

脂肪酸结合蛋白 4 在 Hcy 致泡沫细胞胆固醇聚积中的作用

郭伟¹, 马胜超², 张辉³, 李淑强³, 高婷婷³, 和杨杨¹, 杨晓玲¹, 徐华¹,
杨晓明¹, 卢冠军³, 贾月霞¹, 曹军¹, 姜怡邓¹

(宁夏医科大学 1.基础医学院, 3.临床学院, 宁夏银川市 750004; 2.四川大学基础医学与法医学院, 四川省成都市 610041)

[关键词] 同型半胱氨酸; 脂肪酸结合蛋白 4; 泡沫细胞

[摘要] **目的** 探讨脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 在同型半胱氨酸 (Hcy) 致泡沫细胞胆固醇聚积中的作用和意义。**方法** 体外复制 THP-1 单核细胞/泡沫细胞模型, 油红 O 染色验证模型复制是否成功, 给予 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 处理细胞 24 h 后, 实时定量 PCR 和 Western blot 检测泡沫细胞中 FABP4 mRNA 和蛋白的表达; 体外构建 FABP4 过表达载体, 双酶切法鉴定; 转染 FABP4 至泡沫细胞, 荧光倒置显微镜观察转染效率; 胆固醇检测试剂盒检测细胞内胆固醇聚积情况。**结果** 油红 O 染色显示泡沫细胞质内充满了大量红染脂质颗粒, 胞核呈蓝色, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 处理后细胞内胆固醇含量升高了 2.4 倍 ($P < 0.01$); 实时定量 PCR 结果显示 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 处理后泡沫细胞中 FABP4 mRNA 表达上调 ($P < 0.01$); Western blot 检测结果显示 FABP4 的蛋白表达与其 mRNA 表达变化一致 ($P < 0.01$)。FABP4 过表达载体转染细胞后, 可见大量绿色荧光蛋白表达; 重组质粒组泡沫细胞中 FABP4 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 细胞内胆固醇含量升高 1.9 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。**结论** FABP4 表达上调可能是 Hcy 致泡沫细胞胆固醇聚积的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of FABP4 on Homocysteine Induced Cholesterol Accumulation in the Foam Cells

GUO Wei¹, MA Sheng-Chao², ZHANG Hui³, LI Shu-Qiang³, GAO Ting-Ting³, HE Yang-Yang¹, YANG Xiao-Ling¹, XU Hua¹, YANG Xiao-Ming¹, LU Guan-Jun³, JIA Yue-Xia¹, CAO Jun¹, and JIANG Yi-Deng¹

(1. Department of Preclinical Medicine College, 3. Department of Clinical Medicine College, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Fatty Acid Binding Protein 4; Foam Cells

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and significance of fatty acid binding protein 4 (FABP4) on the formation of foam cells and the accumulation of cholesterol induced by homocysteine. **Methods** The macrophage-derived foam cell model of THP-1 monocytic cell line was duplicated and oil red O staining was used to validate whether the model was successfully established in vitro, and foam cells were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ homocysteine. The protein and mRNA expressions of FABP4 in the foam cells were detected by Western blot and real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). The FABP4 recombinant plasmid was constructed and then transfected to foam cells which had been identified by restriction enzyme digestion and fluorescent microscope respectively. **Results** Cytoplasm was filled with large quantities of red lipid droplets and the nuclear was stained to blue, and the content of total cholesterol treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy were significantly increased to 2.4-fold. The results of RT-PCR and Western blot exposed an up-expressed FABP4 mRNA and protein in 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy group ($P < 0.01$). GFP protein expressed at a high level after the FABP4 recombinant plasmid was transfected into foam cells and the expression of FABP4 was also greatly elevated, the content of TC was significantly

[收稿日期] 2015-10-23

[修回日期] 2015-12-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81260105、81360052、81260063 和 81460080); 宁夏自然科学基金项目 (NZ15209 和 NZ15066); 宁夏教育厅项目 (NGY2014089)

[作者简介] 郭伟, 硕士研究生, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 278881498@qq.com。马胜超, 博士研究生, 主要从事心血管病理生理研究。通讯作者姜怡邓, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 jydcn@126.com。

increased to 1.9-fold, and the difference was significant compared to the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The up-regulation of FABP4 might be one of the important mechanisms for Hcy which mediated the accumulation of cholesterol in foam cells.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是心脑血管疾病的基础性病变, 其发病率高, 危害性大, 严重威胁人类的生命健康, 被认为是人类健康的第一杀手^[1]。循证医学研究证实高同型半胱氨酸血症 (hyperhomocysteinemia, HHcy) 是 As 的独立危险因素^[2]。研究表明同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 引起 As 的机制主要包括内皮细胞功能损伤、平滑肌细胞迁移增殖、泡沫细胞形成等^[3], 而其中泡沫细胞增多及其胆固醇酯聚积是 As 形成的中心环节。脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4) 是一类分子量较小且对脂肪酸有高亲和力的可溶性载体蛋白, 广泛参与脂肪酸的吸收、转运和代谢。有研究表明巨噬细胞 FABP4 促进胆固醇和甘油三酯的聚集和沉积, 减少甘油三酯的脂解反应, 降低细胞内胆固醇流出效率, 诱导巨噬细胞向泡沫细胞转化而参与 As 形成^[4], 然而, FABP4 在 Hcy 致泡沫细胞胆固醇聚积中的作用及意义, 目前尚未见报道。因此, 本研究拟体外构建 FABP4 过表达质粒并转染, 观察其对泡沫细胞形成和胆固醇聚积的影响, 探讨 FABP4 在 Hcy 致泡沫细胞胆固醇聚积中的作用, 为进一步研究 As 发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

荧光定量基因扩增仪 FTC-3000P (Funglym Biotech 公司), 低温高速台式离心机 (Eppendorf 公司), HF160W CO₂ 培养箱 (上海力申科学仪器有限公司), CKX31 相差显微镜 (Olympus 公司), 固定夹、垂直电泳槽、凝胶玻璃板、转移电泳槽 (Bio-Rad 公司)。佛波酯 (Promega 公司), DMSO, Hcy (Sigma 公司), 磷酸缓冲液、青霉素、链霉素、RPMI1640 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司), 氧化型低密度脂蛋白 (广州奕源生物科技有限公司), 油红 O 染色试剂盒 (南京建成生物研究所), 限制性内切酶 Hind III、EcoR I 和 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa 公司), 逆转录试剂盒、荧光 PCR 试剂盒 (Fermentas 公司), RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司), FABP4 抗体 (AB-CAM 公司), 引物由上海生工公司合成。

1.2 THP-1 单核细胞源性泡沫细胞模型的复制及分组 将液氮中冻存的 THP-1 单核细胞株 (四川大学

华西医学中心王树人教授惠赠) 快速融化离心后培养, 待细胞密度达 80% 后离心弃上清, 加入含 500 nmol/L 佛波酯的培养基 48 h 后, 观察细胞状态, 细胞呈贴壁状态并伸出伪足, 证实单核细胞已分化为巨噬细胞。弃旧培养液, 加入 100 μ mol/L 含有 2.0 g/L 氧化型低密度脂蛋白的 Hcy 继续培养 24 h 后, 油红 O 染色观察泡沫细胞形成并用于后续实验。实验分为两个阶段: 第一阶段, 使用 100 μ mol/L Hcy 干预泡沫细胞, 分为对照组 (不加 Hcy) 和实验组; 第二阶段, 使用 100 μ mol/L Hcy 干预泡沫细胞之前, 转染 FABP4 重组质粒, 分为对照组 (未转染 FABP4 重组质粒) 和实验组, 实验组分别为空质粒组、FABP4 重组质粒组、100 μ mol/L Hcy+FABP4 重组质粒组, 每组为 3 瓶。

1.3 油红 O 染色观察泡沫细胞形成

用 PBS 缓冲液洗细胞 3 次后 10% 多聚甲醛固定 8 min, 60% 乙醇浸泡 2 min, 油红 O 染色 12 min, 60% 异丙醇分色 4 min, 去离子水洗 5 min, 苏木素染色 1 min, 去离子水冲洗后封片, 显微镜下观察泡沫细胞形成情况。

1.4 FABP4 重组质粒 pcDNA3.1-EGFP/FABP4 的构建

分别用 Hind III 和 EcoR I 将 PCR 扩增的 FABP4 片段及 pcDNA3.1-EGFP 载体行双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接过夜, DH5 α 转化后用含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养过夜, 随机挑选 5 个阳性克隆, 接种过夜, 抽提质粒并行 PCR 鉴定、Hind III 和 EcoR I 双酶切鉴定。菌体扩增后抽提质粒, 脂质体 2000TM 转染泡沫细胞。

1.5 荧光定量 PCR 测定 FABP4 mRNA 的表达

在 NCBI GenBank 数据库中查询 FABP4 (NM_001442.2), 采用 Primer 5.0 软件设计引物。FABP4 上游引物为 5'-ACA CTT CTT GAC CCT CCA CCC-3', 下游引物为 5'-CCC CAG CAT CCC TAC TCC CA-3', 扩增产物长度为 162 bp。GAPDH 上游引物为 5'-GAG CTG AAC GGG AAA CTC AC-3', 下游引物为 5'-GGT CTG GGA TGG AAA CTG TG-3', 扩增产物长度为 146 bp, 探针为 5'-6-FAM-ACGCCGC-CACGGCCTCTTTCA-TAMRA-3'。抽提总 RNA 后进行 PCR: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延长 45 s, 扩增 45 个循环。目的基因的相

对量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.6 Western blot 检测 FABP4 蛋白的表达

按照试剂盒说明书提取泡沫细胞的蛋白质, 各组样本分别取 80 μg 总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭 2 h 后, 与兔抗人 FABP4 多克隆抗体混合后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗涤 3 次后, 与羊抗兔 IgG 室温下孵育 2 h, 加入 ECL 显色底物, 凝胶成像分析仪上成像。设 β -actin 为内参, 计算 FABP4 与 β -actin 灰度值的比值, 并进行分析。

1.7 过氧化物酶反应法检测泡沫细胞内胆固醇含量

收集的泡沫细胞洗涤后, 0.5 mL PBS 重悬, 超声波裂解。加 190 μL 工作液和 20 μL 待测样品到反应管, 室温反应 20 min, 上机, 550 nm 波长下检测细胞内胆固醇含量。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间比较采用 Student's

t 检验, 多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验, 组间的两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 促进泡沫细胞内胆固醇聚积

油红 O 染色显示 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组泡沫细胞胞质内充满了红色脂质颗粒, 形如脂滴, 胞核呈蓝色, 贴壁生长, 证实泡沫细胞形成 (图 1A)。细胞内胆固醇浓度检测结果显示, 与对照组相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组胆固醇含量升高了 2.4 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.01$; 图 1B), 说明 Hcy 可以加重胆固醇在细胞内的聚积, 这可能是 Hcy 促进泡沫细胞形成诱导 As 发生的主要原因。

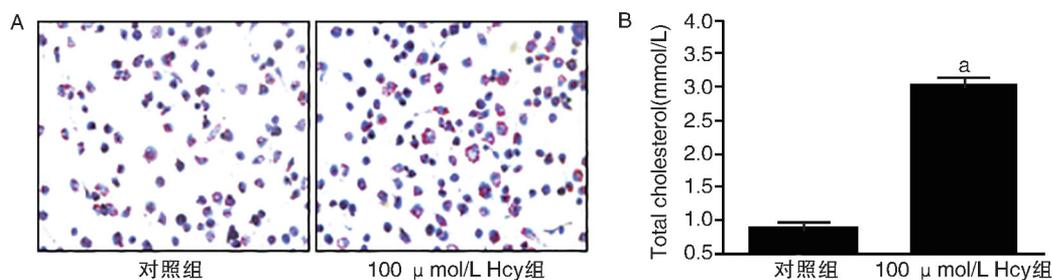


图 1. Hcy 促进泡沫细胞内胆固醇聚积 (100 \times) a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

Figure 1. Hcy promotes the accumulation of cholesterol in foam cells

2.2 Hcy 上调泡沫细胞 FABP4 的表达

100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 FABP4 mRNA 相对表达量较对照组升高了 3.2 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。蛋白表达趋势与 FABP4 mRNA 表达趋势

相一致, 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组 FABP4 蛋白表达水平是对照组的 1.4 倍, 差异具有显著性 ($P < 0.01$; 图 2), 提示 FABP4 可能在 Hcy 致泡沫细胞胆固醇聚积中起了关键作用。

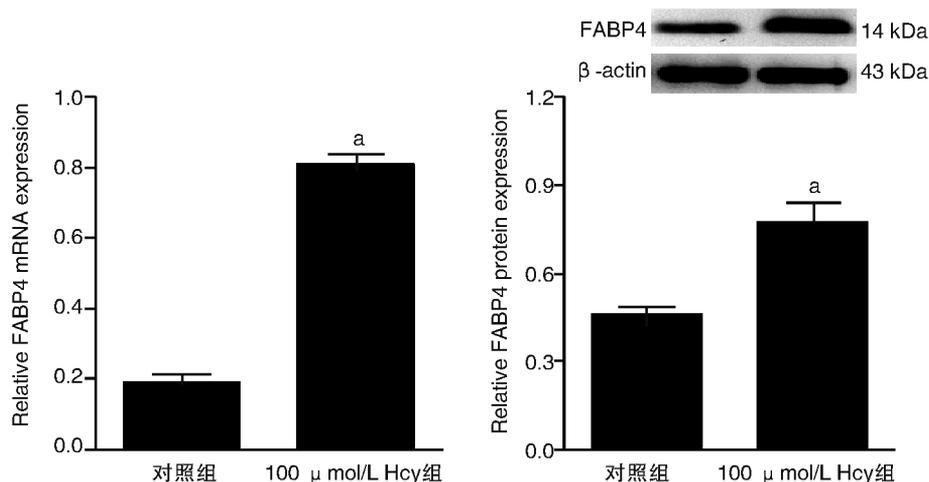


图 2. FABP4 的 mRNA 和蛋白表达水平 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Expression of FABP4 mRNA and protein

2.3 FABP4 过表达载体鉴定及其细胞转染情况

为明确 FABP4 在 Hcy 介导泡沫细胞内胆固醇聚积中的作用,体外克隆构建了其表达载体,并转染入泡沫细胞中,FABP4 的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见一条长度约为 412 bp 的 DNA 片段。过表达载体 pcDNA3.1-EGFP/FABP4 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切后,可见约 6132 bp 的载体片段和 412 bp 的目的基因片段,与预期结果一致(图 3A 和 3B)。转染入泡沫细胞后荧光显微镜观察转染效

率,对照组细胞中无荧光,空质粒组和 FABP4 重组质粒组细胞中可见绿色荧光(图 3C)。荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组和空质粒组相比,FABP4 重组质粒组 FABP4 mRNA 的表达分别增加了 2.1 和 2.6 倍,差异具有显著性($P < 0.01$);同时,FABP4 重组质粒组 FABP4 蛋白的表达分别是对照组和空质粒组的 1.7 倍和 1.6 倍($P < 0.01$;图 3D 和 3E)。表明 FABP4 过表达载体构建成功,并能在泡沫细胞中稳定表达。

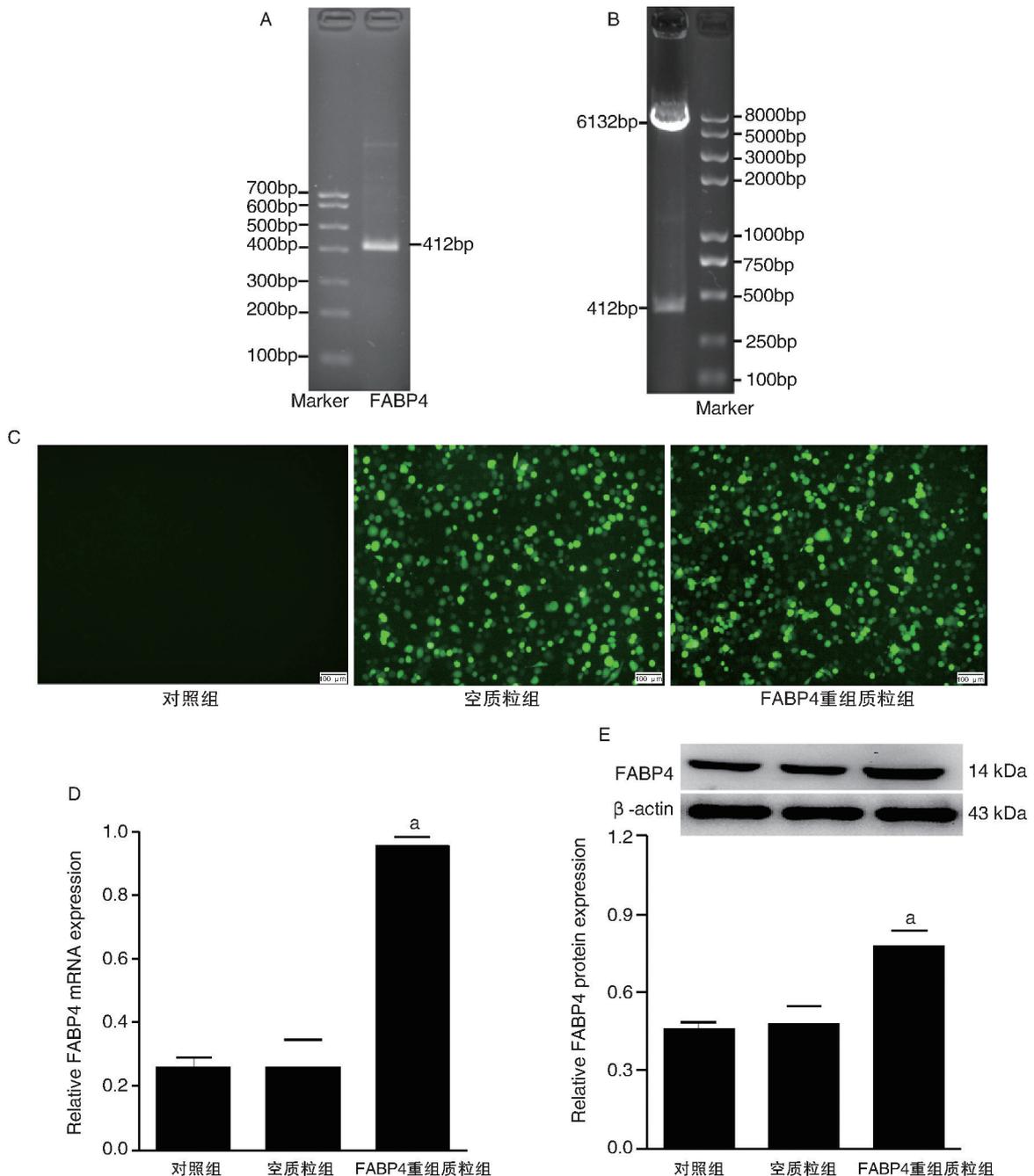


图 3. FABP4 过表达载体的构建及细胞转染 a 为 $P < 0.01$, 与对照组或空质粒组比较。

Figure 3. Construction and cell transfection of FABP4 overexpression vector

2.4 FABP4 过表达促进泡沫细胞内胆固醇聚积

FABP4 重组质粒组和 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy+FABP4 重组质粒组泡沫细胞内胆固醇含量分别是对照组的 1.9 倍和 2.3 倍,差异具有显著性($P<0.01$;图 4),说明 FABP4 可能是 Hcy 致泡沫细胞内胆固醇聚积的关键靶基因。

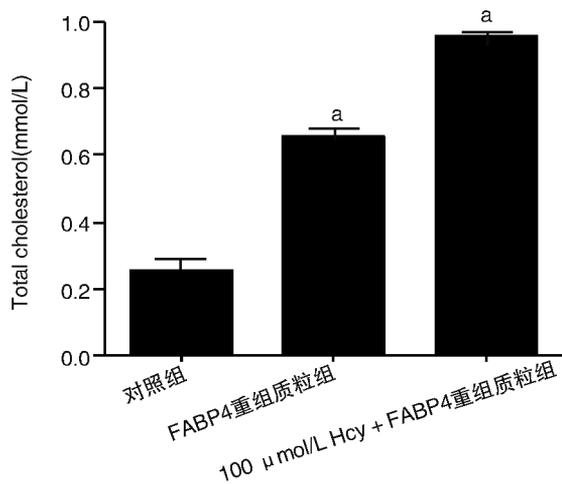


图 4. FABP4 促进泡沫细胞内胆固醇聚积 a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 4. FABP4 promotes the accumulation of cholesterol in foam cell

3 讨论

As 所致的心脑血管疾病是一种严重危害人类身体健康的常见病、多发病^[5],Hcy 作为致 As 的独立危险因素,日益受到学者重视,Hcy 致 As 的主要机制包括:诱导内皮细胞损伤、平滑肌细胞增殖、泡沫细胞形成和脂质聚积^[6],其中,Hcy 致泡沫细胞内胆固醇聚积是 As 发生发展的关键环节^[7]。

本研究以 THP-1 单核细胞为基础,分别利用佛波酯和氧化型低密度脂蛋白刺激后,成功复制泡沫细胞模型,用 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 干预细胞 24 h 后,分别利用油红 O 染色和胆固醇检测试剂盒检测泡沫细胞内胆固醇聚积情况,结果显示,Hcy 加剧了泡沫细胞内的胆固醇聚积,且油红 O 染色也证实,100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 组细胞脂质聚积情况非常明显,细胞质内弥漫分布红色的脂质颗粒,细胞内胆固醇浓度检测结果也显示 Hcy 作用泡沫细胞后胆固醇含量增加。Hcy 系氨基酸类物质,并不参与脂质代谢,但它如何能扰乱脂质转运平衡引起脂质代谢紊乱的呢?作为 As 的一个重要特征,脂质异常聚积是调控 As 发生发展的重要环节^[8],FABP4 则可能参与了该过

程的调节。FU 等^[4]发现经慢病毒诱导使细胞中 FABP4 高表达后,胆固醇酰基转移酶 1 (cholesterol acyltransferase 1, ACAT1) 表达上调,相反 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 表达下调,其共同作用导致了胆固醇沉积和甘油三酯解降低;并且研究证实,FABP4 在脂肪细胞和泡沫细胞中高表达,其在细胞内脂质代谢、胆固醇转运和其他脂类相关活动中作用显著,而脂质转运异常则可导致泡沫细胞内胆固醇聚积、沉积和逆向转运异常,从而诱发 As^[9],提示 FABP4 表达水平异常可能参与了 As 的发生发展,但 Hcy 能否调节 FABP4 的表达及其是否参与了 Hcy 介导的 As 形成,目前尚缺乏有力的证据。本研究以 Hcy 作用于泡沫细胞后,分别利用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞内 FABP4 的表达,结果证实在 Hcy 作用的泡沫细胞中 FABP4 mRNA 和蛋白水平均较对照组有大幅度升高,提示 Hcy 可能经上调 FABP4 的表达介导了泡沫细胞胆固醇聚积。这可能是由于 FABP4 作为膜周边蛋白,调节细胞内外脂质转运,高表达的 FABP4 可能通过促进泡沫细胞外胆固醇向细胞内流动,并减低胆固醇向细胞外逆向转运的效率,从而造成泡沫细胞内胆固醇异常聚积。Saavedra 等^[10]研究也发现当单核细胞被佛波酯、脂多糖、氧化型低密度脂蛋白等激活时,FABP4 的表达明显增高,细胞内脂质聚积明显增加。同时,为验证 FABP4 在 Hcy 致泡沫细胞内胆固醇聚积中的作用,在体外克隆了 FABP4 过表达载体并转染泡沫细胞后检测了细胞内胆固醇聚积情况,结果也证实过表达 FABP4 促进泡沫细胞内胆固醇含量升高;同时,Hcy 作用于过表达 FABP4 的泡沫细胞后,细胞内胆固醇含量升高更加明显,这也证实了 Hcy 确实是通过上调 FABP4 的表达介导了泡沫细胞内胆固醇聚积。

本研究之所以使用 100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 作用泡沫细胞,主要是因为课题组前期研究发现,泡沫细胞内脂质聚积并不与 Hcy 呈剂量浓度依赖关系,而仅在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时现象最明显,原因可能是:体内 Hcy 致病的机制复杂,100 $\mu\text{mol/L}$ Hcy 对基因表达的影响最显著,其原因可能与该浓度时 Hcy 对基因 DNA 甲基化的影响最明显有关^[11],同时,若 Hcy 浓度进一步升高,则可能会通过氧化应激、炎症反应、内质网应激和染色体异位等较强烈的机制损伤细胞,而遮盖其本身通过调控基因表达对细胞的作用^[12]。

综上所述,FABP4 表达上调可能是 Hcy 致泡沫

细胞内胆固醇聚积而诱发 As 发生复杂的重要机制之一,深入研究这一问题,继续探究其机制,将有助于阐明 Hcy 致 As 发生的作用机制,为预防和治疗 As 提供实验证据。

[参考文献]

- [1] 范晓迪, 刘建勋, 林成仁. 动脉粥样硬化脑缺血/再灌注动物模型的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30 (3): 300-305.
- [2] 姜怡邓, 杨安宁, 杨晓玲, 等. 高同型半胱氨酸血症对 ApoE^{-/-} 鼠心肌酶谱的影响及与 P53 基因的相关性分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (1): 16-21.
- [3] Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Bahreini E, et al. Serum paraoxonase phenotype distribution in exudative age-related macular degeneration and its relationship to homocysteine and oxidized low-density lipoprotein[J]. Retina, 2012, 32 (4): 658-666.
- [4] Fu Y, Luo L, Luo N, et al. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages[J]. Atherosclerosis, 2006, 188 (1): 102-111.
- [5] 涂晶, 洪涛, 文格波. 高胰岛素血症与动脉粥样硬化研究现状与进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (1): 79-83.
- [6] 纳莉, 徐支芳, 姜怡邓, 等. 同型半胱氨酸致动脉粥样硬化的机制研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34 (9): 887-889.
- [7] Liang Y, Yang X, Jiang Y. Homocysteine-mediated cholesterol efflux via ABCA1 and ACAT1 DNA methylation in THP-1 monocyte-derived foam cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45 (3): 220-208.
- [8] 王志会, 王雪燕, 刘淑霞, 等. 类风湿关节炎患者早发动脉粥样硬化的脂代谢紊乱与内皮细胞功能异常初步探讨[J]. 临床荟萃, 2013, 28 (6): 610-612.
- [9] Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, et al. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages[J]. Atherosclerosis, 2002, 165 (2): 259-269.
- [10] Saavedra P, Girona J, Cabré A, et al. Interaction of FABP4 with plasma membrane proteins of endothelial cells[J]. Clin Investig Arterioscler, 2015, 27 (1): 26-33.
- [11] Zhao L, Jiao Y, Jiang YD, et al. The effect of miR-124 on homocysteine-induced atherosclerosis via promoter region DNA methylation in ApoE^{-/-} mice[J]. Sheng Li Xue Bao, 2015, 67 (2): 207-213.
- [12] 侯鹏高. 动脉粥样硬化与脂代谢紊乱研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36 (7): 1 039-040.

(此文编辑 文玉珊)