

白细胞介素 4 对 THP-1 巨噬细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响

谈春芝¹, 谭玉林^{1,2}, 姚峰¹, 谢魏¹, 张敏¹, 李靛¹, 兰刚¹, 吴洁³, 唐朝克¹

(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, 医学研究中心, 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湘南学院免疫学重点学科, 病理研究所, 病理生理学教研室, 湖南省郴州市 423000; 3. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 白细胞介素 4; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 肝 X 受体 α ; 胆固醇流出; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨白细胞介素 4(IL-4) 对人类单核细胞株 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1) 表达及细胞内胆固醇流出的影响及机制。**方法** THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞加入不同浓度的 IL-4, 处理不同时间, 以及加入肝 X 受体 α (LXR α) 激动剂 T0901317 处理后, 采用半定量 RT-PCR 和 Western blot 分别检测细胞 ABCA1 及 LXR α mRNA 和蛋白质的表达, 采用油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况, 使用液体闪烁计数法检测细胞内胆固醇流出, 采用高效液相色谱法检测细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯的量。**结果** IL-4 能呈浓度和时间依赖性地降低 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达($P < 0.05$), 并减少细胞内胆固醇流出。加入 T0901317 后能使 IL-4 对 ABCA1 的抑制作用减弱($P < 0.05$)。**结论** IL-4 能抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 的表达及胆固醇的流出。LXR α 激活能逆转 IL-4 对 ABCA1 的抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Interleukin-4 on ATP-binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux in THP-1 Macrophage

TAN Chun-Zhi¹, TAN Yu-Lin^{1,2}, YAO Feng¹, XIE Wei¹, ZHANG Min¹, LI Jing¹, LAN Gang¹, WU Jie³, and TANG Chao-Ke¹

(1. Institute of Cardiovascular Diseases, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, Medical Research Center, Hunan Province Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Key Subject of Immunology, Institute of Pathology, Department of Pathophysiology, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China; 3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Interleukin-4; ATP-binding Cassette Transporter A1; Liver X Receptor α ; Cholesterol Efflux; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of IL-4 on ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression and cholesterol efflux in human THP-1 macrophage-derived foam cells. **Methods** THP-1 macrophage-derived foam cells were treated with different concentrations of IL-4, different time, and liver X receptor α (LXR α) agonist T0901317. Semi quantitative RT-PCR and Western blot were used to detect the expressions of ABCA1, LXR α mRNA and protein respectively. Lipid accumulation in cells was observed by oil red O staining. Intracellular cholesterol efflux was detected by using liquid scintillation counting method. Total cholesterol, free cholesterol and cholesterol ester were determined by high performance liquid chromatography. **Results** IL-4 significantly decreased the expression of ABCA1 in a concen-

[收稿日期] 2015-07-10

[修回日期] 2015-11-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170278、81370377); 湖南省自然科学基金面上项目(2015JJ2131); 湖南省卫生厅医药卫生科研计划课题项目(B2014-070)

[作者简介] 谈春芝, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 yanyanqiuzi@sohu.com。通讯作者谭玉林, 博士研究生, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 yltan1510@126.com。通讯作者唐朝克, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的分子机制, E-mail 为 tangchaoke@qq.com。

tration- and time-dependent manner, and inhibited cholesterol efflux in the THP-1 macrophage-derived foam cells ($P < 0.05$). T0901317 reversed the effect of IL-4 ($P < 0.05$). **Conclusions** IL-4 decreases ABCA1 expression and inhibits cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells. LXR α activation can reverse the inhibitory effect of IL-4 on ABCA1.

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 在胆固醇逆向转运途径第一步中发挥着重要的作用^[1]。ABCA1 基因的突变能引起丹吉尔病 (Tangier 氏病); 丹吉尔病是以 HDL 极低、胆固醇沉积于巨噬细胞、过早的产生动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 为特征。ABCA1 基因的突变亦能加剧 As, 这与增加动脉壁上巨噬细胞胆固醇含量及引起动脉壁炎症反应有关。胆固醇和肝 X 受体 (liver X receptor, LXR) 的活化能够影响 ABCA1 等靶基因的表达水平^[2]。白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4) 是炎症反应过程中一种重要的细胞因子, 参与 As 的形成。IL-4 可通过刺激巨噬细胞介导的炎症反应促进内皮细胞炎症和泡沫细胞形成而在 As 中发挥作用^[3]。IL-4 是否影响巨噬细胞胆固醇转运体 ABCA1 的表达及胆固醇的流出还不清楚, LXR α 是否参与 IL-4 对 ABCA1 表达的调节也尚未见报道。因此本实验主要探讨 IL-4 对细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

Trizol 试剂购自美国 Gibco 公司; AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司; Taq 酶购自北京天为时代公司; 所有引物由上海生工公司合成; 羊抗人 ABCA1 和 LXR α 辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗购自美国 Santa Cruz 公司; Blue Ranger 预染蛋白分子量标准、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白含量测定试剂和 Western blot 荧光检测试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司; 佛波酯、油红 O 和丽春红染色试剂购自 Sigma 公司; LXR α 激动剂 T0901317 购自 Cayman 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

采用超速离心法分离人血浆低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) (密度: 1.019 ~ 1.063 kg/L), 经琼脂糖电泳显示为单一蛋白带。将 LDL 置于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO₄ 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 溶液 (pH 7.2) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h。氧化后的 LDL 置于含 200 μmol 乙二胺四乙

酸的 PBS 中透析 24 h, 再用 PBS 透析 24 h, 过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在氧化过程中, LDL 中的脂过氧化物增加, 颜色也由淡黄色变为乳白色。琼脂糖电泳显示氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 的电泳迁移速率快于未氧化的 LDL。

1.3 细胞株的培养

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 THP-1 细胞, 静置于 5% CO₂ 培养箱中培养。在细胞处于对数生长期时进行实验, 并在实验前用 160 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 24 h, 诱导 THP-1 细胞贴壁成为巨噬细胞, 更换培养基后加入 ox-LDL 孵育 48 h, 使巨噬细胞转化成泡沫细胞, 再加入各项处理因素。

1.4 逆转录-聚合酶链反应检测 IL-4、LXR α mRNA 的表达

收集对照组和实验组细胞, 用 Trizol 试剂提取组织总 RNA, 溶于无核糖核酸酶水中, 紫外分光光度计测定 A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。取总 RNA 2 μg , 用 Promega 公司逆转录试剂盒合成 cDNA, 再取逆转录产物 10 μL 进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 循环。ABCA1 引物序列 (177 bp) 上游: 5'-GTATTTTTGCAAGGCTAC-CAGTTACATTTGACAA-3', 下游: 5'-GATTGGCTTCAGGATGTCCATGTTGGAA-3'; 人 LXR α 引物序列 (232 bp) 上游: 5'-GATGTTCCCACGGATGCTAATG-3', 下游: 5'-CAGGAATGTTGCCCTCCTCA-3'; 人 GAPDH 引物序列 (496 bp) 上游: 5'-CAAGGTCATC-CATGACAACCTTTG-3', 下游: 5'-GTCCACCACCCTGT-TGCTGTAG-3'; PCR 扩增产物长度为 308 bp。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 延伸, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 继续延伸。逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 结束后, 取产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 加样量均为 10 μL , 溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统测定, 分析待测基因 mRNA 表达的差异。

1.5 免疫印迹法检测 IL-4、LXR α 蛋白的表达

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入裂解液裂解细胞后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 g 离心力离心 7 min, 小心吸

出上清液,用 BCA 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质/泳道,加入 1/4 体积 $5 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 使蛋白变性。60 V 积层胶,120 V 分离胶,电泳分离细胞蛋白质,再用半干转膜仪以 60~100 mA 转膜 1 h,将蛋白质转移至二氟化树脂膜上,丽春红染色观察转移效果。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6~12 h;TBST (tris-buffered saline and tween 20) 洗膜 3 次,每次 5~10 min;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4~8 h;TBST 洗膜 3 次,每次 5~10 min。然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,显示于 X 光片,显影,定影后用凝胶成像系统进行图像分析。

1.6 油红 O 染色观察 THP-1 细胞内脂质

将细胞培养于放有消毒盖玻片的 6 孔培养板内,细胞被处理后,用 PBS 洗 3 次,50% 异丙醇固定 1 min,油红 O 染色液染色 10 min,苏木素染色 5 min,1% HCl 分色及返蓝后,水性封片剂封片。显微镜下观察,细胞内脂质呈红色,细胞核呈蓝色,图像分析系统收集图像并显微镜下摄像。

1.7 高效液相色谱分析细胞内总胆固醇含量

待细胞处理结束后,弃培养基,PBS 洗 3 遍,加入细胞裂解液 200 mL,反复冻融 3 次裂解细胞,BCA 法定量蛋白后,7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,800 g 离心力离心 10 min,取上清进行胆固醇检测,以豆甾醇为内标。取 100 mL 上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 mL,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品。各样品分别与内标液混匀,用正己烷和无水乙醇抽提后,1.5 mol/L 三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥,100 μL 乙晴-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 $^{\circ}\text{C}$,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,计算值以细胞蛋白含量校正。

1.8 胆固醇流出实验

THP-1 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液用 0.2 mCi/L [^3H] 胆固醇共同孵育 24 h,用 PBS 液洗涤细胞后,将细胞置于含载脂蛋白 A1 (apolipoprotein-A1, ApoA1) 而不含胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,共培养 24 h。PBS 洗涤后,闪烁液裂解细胞,最后用液体闪烁计法检测培养液和细胞中的 [^3H] 标记的胆固醇。胆固醇流出率用培养液中每分钟记数 (counts per minute, CPM) 除以总 CPM (培养液 CPM + 细胞 CPM),再乘以 100% 来表示。

1.9 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 t 检验,由 SPSS 19.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

为了观察 IL-4 对 ABCA1 的表达是否有影响,我们首先采取不同浓度(0、4、16、64 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的 IL-4 孵育巨噬细胞源性泡沫细胞 24 h,通过半定量 RT-PCR 测定细胞内 ABCA1 mRNA 变化。结果显示,IL-4 呈浓度依赖性减少 ABCA1 mRNA 的表达(图 1)。

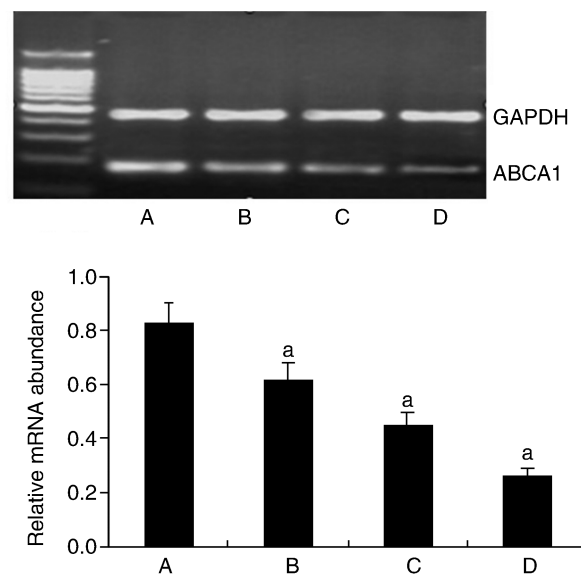


图 1. 不同浓度 IL-4 对 ABCA1 mRNA 表达的影响 ($n=3$) A 为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ IL-4 组, B 为 4 $\mu\text{g}/\text{L}$ IL-4 组, C 为 16 $\mu\text{g}/\text{L}$ IL-4 组, D 为 64 $\mu\text{g}/\text{L}$ IL-4 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ IL-4 组比较。

Figure 1. Effect of different concentrations of IL-4 on the expression of ABCA1 mRNA ($n=3$)

2.2 不同浓度 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白表达的影响

随后我们又观察了不同浓度 IL-4 对 TH-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白表达的影响。Western blot 结果显示:IL-4 亦能呈浓度依赖性的降低 ABCA1 蛋白的表达(图 2)。

2.3 IL-4 处理不同时间对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 及蛋白表达的影响

观察完不同浓度 IL-4 对 TH-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达的影响后,接着我

们又观察了 16 $\mu\text{g/L}$ IL-4 处理不同时间对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白的影响, 结果同样发现 IL-4 呈时间依赖性减少 ABCA1 mRNA 及蛋白的表达(图 3、图 4)。

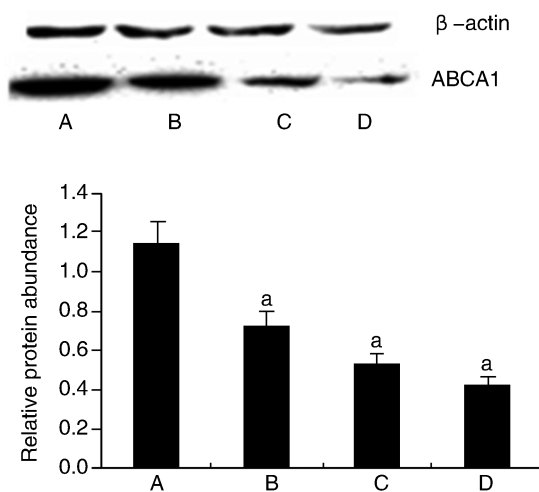


图 2. 不同浓度 IL-4 对 ABCA1 蛋白表达的影响 ($n=3$)

A 为 0 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, B 为 4 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, C 为 16 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, D 为 64 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组比较。

Figure 2. Effect of different concentrations of IL-4 on the expression of ABCA1 protein ($n=3$)

2.4 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响

为了进一步观察 IL-4 对 TH-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的影响, 在形态学方面, 我们通过油红 O 染色观察不同浓度 IL-4 处理细胞后细胞脂质的蓄积情况。结果显示, 随着 IL-4 浓度增加, 脂质蓄积增加(图 5)。

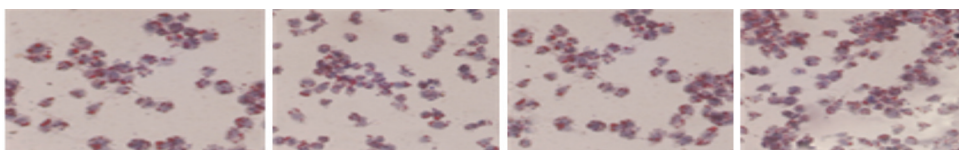


图 5. 不同浓度 IL-4 处理 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的油红 O 染色 ($\times 40$, $n=3$)

自左至右为 0 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, 4 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, 16 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, 64 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组。

Figure 5. Oil red O staining of THP-1 macrophage-derived foam cells treated with different concentrations of IL-4 ($\times 40$, $n=3$)

2.5 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响

ABCA1 在胆固醇逆向转运及维持细胞内胆固醇稳态过程中起重要作用。上述实验我们已发现 IL-4 呈浓度依赖性和时间依赖性的下调 THP-1 巨

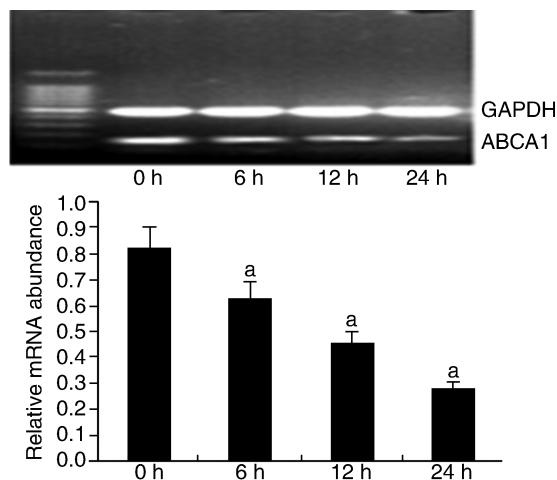


图 3. 不同时间 IL-4 对 ABCA1 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 3. Effect of different treatment times of IL-4 on the expression of ABCA1 mRNA ($n=3$)

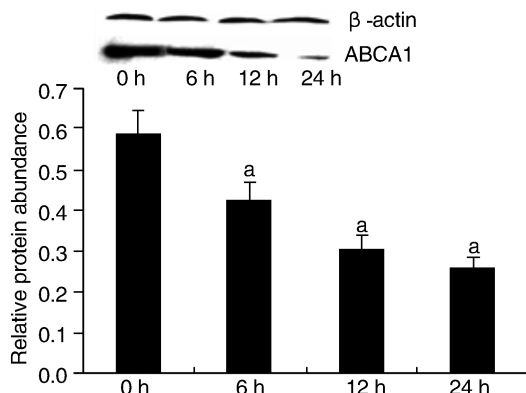


图 4. IL-4 处理不同时间对 ABCA1 蛋白表达的影响 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 4. Effect of different treatment times of IL-4 on the expression of ABCA1 protein ($n=3$)

噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达。胆固醇的逆向转运其中较关键一步是通过贫脂的 ApoA1 而发挥作用, ApoA1 是 ABCA1 的配体, 继而激活 ABCA1 促进胆固醇的流出。为了进一步探讨 IL-4 对 ABCA1 功能的影响, 我们采用液体闪烁计法

检测其对胆固醇流出的影响,用高效液相色谱仪检测细胞内胆固醇酯的含量,结果显示随着 IL-4 浓度的增高,细胞内胆固醇流出相应的减少(图 6)。相对应细胞内胆固醇流出减少,细胞内的胆固醇酯就相对增加(表 1)。

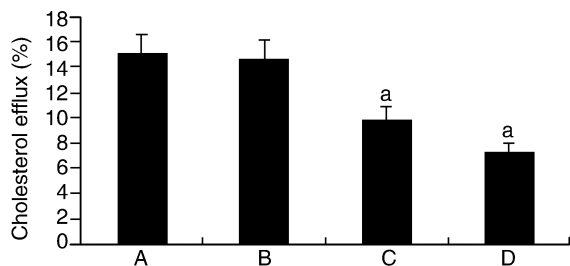


图 6. 不同浓度 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响($n=3$) A 为 0 μg/L IL-4 组, B 为 4 μg/L IL-4 组, C 为 16 μg/L IL-4 组, D 为 64 μg/L IL-4 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 μg/L IL-4 组比较。

Figure 6. Effect of different concentrations of IL-4 on cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells ($n=3$)

表 1. IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞内胆固醇含量的影响($n=3$)

Table 1. Effect of IL-4 on cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cells ($n=3$)

项 目	0 μg/L IL-4 组	4 μg/L IL-4 组	16 μg/L IL-4 组	64 μg/L IL-4 组
TC (mg/g)	469 ± 51	500 ± 48	667 ± 57 ^a	762 ± 49 ^a
FC (mg/g)	178 ± 38	201 ± 41	286 ± 45 ^a	302 ± 44 ^a
CE (mg/g)	291 ± 30	299 ± 46	381 ± 52 ^a	460 ± 32 ^a
CE/TC	62.0%	59.8%	57.1%	60.4%

TC: 总胆固醇 (total cholesterol); FC: 游离胆固醇 (free cholesterol); CE: 胆固醇酯 (cholesterol ester)。a 为 $P < 0.05$, 与 0 μg/L IL-4 组比较。

同样我们亦观察了 16 μg/L IL-4 处理不同时间对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响,结果显示,IL-4 亦能呈时间依赖性的抑制胆固醇流出(图 7)。

2.6 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞 LXRα 表达的影响

有研究表明,ABCA1 是 LXRα 的靶基因,许多促炎因子均能通过影响 LXRα 从而下调 ABCA1 来促进 As 的发生发展。IL-4 是否也能够通过影响 LXRα 的表达,从而发挥对 ABCA1 的调节作用? 因此我们也观察了不同浓度及不同时间 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXRα mRNA 及蛋白质表达的影响。首先我们观察不同浓度(0、4、16、64 μg/L) IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXRα mRNA 表达的

影响,RT-PCR 结果表明:IL-4 呈浓度依赖性的减少 LXRα mRNA 的表达($P < 0.05$;图 8)。

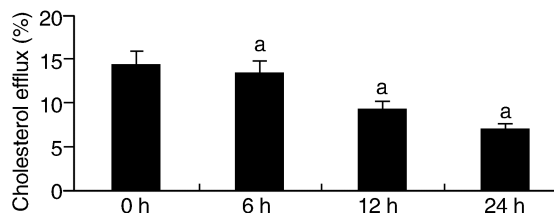


图 7. 不同时间 IL-4 对胆固醇流出的影响($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

Figure 7. Effect of different treatment times of IL-4 on cholesterol efflux ($n=3$)

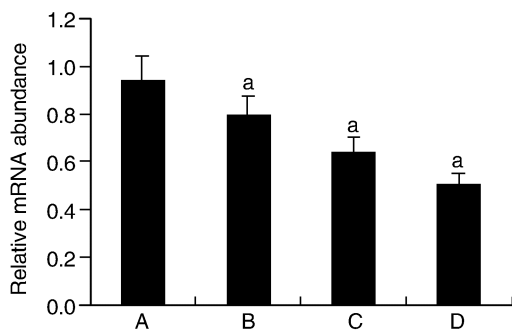
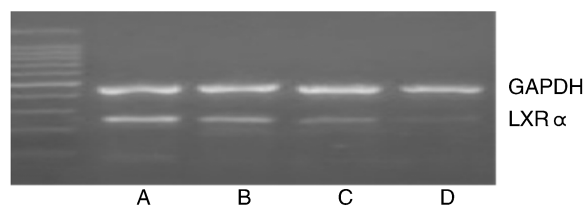


图 8. 不同浓度 IL-4 对 LXRα mRNA 表达的影响($n=3$)

A 为 0 μg/L IL-4 组, B 为 4 μg/L IL-4 组, C 为 16 μg/L IL-4 组, D 为 64 μg/L IL-4 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 μg/L IL-4 组比较。

Figure 8. Effect of different concentrations of IL-4 on the expression of LXRα mRNA ($n=3$)

同样,我们观察了不同浓度 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXRα 蛋白表达的影响,得到与 ABCA1 一致的结果;Western blot 结果显示,IL-4 能呈浓度依赖性的降低 LXRα 蛋白表达(图 9)。

2.7 T0901317 对 IL-4 处理的 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞予以 16 μg/L IL-4 处理,可见 ABCA1 蛋白表达水平较对照组明显减少,IL-4 + T0901317 (10 μmol/L; LXRα 激动剂)组较对照组 ABCA1 表达亦减少($P < 0.05$),但 IL-4 + T0901317 组较 IL-4 组 ABCA1 蛋白表达水平相对增加($P < 0.05$)。说明 T0901317 能部分逆转 IL-4 对 ABCA1 的作用,从另一方面说明 LXRα 可能参与

了 IL-4 下调 ABCA1 的表达 (图 10)。

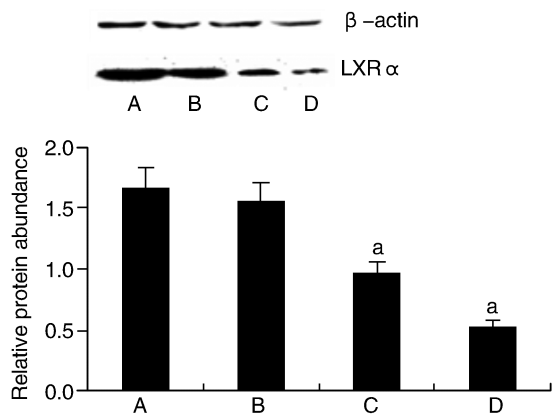


图 9. 不同浓度 IL-4 对 LXR α 蛋白表达的影响 ($n=3$)

A 为 0 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, B 为 4 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, C 为 16 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组, D 为 64 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{g/L}$ IL-4 组比较。

Figure 9. Effect of different concentrations of IL-4 on the expression of LXR α protein ($n=3$)

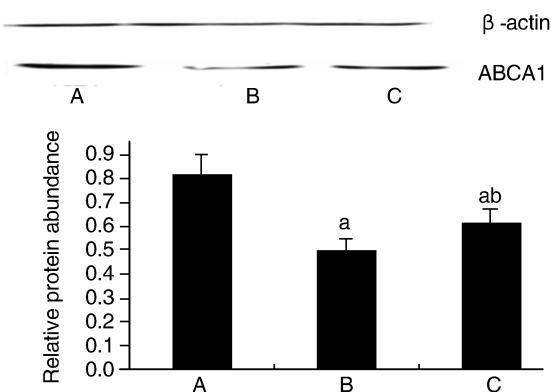


图 10. T0901317 与 IL-4 对 ABCA1 表达的影响 ($n=3$)

A 为对照组, B 为 IL-4 组, C 为 IL-4 + T0901317 组。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 IL-4 组比较。

Figure 10. Effect of T0901317 and IL-4 on the expression of ABCA1 ($n=3$)

3 讨论

血管内皮损伤与功能紊乱是 As 等心血管疾病的启动和进展因素。炎症参与 As 的全过程, 内皮细胞在氧化低密度脂蛋白、各种理化因素及感染刺激下, 产生各种促炎因子, 促使单核细胞向泡沫细胞转化, 刺激平滑肌细胞的增殖和向内膜的迁移, 并形成瀑布链式反应, 继续释放炎症因子使内膜增厚形成脂质斑块, 从而导致 As 发生^[4]。

ABCA1 是一种跨膜蛋白, 广泛存在于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核/巨噬细胞等。它以 ATP 为能源, 促进细胞内游离胆固醇流出, 在清除

胆固醇方面发挥重要作用。因此 ABCA1 功能障碍将会促进 As 的发生发展^[5]。

ABCA1 的表达受多因素调控, 包括转录水平和转录后水平的调节。多种促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-1 β 、C 反应蛋白和干扰素 γ 等在转录水平通过 LXR α 下调 ABCA1 的表达, 从而抑制胆固醇的流出^[6]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、二十碳五烯酸、钙蛋白酶和钙调蛋白等在转录后水平通过降低 ABCA1 的稳定性加速其降解^[7]。这些均提示在炎症影响下 ABCA1 的表达受多因素调控。

IL-4 是多功能促炎因子, 而 15-脂氧合酶 (15-lipoxygenase, 15-LO) 是脂质过氧化酶, 通过促进内皮细胞炎症和泡沫细胞形成而在 As 中发挥着重要作用。Lee 等^[8]在人内皮细胞研究中发现 IL-4 能够使转录因子 6、激活蛋白因子 2、GATA 结合转录因子 1、核因子 1 以及特定蛋白 1 活化从而使 15-LO 表达上调。有学者在鼠中发现 15-LO 通过 p38 和 JNK2 途径下调 ABCA1, 证实 ABCA1/ABCG1 在胆固醇逆向转运中发挥着重要作用。血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 能够广泛上调不同促炎介质, 如 IL-1 β 、TNF- α 和 LPS, 刺激淋巴细胞和单核细胞黏附在血管内皮表面, 促进 As 的发生发展^[3]。IL-4 通过上调 VCAM-1 而使更多的粒细胞黏附至血管内皮, 同时 IL-4 能够协同 IL-1 β 、TNF- α 、LPS 诱导血管内皮细胞 VCAM-1 表达上调。在血管内皮细胞中 IL-4 可上调 E-选择素的表达^[8]。在 As 早期均能检测到单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 的表达上调, MCP-1 缺乏能显著减少 LDLR^{-/-} 小鼠的 As 病变, 而 L-4 可刺激血管内皮细胞 MCP-1 的合成与分泌^[9]。IL-6 是一个多功能促炎细胞因子, 其有 212 个氨基酸残基。在人血管内皮细胞中 IL-4 能够协同 TNF- α 、IL-1 β 和 LPS 诱导产生 IL-6^[10]; IL-4 可诱导 IL-6 表达上调^[9]。

Dai 等^[11]发现 LXR α 激动剂 T0901317 能够促进 ApoE^{-/-} 小鼠动脉、肝脏和小肠中 ABCA1 基因和蛋白表达, 明显增加外周巨噬细胞胆固醇的流出。我们也发现干扰素 γ 可以通过 JAK/STAT1/LXR α 信号通路减少 ABCA1 表达及胆固醇流出^[12]。本研究中我们发现, IL-4 能够明显抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 的表达及胆固醇的流出。

LXR 是配体依赖性的核转录因子, 属于孤儿核受体超家族成员之一, 通过与维甲酸 X 受体结合形成异二聚体, 作用于 ABCA1 启动子参与调节 AB-

CA1 表达,可调控与脂质代谢及炎症反应有关的多个重要蛋白质的表达,在维持胆固醇内稳态和调节炎症反应中发挥重要作用^[13-15]。

本研究油红 O 染色结果显示,随着 IL-4 浓度的增加,巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积越来越多,说明 IL-4 参与 As 的形成;同时我们亦观察了不同浓度及处理时间的 IL-4 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 及 LXR α 表达的影响,结果显示:IL-4 能呈浓度梯度和时间依赖性地减少 ABCA1 及 LXR α 的 mRNA 及蛋白的表达;我们用液体闪烁计法检测了胆固醇流出,结果显示,随着细胞孵育 IL-4 浓度及时间的增加,胆固醇流出减少,相应地,细胞内胆固醇酯的含量增多;我们观察了 LXR α 激动剂 T0901317 对 IL-4 处理的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响,结果证实 T0901317 明显减弱了 IL-4 对 ABCA1 的抑制作用。

综上所述,IL-4 能够呈浓度及时间依赖性的下调 ABCA1 的表达,减少细胞内胆固醇流出。其可能机制为 IL-4 在转录水平通过影响 LXR α 从而发挥对 ABCA1 的表达及对细胞内胆固醇流出的影响。这为 IL-4 在 As 发生发展中的作用机制提供了新的视觉角度,为 As 的干预提供了新靶点。

[参考文献]

- [1] Francone OL, Royer L, Boucher G, et al. Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in ABCA1-deficient macrophages[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6): 1 198-1205.
- [2] Ji A, Wroblewski JM, Cai L, et al. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(3): 446-455.
- [3] 谈春芝, 吴洁, 唐朝克. 白细胞介素 4 与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, (2): 155-159.
- [4] Lee YW, Hirani AA. Role of interleukin-4 in atherosclerosis[J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(1): 1-15.
- [5] 曹冬黎, 尹凯, 莫中成, 等. 脂多糖通过核因子- κ B 途径下调泡沫细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, (5): 540-548.

- [6] Jiang J, Mo ZC, Yin K, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF-alpha-induced NF-kappa B activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(5): 946-956.
- [7] Yokoyama S, Arakawa R, Wu CA, et al. Calpain-mediated ABCA1 degradation: post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(3): 547-551.
- [8] Lee YW, Eum SY, Chen KC, et al. Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells[J]. *Mol Med*, 2004, 10(1-6): 19-27.
- [9] Wang Y, Zhu M, Xu H, et al. Role of the monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine receptor 2 signaling pathway in transient receptor potential vanilloid type 1 ablation-induced renal injury in salt-sensitive hypertension[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(9): 1 223-234.
- [10] Chen CC, Manning AM. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells[J]. *Cytokine*, 1996, 8(1): 58-65.
- [11] Dai XY, Ou X, Hao XR, et al. The effect of T0901317 on ATP-binding cassette transporter A1 and Niemann-Pick type C1 in apoE^{-/-} mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, 51(5): 467-475.
- [12] 唐朝克, 易光辉, 王佐, 等. 干扰素- γ 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, (2): 127-133.
- [13] Gonzalez-Granillo M, Steffensen KR, Granados O, et al. Soy protein isoflavones differentially regulate liver X receptor isoforms to modulate lipid metabolism and cholesterol transport in the liver and intestine in mice[J]. *Diabetologia*, 2012, 55(9): 2 469-478.
- [14] De Boussac H, Maqdasy S, Trousson A, et al. Enolase is regulated by liver X receptors[J]. *Steroids*, 2015, 99(Pt B): 266-271.
- [15] Liu J, Liu Y, Sun YN, et al. miR-28-5p involved in LXR-ABCA1 pathway is increased in the plasma of unstable angina patients[J]. *Heart Lung Circ*, 2015, 24(7): 724-730.

(此文编辑 曾学清)