 1 197-206.

[7] Stoecklin G, Anderson P. In a tight spot: ARE-mRNAs at processing bodies[J]. *Genes Dev*, 2007, 21 (6): 627-631.

[8] Clement SL, Scheckel C, Stoecklin G, et al. Phosphorylation of tristetraprolin by MK2 impairs AU-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 31 (2): 256-266.

[9] Sandler H, Stoecklin G. Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin [J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36 (Pt 3): 491-496.

[10] Shi JX, Su X, Xu J, et al. MK2 posttranscriptionally regulates TNF- α -induced expression of ICAM-1 and IL-8 via tristetraprolin in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302 (8): L793-799.

[11] Yin K, Deng X, Mo ZC, et al. Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (16): 13 834-845.

[12] Huang Q, Qin L, Dai S, et al. AIP1 suppresses atherosclerosis by limiting hyperlipidemia-induced inflammation and vascular endothelial dysfunction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33 (4): 795-804.

[13] McGraw AP, Bagley J, Chen WS, et al. Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2 (1): e000018.

[14] Yin K, Chen WJ, Zhou ZG, et al. Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19 (9): 823-836.

[15] Marimar Hernandez, Jose Antonio Gonzalez, Marina Martínez, et al. Binding of trans-regulatory elements to the 3'UTR adenine/uridine rich elements of human interleukin-3 mRNA[J]. *FASEB J*, 2013, 27: 780.3.

[16] Chang WL, Tarn WY. A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (19): 6 600-612.

[17] Iwamoto N, Lu R, Tanaka N, et al. Calmodulin interacts with ATP binding cassette transporter A1 to protect from calpain-mediated degradation and upregulates high-density lipoprotein generation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (7): 1 446-452.