

# 阿米洛利抑制载脂蛋白 A1 诱导小鼠巨噬细胞 ABCA1 的降解

莫显刚<sup>1</sup>, 王 兰<sup>1</sup>, 洪 伟<sup>2</sup>, 张 莉<sup>1</sup>, 代陆军<sup>3</sup>, 蒋 金<sup>3</sup>

(贵州医科大学 1.附属医院老年病科, 2.分子生物学重点实验室, 3.附属医院病理科, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 阿米洛利; 钠氢交换体 1; 载脂蛋白 A1; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 钙蛋白酶; ALLN

[摘 要] 目的 探讨钠氢交换体 1 抑制剂阿米洛利对载脂蛋白 A1(ApoA1)诱导小鼠三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)降解的影响。方法 给小鼠静脉注射 ApoA1 后不同时间点收集腹腔巨噬细胞,定量实时聚合酶链反应及 Western blot 检测巨噬细胞 ABCA1 mRNA 及蛋白水平变化。进而,ApoA1 干预 8 h 小鼠给予腹腔注射阿米洛利或钙蛋白酶抑制剂 ALLN,实验分为 4 组:对照组、阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组,Western blot 检测巨噬细胞 ABCA1 蛋白水平,荧光法检测钙蛋白酶活性。结果 ApoA1 干预小鼠后 ABCA1 mRNA 无明显改变,而 ABCA1 蛋白水平迅速升高,8 h 达高峰后逐渐降低。阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组 ABCA1 蛋白水平均比对照组高;在 0、4、8 h 时间点,阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组间 ABCA1 蛋白水平差异无统计学意义;而在 12、16 h 时间点,阿米洛利+ALLN 组 ABCA1 蛋白水平较阿米洛利组、ALLN 组升高。与对照组比较,阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组钙蛋白酶活性均降低;阿米洛利组、ALLN 组、阿米洛利+ALLN 组 3 组组间比较,钙蛋白酶活性各时间点均无明显差异。结论 阿米洛利在活体内抑制 ApoA1 诱导 ABCA1 蛋白降解及钙蛋白酶活性,提示钠氢交换体 1 可能至少部分通过改变钙蛋白酶活性参与 ABCA1 的降解。

[中图分类号] Q46 [文献标识码] A

## Amiloride Inhibits the Degradation of Apolipoprotein A1-induced ABCA1 in Mice Macrophage

MO Xian-Gang<sup>1</sup>, WANG Lan<sup>1</sup>, HONG Wei<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, DAI Lu-Jun<sup>3</sup>, and JIANG Jin<sup>3</sup>

(1.Department of Geriatrics, 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2.Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] Amiloride; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger-1; Apolipoprotein A1; ATP Binding Cassette Transporter A1; Calpain; ALLN

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 (NHE1) inhibitor amiloride on the degradation of apolipoprotein A1 (ApoA1)-induced ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in the mice macrophages.

**Methods** The peritoneal macrophages were collected from the mice at various indicated time points after intravenous injection of ApoA1. ABCA1 mRNA and protein levels in the macrophages were determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. Furthermore, the mice intervened with ApoA1 for 8 h were intraperitoneally injected with amiloride or calpain inhibitor ALLN. The treated mice were divided into four groups: control group, amiloride group, ALLN group and amiloride+ALLN group. ABCA1 protein was detected by Western blot and calpain activity was assessed by fluorescence method in macrophages. **Results** After mice intervened with ApoA1, ABCA1 mRNA had no obvious change, but the level of ABCA1 protein increased rapidly, and reached the peak at 8 h, then gradually declined. The ABCA1 protein levels were higher in amiloride group, ALLN group and amiloride+ALLN group than that in control group. The differences of ABCA1 protein level were not statistically significant in amiloride group, ALLN group

[收稿日期] 2015-07-21 [修回日期] 2015-09-15

[基金项目] 国家自然科学基金(31260250)

[作者简介] 莫显刚,博士,副主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向为老年心血管疾病基础及临床,E-mail 为 moxiangang123@126.com。王兰,硕士研究生,主要研究方向为老年心血管疾病基础及临床。洪伟,博士,讲师,主要研究方向为基因功能。

and amiloride+ALLN group at 0, 4 and 8 h. Whereas the ABCA1 protein level in amiloride+ALLN group was higher than those in amiloride group and ALLN group at 12 and 16 h. Compared with the control group, calpain activities were decreased in amiloride group, ALLN group and amiloride+ALLN group. There were no obvious differences in calpain activity among amiloride group, ALLN group and amiloride+ALLN group at each time point. **Conclusions** Amiloride inhibits the degradation of ApoA1-induced ABCA1 and calpain activity in mice peritoneal macrophages in vivo. It indicates that NHE1 may be involved in ABCA1 degradation at least in part by changing the activity of calpain.

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 是胆固醇逆转运的重要蛋白, 可将细胞内的胆固醇转运出细胞外, 在抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 中发挥重要作用。ABCA1 拥有 PEST 结构域, 可被钙蛋白酶 (calpain) 识别及降解<sup>[1]</sup>。钠氢交换体 1 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger-1, NHE1) 是调节细胞内 pH 值及细胞体积的重要膜蛋白, 抑制或下调 NHE1 可抑制钙蛋白酶活性<sup>[2,3]</sup>, NHE1 抑制剂亦可通过多途径包括抑制钙蛋白酶活性等途径抗 As<sup>[2,4]</sup>。但 NHE1 抑制剂能否影响体内钙蛋白酶活性参与 ABCA1 降解却鲜见报道。本文拟探讨 NHE1 抑制剂阿米洛利对载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 诱导小鼠 ABCA1 降解的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

ABCA1 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号: ab18180), 钙蛋白酶活性测定试剂盒 (BioVision 公司, 货号: K240-100), NHE1 抑制剂阿米洛利 (Sigma 公司, 货号: 1019701), ApoA1 (Sigma 公司, 货号: A0722), 钙蛋白酶抑制剂 ALLN (N-acetyl-Leu-Leu-Norleucinal; Sigma 公司, 货号: A6185), NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> 3%~8% Tris-Acetate 蛋白分离胶 (Life 科技公司, 货号: EA0378BOX)。

### 1.2 实验动物及分组

健康 C57BL/6 小鼠, 体重 20~25 g, 雄性, 高脂饮食喂养 1 周, 自由饮水。实验分为两步, (1) 检测 ApoA1 对 ABCA1 蛋白水平的影响: ApoA1 按 10 mg/kg 股静脉注射小鼠, 根据注射后时间, 分为 0、4、8、12、16、20、24 h 七组, 各组 3 只, 收集腹腔巨噬细胞, Western blot 检测各时间点 ABCA1 蛋白量; (2) 检测阿米洛利对 ABCA1 降解及钙蛋白酶活性的影响: ApoA1 干预 8 h 小鼠, 给予腹腔注射阿米洛利 (10 mg/kg) 或/和钙蛋白酶抑制剂 ALLN (10 mg/kg), 分为对照组、阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组, 收集腹腔注射后 0、4、8、12、16 h 腹腔巨噬细胞, 检测 ABCA1 蛋白表达及钙蛋白酶活性。

### 1.3 巨噬细胞的分离与纯化

参照文献[5]方法颈椎脱臼处死小鼠, 用 75% 酒精消毒, 腹腔注射 RPMI 1640 培养液约 3 mL。棉球轻揉腹腔 3 min 后, 收集腹腔液, 以 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用含 15% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至  $2 \times 10^9/\text{L}$ 。将巨噬细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中, 置 5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ 培养 2 h, 再用 RPMI 1640 培养液洗去未贴壁的细胞, 即得纯化的小鼠腹腔巨噬细胞。

### 1.4 qRT-PCR 检测 ABCA1 mRNA

提取 ApoA1 注射后各时间点小鼠腹腔巨噬细胞总 RNA, 提取过程严格按照总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒说明操作。ABCA1 引物: 正向 5'-GC-CCTACTGTCGGTTGACAT-3', 逆向 5'-CCTGGGT-TAGAGAGATGCACA-3';  $\beta$ -actin 引物: 正向 5'-CAGTTGGTTGGAGCAAACATCC-3', 逆向 5'-GAGG-GACTTCCTGTAACCACTT-3'。定量实时聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 25  $\mu\text{L}$  反应体系包括: SYBRGreen qRT-PCR 反应混合物 12.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ABCA1 或  $\beta$ -actin 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 进行 40 个循环, 所有样本的 CT 值均由荧光定量 PCR 扩增仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 型号: GeneAmp7300) 读取, 得到样本中 ABCA1 和  $\beta$ -actin 的 Ct 值。各目的基因的表达差异用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  进行分析。

### 1.5 Western blot 检测 ABCA1 表达及降解

按实验分组收集腹腔巨噬细胞, 提取组织总蛋白, Bradford 比色法测定蛋白含量后, 取 60  $\mu\text{g}$  总蛋白变性 5 min, NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> 3%~8% 预制分离胶电泳分离蛋白, ABCA1 蛋白 80 V 恒压过夜转印至二氟化树脂膜; 膜置于含有 5% 脱脂牛奶的 TBS/T 室温封闭 1 h; 分别用相应兔抗小鼠 ABCA1 (1:1000)、兔抗小鼠  $\beta$ -actin (1:2000) 抗体 4℃ 孵育 8 h, TBS/T 洗膜后, 采用辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG (1:2500)、山羊抗兔 IgG (1:5000) 37℃ 孵育 1 h, TBS/T 洗膜。化学发光法显影定影, 摄像, 并用 Image J 软件分析条带。

### 1.6 小鼠巨噬细胞钙蛋白酶活性检测

参考文献[6]并按钙蛋白酶活性测定试剂盒操

作。取各组小鼠腹腔巨噬细胞  $1\times 10^6$  个细胞离心后,加入提取缓冲液重悬置于冰上 20 min,轻轻拍打 4 次混匀,10000 g 离心力离心 1 min,取上清,测蛋白浓度,取 100  $\mu\text{g}$  蛋白加入 85  $\mu\text{L}$  提取缓冲液,加入 10  $\mu\text{L}$  10 $\times$ 反应缓冲液及 5  $\mu\text{L}$  钙蛋白酶荧光标记底物,避光 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,以 400 nm 激发波长、505 nm 发射波长检测相对荧光值。

1.7 统计学分析

实验所得数据采用  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间均值比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK-q 检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ApoA1 对巨噬细胞 ABCA1 mRNA 及蛋白表达的影响

给小鼠静脉注射 10 mg/kg ApoA1,qRT-PCR 结果显示 ApoA1 干预不同时间小鼠的巨噬细胞 ABCA1 mRNA 表达无明显差异 ( $P>0.05$ ),提示 ApoA1 对小鼠体内巨噬细胞 ABCA1 基因转录水平无显著影响(图 1A)。注射 ApoA1 后 ABCA1 蛋白水平逐渐升高,8 h 达最高,12 h 开始下降,24 h 降到基线水平(图 1B、C)。

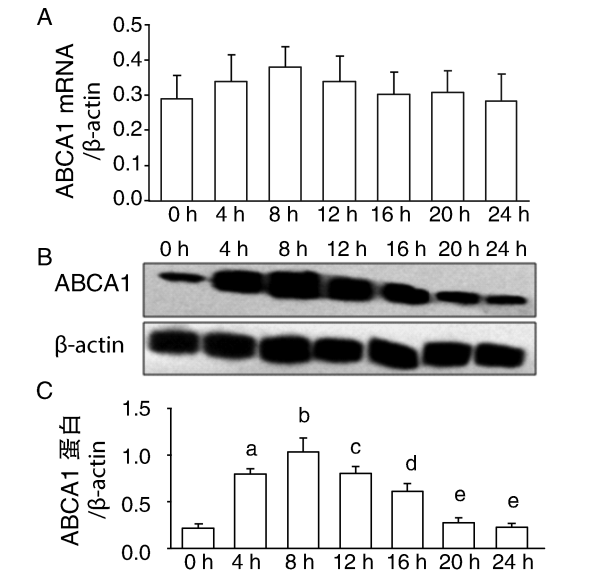


图 1. ApoA1 对巨噬细胞 ABCA1 mRNA 及蛋白水平的影响  
A 为 qRT-PCR 结果;B 为 Western blot 代表图;C 为 Western blot 定量分析结果。a 为  $P<0.05$ ,与 0 h 组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 4 h 组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 8 h 组比较;d 为  $P<0.05$ ,与 12 h 组比较;e 为  $P<0.05$ ,与 16 h 组比较。  
Figure 1. Effect of ApoA1 on ABCA1 mRNA and protein levels in macrophage

2.2 阿米洛利对巨噬细胞 ABCA1 蛋白的影响

ApoA1 干预小鼠 ABCA1 达到峰值,腹腔注射阿米洛利或 ALLN 后于各时间点用 Western blot 检测 ABCA1 量,结果显示 0 h 时间点各组蛋白量无差异,不论是阿米洛利组、ALLN 组,还是阿米洛利+ALLN 组,4 到 16 h 各时间点 ABCA1 蛋白水平较对照组均增高(均  $P<0.05$ ),提示 ABCA1 蛋白降解减慢(图 2)。不同干预组 0、4、8 h 时间点,ABCA1 蛋白表达量无明显差异;在 12、16 h 时间点,ABCA1 蛋白量在阿米洛利组及 ALLN 组间无差异,而阿米洛利+ALLN 组较阿米洛利组、ALLN 组均增高(均  $P<0.05$ ;图 2)。

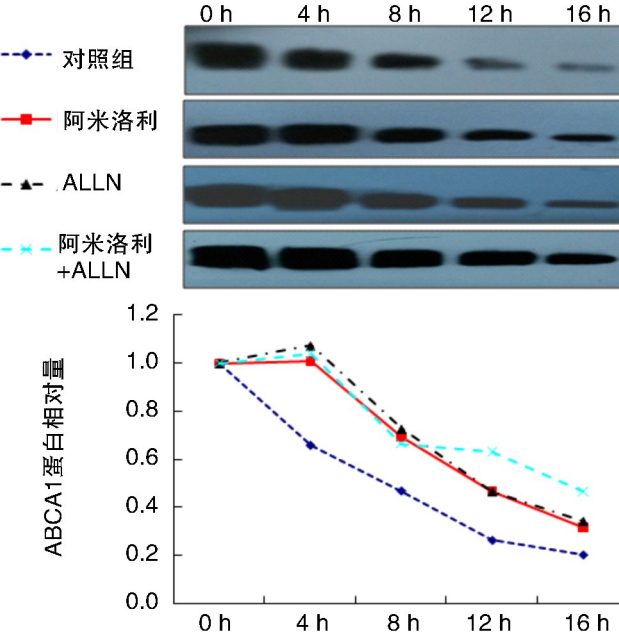


图 2. 阿米洛利及 ALLN 对 ABCA1 蛋白水平的影响  
Figure 2. Effect of amiloride and ALLN on ABCA1 protein level

2.3 阿米洛利对巨噬细胞钙蛋白酶活性的影响

为探讨 ABCA1 的降解与钙蛋白酶活性的关系,运用荧光法检测阿米洛利干预小鼠不同时间巨噬细胞钙蛋白酶活性。各组不同时间点活性检测结果提示,随时间延长,小鼠巨噬细胞钙蛋白酶活性逐渐增强或有增强趋势。4 组各个时间点比较,0 h 各组钙蛋白酶活性差异无统计学意义;与对照组比较,阿米洛利组在 4、8、12、16 h 时间点钙蛋白酶活性均明显减低,类似地,ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组分别在各个时间点明显减低钙蛋白酶活性;但阿米洛利组、ALLN 组及阿米洛利+ALLN 组在各时间点进行比较,钙蛋白酶活性差异无统计学意义(图



3)。

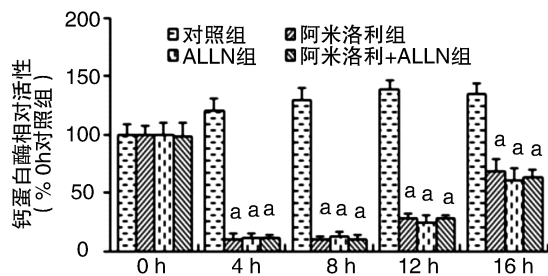


图 3. 阿米洛利及 ALLN 对钙蛋白酶活性的影响 a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Figure 3. Effects of amiloride or ALLN on calpain activity

### 3 讨论

既往研究表明 NHE1 抑制剂抑制 As 斑块形成<sup>[2,4]</sup>。本研究从在体实验水平探讨了 NHE1 抑制剂对参与胆固醇逆转运的重要分子 ABCA1 降解的影响。研究发现 NHE1 抑制剂可抑制钙蛋白酶活性,延缓 ApoA1 诱导小鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 蛋白的降解,提示 NHE1 参与 ABCA1 降解及 As 形成。

ABCA1 基因突变性疾病 Tangier 病表现全身广泛脂质沉积及 As<sup>[7]</sup>。ABCA1 蛋白介导胆固醇逆转运在抗 As 中发挥重要作用。机体细胞 ABCA1 启动元件感知氧化胆固醇导致 ABCA1 转录水平升高。本研究通过给小鼠外源性静脉注射 ApoA1,发现小鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 蛋白水平呈时间依赖性升高,8 h 达到峰值,而不同时间点 ABCA1 mRNA 水平无显著性差异。ApoA1 与 ABCA1 结合并掩盖 ABCA1 的 PEST 结构域,阻止钙蛋白酶降解<sup>[8]</sup>,在转录后水平诱导 ABCA1 蛋白水平升高。随后 ABCA1 蛋白水平逐渐下降,可能与 ApoA1 在体内代谢过程密切相关。ApoA1 导致小鼠 ABCA1 蛋白水平改变过程中,蛋白降解是 ABCA1 蛋白水平降低的主要原因。这也意味着 ApoA1 诱导小鼠 ABCA1 蛋白变化作为在体蛋白 ABCA1 降解的动物模型是合理的,即 NHE1 抑制剂可以延缓 ABCA1 蛋白水平下降速度,提示 NHE1 抑制剂延缓 ABCA1 蛋白降解。

NHE1 可以将细胞内氢离子泵出细胞外,将钙离子泵入细胞内<sup>[8]</sup>,升高胞浆钙离子浓度,激活钙蛋白酶。NHE1 还作为调节细胞膜信号传递的重要支架蛋白;NHE1 胞内结构域存在结合细胞骨架蛋白 Ezrin 的部位<sup>[9]</sup>;研究还发现 Ezrin 与钙蛋白酶在细胞内共定位,Ezrin 与钙蛋白酶活性密切相关<sup>[10]</sup>。Denker 等<sup>[11]</sup>研究发现细胞迁徙需要 NHE1 离子转

运及细胞骨架支撑两方面功能,而且钙蛋白酶直接参与。本研究在体注射 NHE1 阻断剂阿米洛利可以抑制钙蛋白酶活性的结果与体外细胞实验<sup>[2]</sup>中的结果一致,提示 NHE1 与钙蛋白酶活性密切相关。

本研究发现给予 NHE1 抑制剂阿米洛利可抑制 ABCA1 蛋白降解和钙蛋白酶活性,类似于钙蛋白酶抑制剂的作用。联合两种抑制剂干预早期,抑制蛋白降解与单独一种抑制剂干预无明显差异。虽然本实验未探讨 NHE1 及钠钙泵活性及钠钙离子改变,但在理论上,NHE1 被抑制,钠离子内流及钠钙交换减弱,钙离子浓度下降,钙蛋白酶活性降低,从而减少 ABCA1 降解。提示阿米洛利至少部分通过抑制钙蛋白酶活性抑制 ABCA1 蛋白降解。有趣的是,随时间延长,在钙蛋白酶抑制剂 ALLN 干预基础上联合阿米洛利干预,对 ABCA1 降解的抑制效果更强,推测阿米洛利抑制 ABCA1 蛋白降解除钙蛋白酶途径外,可能还存在抑制其他降解途径,比如抑制泛素化降解或溶酶体降解途径<sup>[12-13]</sup>,具体抑制降解机制有待进一步探讨。

本研究设计尚可进一步改进,比如 ApoA1 处理小鼠同时给予放线菌酮抑制基因转录即抑制 ABCA1 从头合成,蛋白降解结果将更稳定可靠。本研究只探讨了钙蛋白酶活性,而未获得阿米洛利抑制作用的直接证据。今后实验可检测阿米洛利的药代动力学指标,精确调整干预时间,使结果更精准;此外,尚需体外细胞实验探讨 NHE1 活性及表达对 ABCA1 降解的影响,以验证体内实验结果。需要提及的是,小鼠腹腔巨噬细胞收集过程中,ABCA1 降解不可避免,ABCA1 蛋白水平可能较实际偏低。

总之,本研究在体内实验明确了 NHE1 抑制剂可以抑制钙蛋白酶活性,延缓 ApoA1 诱导 ABCA1 降解。致 As 因素如胰岛素、脂多糖、缺氧等可能导致 ABCA1 蛋白水平下降<sup>[2,13-14]</sup>,同时可能激活 NHE1,故本研究为探讨 NHE1 参与 ABCA1 降解机制奠定了基础。本研究从 ABCA1 降解角度一定程度上阐释了 NHE1 抑制剂抗 As 的机制,为探讨 NHE1 及钙蛋白酶参与 As 发病机制及寻求新治疗提供了新思路。

### 【参考文献】

- [1] 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.
- [2] Cui GM, Zhao YX, Zhang NN, et al. Amiloride attenuates

lipopolysaccharide-accelerated atherosclerosis via inhibition of NHE1-dependent endothelial cell apoptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(2): 231-238.

[3] Mo XG, Chen QW, Li XS, et al. Suppression of NHE1 by small interfering RNA inhibits HIF-1 $\alpha$ -induced angiogenesis in vitro via modulation of calpain activity[J]. *Microvasc Res*, 2011, 81(2): 160-168.

[4] 刘立英, 文继舫, 涂江华, 等. Cariporide 对高脂饮食所致兔动脉粥样硬化的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(1): 1-5.

[5] Subramanian V, Uchida HA, Ijaz T, et al. Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(1): 66-76.

[6] McCarthy DA, Clark RR, Bartling TR, et al. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 $\alpha$  and the secretory phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32 149-159.

[7] Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(8): R25-R31.

[8] Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, et al. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease

and stabilization of ABCA1 by ApoA1 [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(1): 99-107.

[9] Kemp G, Young H, Fliegel L. Structure and function of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 [J]. *Channels (Austin)*, 2008, 2(5): 329-336.

[10] Youn JY, Wang T, Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production [J]. *Circ Res*, 2009, 104(1): 50-59.

[11] Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1 [J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(6): 1 087-096.

[12] Mizuno T, Hayashi H, Kusuvara H. Cellular cholesterol accumulation facilitates ubiquitination and lysosomal degradation of cell surface-resident ABCA1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(6): 1 347-356.

[13] 苑 聪, 吴 洁, 姜志胜, 等. 胰岛素可通过 calpain 和 proteasome 途径促进 3T3-L1 脂肪细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的降解 [J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(2): 141-145.

[14] 曾志青, 李金凤, 谢 笛, 等. 脂多糖对小鼠巨噬细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(2): 139-143.

(此文编辑 曾学清)