

## 载脂蛋白 A I 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的转录表达

尹建国<sup>1,2</sup>, 张社兵<sup>1</sup>, 彭道泉<sup>2</sup>

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院心血管内科, 广东省韶关市 512026;

2. 中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 载脂蛋白 A I; JAK2/STAT3 信号通路; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 转录表达

[摘要] **目的** 探讨载脂蛋白 A I (ApoA I) 对动脉粥样硬化(As)小鼠血浆中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平和巨噬细胞表达 TNF- $\alpha$  的影响及其可能机制。**方法** 雄性 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲养 12 周后, 随机分为对照组、ApoA I 组、AG490(特异性 JAK2 抑制剂)+ApoA I 组。处死前第 1、3 天分别予以生理盐水、ApoA I (40  $\mu$ g/g) 及 AG490 (4  $\mu$ g/g)+ApoA I (40  $\mu$ g/g) 干预, 各组处死前 12 h 腹腔注射脂多糖(LPS), 酶联免疫法检测血浆 TNF- $\alpha$  浓度。THP-1 细胞来源的泡沫细胞随机分为对照组、ApoA I 组、AG490+ApoA I 组, 予以相应干预后加入 LPS 孵育, 检测各组上清液 TNF- $\alpha$  浓度及细胞中 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平。**结果** 与对照组比较, ApoA I 能显著降低 LPS 刺激的小鼠血浆 TNF- $\alpha$  浓度 ( $P < 0.01$ ); 予以 AG490 后, ApoA I 抑制 TNF- $\alpha$  分泌的作用明显减弱 ( $P < 0.05$ )。体外研究表明 ApoA I 能抑制 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  转录与表达 ( $P < 0.01$ ), 但予以 AG490 后, 削弱了 ApoA I 的抗炎作用 ( $P < 0.05$ )。**结论** ApoA I 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制 TNF- $\alpha$  的转录表达。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

### Apolipoprotein A I inhibit tumor necrosis factor $\alpha$ transcription and expression through JAK2/STAT3 signaling pathway

YIN Jian-Guo<sup>1,2</sup>, ZHANG She-Bing<sup>1</sup>, PENG Dao-Quan<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Yuebei People's Hospital Affiliated to Medical College of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A I; JAK2/STAT3 signaling pathway; Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Transcription and expression

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and mechanism of ApoAI on TNF- $\alpha$  expression in macrophages and plasma TNF- $\alpha$  levels from atherosclerotic mice. **Methods** Male ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed with high cholesterol diet for 12 weeks and then randomly divided into control group, ApoAI group and ApoAI+AG490(a specific JAK2 inhibitor)group; each group were separately received treatment with PBS, ApoAI (40  $\mu$ g/g), ApoAI (40  $\mu$ g/g)+AG490(4  $\mu$ g/g) on the third and the first day before sacrifice, 12 h before sacrifice all groups were administered with LPS via intraperitoneal injection, TNF- $\alpha$  levels in plasma were measured by ELISA. THP-1 macrophage-derived foam cells were randomly divided into control group, ApoAI(10 mg/L) group and ApoAI(10 mg/L)+AG490(25  $\mu$ mol/L) group; all groups incubated with LPS (10  $\mu$ g/L). TNF- $\alpha$  level in supernate were measured by ELISA and TNF- $\alpha$  mRNA expression were examined by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, ApoAI can significantly decrease TNF- $\alpha$  levels in mice plasma, after administered with AG490 ApoAI-inhibition of TNF- $\alpha$  secretion induced by LPS markedly weakened ( $P < 0.05$ ). In vitro study demonstrated ApoAI can inhibit TNF- $\alpha$  transcription and expression induced by LPS ( $P < 0.01$ ), AG490 abrogated the anti-inflammatory effect of ApoAI ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ApoA I inhibited TNF- $\alpha$  transcription and expression through JAK2/STAT3 signaling pathway.

[收稿日期] 2016-09-05

[修回日期] 2017-01-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81370393)

[作者简介] 尹建国, 博士, 副主任医师, 研究方向为血脂及动脉粥样硬化, E-mail 为 yinjianguo1121@163.com。通讯作者彭道泉, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为血脂及动脉粥样硬化, E-mail: pengdq@hotmail.com。

动脉粥样硬化的本质是慢性炎症性疾病,高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)通过抗炎、促进胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)等作用发挥抗动脉粥样硬化的作用,与动脉粥样硬化的发生呈负相关。载脂蛋白 A I (apolipoprotein A I, ApoA I)是 HDL 的主要蛋白成分,约占其蛋白成分 70%,HDL 的功能主要通过 ApoA I 实现的,ApoA I 在体内主要作为三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)的受体,介导泡沫细胞中游离胆固醇及磷脂的流出,发挥抗炎、抗动脉粥样硬化的作用。双面神激酶 2(janus kinase 2, JAK2)是一种非跨膜酪氨酸激酶,能把细胞外的刺激信号通过细胞膜传导到细胞核,激活下游的信号转导及转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3),启动相应目的基因的转录表达,完成细胞信号的跨膜传递。已有研究表明 JAK2/STAT3 信号通路参与了炎症的调控。ABCA1 胞内核苷酸结合区域有两个 STAT3 的“锚定位点”,当 ApoA I 与 ABCA1 结合后能激活 STAT3<sup>[1]</sup>,表明激活 JAK2/STAT3 信号通路。ApoA I 有抗炎作用是否与 JAK2/STAT3 信号通路相关?本研究探讨 ApoA I 是否通过 JAK2/STAT3 信号通路发挥抗炎作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ApoE<sup>-/-</sup>小鼠购自北京维通利华公司,高脂饲料购自广东省动物实验中心,AG490 购自北京大科为生物技术公司,THP-1 细胞为本实验室保存,RP-MI1640 培养基购自 Gibco 公司,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,LPS 购自上海联硕生物科技公司,RNA 提取及反转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自 Invitrogen 公司,油红 O 购自 Sigma 公司,Ox-LDL 购自北京协生生物科技公司,PMA 购自 Sigma 公司;ApoA I 用质粒在体外表达纯化取得,纯度大于 99%,由湖南远泰生物技术公司协助完成。其余试剂均为湘雅二医院心血管内科实验室提供。

### 1.2 分组与干预

24 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠高脂饲料饲养 12 周后随机分为 3 组:①对照组:处死前第 1、第 3 天尾静脉注射生理盐水;②ApoAI 组:处死前第 1、第 3 天尾静脉注射

ApoAI(40  $\mu\text{g/g}$ );③AG490+ApoAI 组:同 ApoAI 组,但在 ApoAI 前 3 h 注射 AG490(4  $\mu\text{g/g}$ )。所有组小鼠处死 12 h 前予以腹腔注射 LPS 25  $\mu\text{g/只}$ 。处死后分离血浆,用 ELISA 试剂盒检测 TNF- $\alpha$  浓度。

THP-1 细胞复苏后用含 10%胎牛血清、100 kU/L 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基置于含 5% CO<sub>2</sub>、37℃、湿度 100%的无菌培养箱中培养,细胞状态良好后计数分组,每组  $1.5 \times 10^6$  个细胞,先用 160 nmol/L 佛波酯(PMA)孵育 12 h 诱导分化成巨噬细胞,再用含 50 mg/L ox-LDL 无血清培养基培养 48 h 使其泡沫化。随机分为:①对照组:予以无血清培养基继续培养 3 h;②ApoA I 组:无血清培养基加入 10 mg/L ApoA I 孵育 3 h;③AG490+ ApoA I 组:预先予以 25  $\mu\text{mol/L}$  AG490 孵育 30 min,再加入 10 mg/L ApoA I 孵育 3 h,各组再加入浓度为 10  $\mu\text{g/L}$  LPS,孵育 6 h,待测 TNF- $\alpha$  浓度和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平。

### 1.3 ELISA、RT-PCR 测定 TNF- $\alpha$ 浓度和 TNF- $\alpha$ mRNA 表达水平

用 ELISA 试剂盒检测各组 TNF- $\alpha$  浓度。细胞按照 Invitrogen 公司说明书提取 RNA 及行 RT-PCR 检测 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平,人 TNF- $\alpha$  引物序列:正义链 5'-GCT TCC TCC AGA TGA GCT T-3',反义链 5'-TGC TGT CCT TGC TGA GGG A-3'。

### 1.4 泡沫细胞油红 O 染色及主动脉切片 HE 染色

泡沫细胞用 50%异丙醇固定,油红 O 工作液染色 15 min,冲洗 5 min,苏木素染核 10 min,冲洗分色,氨水返蓝后,显微镜下观察拍照,红色颗粒为蓄积脂质;分离主动脉置入 4%多聚甲醛液中固定,切片行 HE 染色。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,数据均进行正态性分析,凡不符合正态分布的变量均先经对数转换后,再作进一步统计分析。两组均数间比较采用独立样本 *t* 检验。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 泡沫细胞的构建

从图 1 可见,泡沫细胞中脂质蓄积,油红 O 染色显示为红色,证明细胞中有脂质沉积,泡沫细胞构建成功。

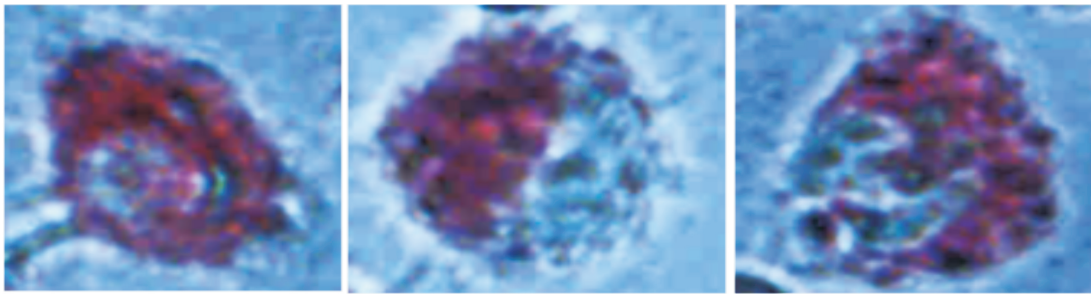


图 1. 泡沫细胞油红 O 染色(×400) 红色颗粒为沉积脂质  
Figure 1. Foam cell oil red O staining(×400)

2.2 各组动脉粥样硬化斑块的情况

主动脉组织常规石蜡包埋切片 HE 染色, 各组

成功诱导出动脉粥样硬化斑块, 不同干预对斑块的大小无明显影响(图 2)。

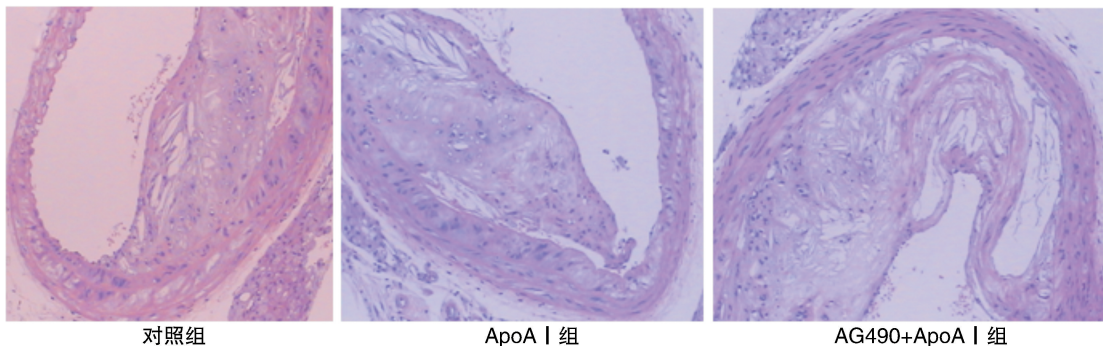


图 2. 各组动脉粥样硬化斑块情况(×40)  
Figure 2. Atherosclerotic plaque in each group (×40)

2.3 ApoA I 对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血浆 TNF-α 浓度的影响

与对照组比较, ApoAI组血浆中 TNF-α 浓度明显降低(P<0.01); 而预先予以 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路, 再予以 ApoAI, 与 ApoAI组比较, 其抑制 TNF-α 分泌的作用明显减弱(P<0.05; 图 3)。

2.4 ApoA I 对泡沫细胞分泌 TNF-α 的影响

与对照组相比, ApoA I 组能明显抑制 LPS 诱导 THP-1 源泡沫细胞分泌 TNF-α (P<0.01); 而预先予以 AG490 阻断 JAK2/STAT3 信号通路, 与 ApoA I 组相比, AG490+ ApoA I 组对 LPS 诱导泡沫细胞分泌 TNF-α 的能力明显减弱(P<0.01; 图 4)。

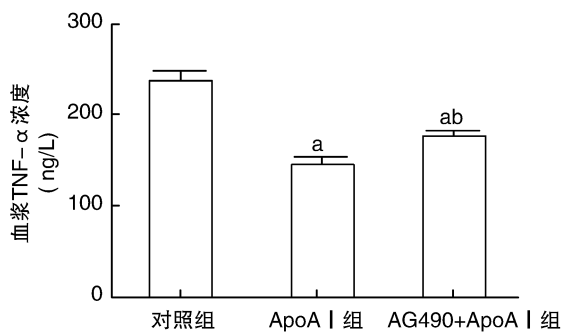


图 3. 不同干预对 LPS 刺激小鼠血浆 TNF-α 浓度的影响  
a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.05, 与 ApoA I 组比较。  
Figure 3. The effect of different intervention on plasm TNF-α levels by LPS-stimulated in mice

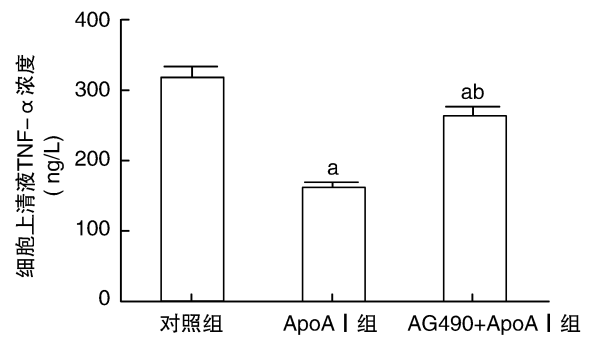


图 4. 不同干预对 LPS 刺激泡沫细胞上清液中 TNF-α 浓度的影响  
a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.01, 与 ApoAI组比较。  
Figure 4. The effect of different intervention on supernate TNF-α levels from LPS induced foam cells



### 2.5 ApoA I 对泡沫细胞 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的影响

与对照组比较, ApoA I 组、AG490+ ApoA I 组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); 但 AG490+ ApoA I 组与 ApoA I 组比较, TNF- $\alpha$  mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ; 图 5)。

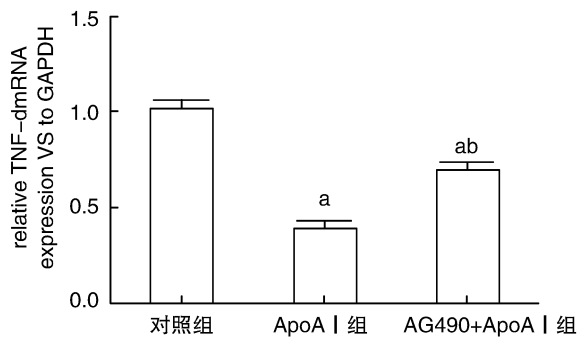


图 5. 不同干预对 LPS 诱导泡沫细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ApoA I 组比较。

Figure 5. The effect of different intervention on TNF- $\alpha$  mRNA expression from LPS induced foam cells

## 3 讨论

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种慢性炎症性疾病, 具体表现为斑块中巨噬细胞聚集和血浆中炎症标志物浓度的升高。单核-巨噬细胞在 As 的发生、发展中起关键性作用, 巨噬细胞吞噬低密度脂蛋白形成的泡沫细胞是 As 的标志之一, As 中巨噬细胞能分泌多种炎症介质, 如单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、TNF- $\alpha$  等, 进一步促进单核细胞向内皮下迁移, 吞噬脂质促进斑块的形成及并发症的出现。ApoA I 在体内主要作为 ABCA1 的受体, 促进胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT), 同时 ApoA I 有抗炎作用, 表现为能抑制单核细胞表面整合素 CD11b 的表达<sup>[2]</sup>, 抑制低密度脂蛋白受体和 ApoA I 双基因敲除小鼠的淋巴细胞激活及增殖<sup>[3]</sup>, 增加调节性 T 细胞比例<sup>[4]</sup>; 还可通过锌指蛋白磷酸化途径抑制炎症因子的表达<sup>[5]</sup>, ApoA I 可减少高脂小鼠皮肤中的 T 淋巴细胞数量, 减轻皮炎损害<sup>[6]</sup>, ApoA I 可抑制支气管哮喘的气道炎症反应, 对急性肺损伤及病毒性肺炎也有保护作用<sup>[7]</sup>; ApoA I 基因敲除的小鼠炎症活性明显增强, ApoA I 过表达不但对 LPS 诱导的全身炎症及多器官损害起保护作用<sup>[8]</sup>, 而且还能减少血管炎症反应及纤维化<sup>[9]</sup>。但 ApoA

I 抗炎的具体机制不详。有研究表明, 巨噬细胞能表达 ABCA1, ABCA1 胞内核苷酸结合区域有两个 STAT3 的“锚定位点”。STAT3 受上游 JAK 家族调节, 主要是 JAK2, 与 JAK2 构成 JAK2/STAT3 信号调节通路, 广泛参与细胞的调节及信号传导, 包括炎症反应等, ApoA I 的抗炎可能为与 ABCA1 结合后促进 RCT 的同时激活 JAK2/STAT3 信号通路, 抑制巨噬细胞炎症<sup>[10-11]</sup>。但也有研究认为与 ApoA I 的抗炎与促进细胞膜脂质筏中胆固醇流出, 减少细胞膜中的胆固醇含量, 影响脂质筏介导炎症信号的传导有关<sup>[12-14]</sup>。本研究推测 ApoA I 的抗炎作用可能是通过 JAK2/STAT3 信号通路介导实现的。TNF- $\alpha$  是一种炎症标志物, 在体内主要由单核巨噬细胞分泌, 炎症刺激能刺激其表达与分泌, 它在体内也能放大炎症反应, 诱导刺激更多促炎因子、黏附因子等炎症介质的产生。同时, 有研究表明 TNF- $\alpha$  还能刺激血管平滑肌细胞的迁移<sup>[15]</sup>, 促进内皮细胞表达黏附因子、炎症因子<sup>[16]</sup>, 抑制 ABCA1 的表达, 抑制胆固醇流出<sup>[17]</sup>; 促进动脉粥样硬化的发生、发展。在本研究中, 予以 LPS 作为炎症刺激, 发现 ApoA I 能明显抑制 LPS 诱导 TNF- $\alpha$  的转录和表达, 但是予以 AG490, 抑制 JAK2/STAT3 信号通路后, 削弱了 ApoA I 的抗炎能力。由此可见, ApoA I 的抗炎是通过 JAK2/STAT3 信号通路介导的。

综上所述, ApoA I 除了作为 ABCA1 的受体接受游离胆固醇及磷脂生成圆盘状前  $\beta$ -HDL, 促进胆固醇流出之外, 本研究发现 ApoA I 还有抗炎作用, 能抑制 TNF- $\alpha$  的转录和表达, ApoA I 抑制 TNF- $\alpha$  的转录和表达是通过 JAK2/STAT3 信号通路调控的。

### 【参考文献】

- [1] 唐朝克. 以 ABCA1 为靶点防治动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(11): 879-884.
- [2] Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, et al. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(11): 2 071-077.
- [3] Wilhelm AJ, Zabalawi M, Grayson JM, et al. Apolipoprotein A-I and its role in lymphocyte cholesterol homeostasis and autoimmunity [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(6): 843-849.
- [4] Wilhelm AJ, Zabalawi M, Owen JS, et al. Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr<sup>-/-</sup>, ApoA-I<sup>-/-</sup> mice [J]. J Biol Chem, 2010, 285(46): 36 158-169.

- [5] 李金凤,涂玉林,尹凯. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(3): 233-236.
- [6] Tavori H, Su YR, Yancey PG, et al. Macrophage ApoA I protects against dyslipidemia-induced dermatitis and atherosclerosis without affecting HDL[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(3): 635-643.
- [7] Gordon EM, Figueroa DM, Barochia AV, et al. High-density lipoproteins and apolipoprotein A-I: potential new players in the prevention and treatment of lung disease[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7(A1451): 323.
- [8] Li Y, Dong JB, Wu MP. Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590(1-3): 417-422.
- [9] Spillmann F, De Geest B, Muthuramu I, et al. Apolipoprotein A-I gene transfer exerts immunomodulatory effects and reduces vascular inflammation and fibrosis in ob/ob mice[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2016, 13(1): 25.
- [10] Tang C, Houston BA, Storey C, et al. Both STAT3 activation and cholesterol efflux contribute to the anti-inflammatory effect of ApoA-I/ABCA1 interaction in macrophages[J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(5): 848-857.
- [11] Yin K, Tang SL, Yu XH, et al. Apolipoprotein A-I inhibits LPS-induced atherosclerosis in ApoE (-/-) mice possibly via activated STAT3-mediated upregulation of tristetraprolin[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(6): 837-846.
- [12] Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 679-691.
- [13] Umemoto T, Han CY, Mitra P, et al. Apolipoprotein A I and high-density lipoprotein have anti-inflammatory effects on adipocytes via cholesterol transporters: ATP-binding cassette A-1, ATP-binding cassette G-1, and scavenger receptor B-1[J]. *Circ Res*, 2013, 112(10): 1345-354.
- [14] Kaul S, Xu H, Zabalawi M, et al. Lipid-free apolipoprotein A-I reduces progression of atherosclerosis by mobilizing microdomain cholesterol and attenuating the number of CD131 expressing cells: monitoring cholesterol homeostasis using the cellular ester to total cholesterol ratio[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(11): e004401.
- [15] Yao W, Sun Q, Huang L, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside inhibits TNF-alpha-induced migration of vascular smooth muscle cells via suppression of vimentin[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 94(2): 1-6.
- [16] Jiang Y, Jiang LL, Maimaitirexiati XM, et al. Irbesartan attenuates TNF-alpha-induced ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression through suppression of NF-kappaB pathway in HUVECs[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(17): 3295-302.
- [17] Wehmeier KR, Kurban W, Chandrasekharan C, et al. Inhibition of ABCA1 protein expression and cholesterol efflux by TNF alpha in MLO-Y4 osteocytes[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(6): 586-595.

(此文编辑 朱雯霞)