

## 脂肪分化相关蛋白通过抑制中性胆固醇酯水解酶表达 促进 RAW264.7 细胞内脂质积蓄

袁旭<sup>1</sup>, 孟磊<sup>1</sup>, 陈雁斌<sup>2</sup>, 张瑞<sup>1</sup>, 袁中华<sup>1</sup>

(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,湖南省衡阳市 421001;

2.湘南学院附属医院,湖南省郴州市 423000)

[关键词] 脂肪分化相关蛋白; 中性胆固醇酯水解酶; 蛋白激酶 C $\delta$ ; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 探讨 RAW264.7 巨噬细胞中脂肪分化相关蛋白(adipophilin)调控中性胆固醇酯水解酶(nCEH)表达进而介导脂质积蓄的作用机制。**方法** 用已成功构建的沉默与高表达 Adipophilin 的逆转录病毒质粒载体转染包装细胞 PA317,继而收集病毒液感染 RAW264.7 巨噬细胞,筛选出 Adipophilin 沉默细胞株和高表达细胞株。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹分析技术(Western blot)分别检测 nCEH 的 mRNA 和蛋白表达水平,液体闪烁计数器、高效液相色谱法检测细胞内胆固醇流出及胆固醇酯含量。**结果** ①高表达 Adipophilin 的细胞组胆固醇、胆固醇酯含量明显高于空白对照组( $P<0.01$ ),而沉默 Adipophilin 表达的细胞组则显著低于空白对照组( $P<0.01$ ),Adipophilin 可抑制 nCEH mRNA 和蛋白的表达。②用 100 nmol/L 蛋白激酶 C $\delta$ (PKC $\delta$ )激动剂佛波酯(PMA)孵育高表达 Adipophilin 的 RAW264.7 细胞 30 min 后,nCEH 的 mRNA 与蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ ),而用 100 nmol/L PKC $\delta$  抑制剂卡马拉素(Rottlerin)同样孵育 30 min 后,nCEH 的表达水平较对照组增高( $P<0.05$ )。**结论** Adipophilin 促进巨噬细胞内脂质积蓄可能通过抑制 nCEH 表达来实现,在这一调控机制中 PKC $\delta$  发挥了重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Adipophilin enhances intracellular lipid accumulation by inhibiting neutral cholesterol ester hydrolase in RAW264.7 macrophages

YUAN Xu<sup>1</sup>, MENG Lei<sup>1</sup>, CHEN Yan-Bin<sup>2</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, YUAN Zhong-Hua<sup>1</sup>

(1.Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China; 2.Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou 423000, Hunan, China)

[KEY WORDS] Adipophilin; Neutral cholesterol ester hydrolase; Protein kinase C $\delta$ ; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanism of adipophilin regulating neutral cholesterol ester hydrolase (nCEH) expression thus mediating lipid accumulation in RAW264.7 macrophages. **Methods** The constructed retroviral plasmid vectors with adipophilin of no expression and over expression were transfected into package cell PA317, then collected virus solution was used to infect RAW264.7 macrophages by screening and identifying to obtain RAW264.7 cell lines with adipophilin stably silenced and highly expressed. The mRNA and protein expression levels of nCEH were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively. High performance liquid chromatography (HPLC) was taken to detect the contents of intracellular cholesterol ester. **Results** The cholesterol and cholesterol ester levels were significantly higher in adipophilin over-expression group than in the control group ( $P<0.01$ ), while dramatically lower than that in the control group when adipophilin was suppressed ( $P<0.01$ ). In addition, adipophilin inhibited nCEH expression. Furthermore, in RAW264.7 macrophages with high adipophilin expression, treatment with 100 nmol/L protein kinase C $\delta$  agonist PMA for 30 min resulted in remarkable reductions of nCEH mRNA and protein expression ( $P<0.05$ ), on the contrary, treatment with 100 nmol/L PKC $\delta$  inhibitor Rottlerin for 30 min increased the expres-

[收稿日期] 2017-09-01

[修回日期] 2017-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30971268)

[作者简介] 袁旭,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治,E-mail 为 178024852@qq.com。通讯作者袁中华,博士,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及防治,E-mail 为 yzh5555@163.com。

sion of nCEH ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Adipophilin may exert influence over lipid accumulation by inhibiting the expression of nCEH in RAW264.7 macrophages, and PKC $\delta$  played an important role in this regulatory mechanism.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是动脉硬化性血管疾病中最常见最重要的一种, 其复杂的发病机制至今尚未完全阐述清楚。目前广泛认可 As 发生的关键环节是血管平滑肌细胞或巨噬细胞过度荷脂导致泡沫细胞的形成。脂滴是被吞噬蓄积于细胞胞浆中的脂质的主要存在形式, 其周边为 40 余种相关蛋白所包被。作为其中含量最高的一种, 脂肪分化相关蛋白 (adipophilin) 在脂滴的形成、分解以及 As 的发生发展中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。

中性胆固醇酯水解酶 (neutral cholesterol ester hydrolase, nCEH) 是一种催化胆固醇酯水解的酶类, 它能促使脂滴水解从而减少细胞内脂质积聚<sup>[2]</sup>, 高表达 nCEH 具有抗动脉粥样硬化的作用<sup>[3]</sup>。已有的研究表明, Adipophilin 和 nCEH 共同存在于脂滴表面, 两者均与脂质的代谢相关, 共同发挥调控细胞内脂质的作用<sup>[4]</sup>。在病理状况下, Adipophilin 和 nCEH 与细胞内的脂质积蓄有关, 进一步发展会导致泡沫细胞的形成<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究显示 Adipophilin 促进细胞内脂质积聚可能通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 途径<sup>[6]</sup>。那么, Adipophilin 是否就是通过 PKC 途径调节 nCEH 的表达, 进而调控其所介导的脂质积蓄, 其具体机制又如何, 尚未有研究对此做出明确的回答。故而本研究以此为契机, 在本课题组之前对 Adipophilin 一系列研究的基础上, 通过观察 Adipophilin 不同表达水平时 nCEH 的改变情况以及 PKC 活性改变对 nCEH 表达的影响, 同时检测细胞内相应的脂质积蓄情况, 初步探讨 Adipophilin 介导脂质积蓄过程中 Adipophilin 与 nCEH 可能的相互作用以及 PKC 在其中所起的可能作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞及主要试剂和仪器

PA317 细胞株购自 ATCC 细胞库; RAW264.7 细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库; DH5 $\alpha$  菌来自南华大学微生物教研室; PCR 仪 (中国珠海黑马公司), 核酸/蛋白分析仪 (美国 Beckman 公司), 凝胶图像分析系统 (美国柯达公司), 荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), CO<sub>2</sub> 培养箱 (日本 SANYO 公司); RPMI1640 培养基购自上海 HyClone 公司, DMEM 高糖培养基购自美国 Costar 公司; 新生小牛血清购自杭州四季青公司; 100 bp

DNA Marker 购自上海 GENERAY BIOTECH 公司; Agarose 购自 GENE TECH 公司; EB、胰酶、DMSO 和油红 O 购自 Amresco 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自碧云天公司; BCA 试剂盒购自北京康为世纪公司; DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。无内毒素质粒小样快速提取试剂盒购自北京索来宝公司; MasterMix PCR 扩增试剂盒购自北京天为时代公司; 所有引物由上海生工生物工程公司合成。梭华-Sofast<sup>TM</sup> 基因转染试剂购自美国 OXOID 公司; Polybrene 购自 Chemicon 公司; EcoR I、BamH I、Not I 和 Hind III 购自美国 BioLabs 公司; E. Z. N. A Fastfilter Endo-free Plasmid Maxi Kit 购自 Omega 公司; Yeast Extract、Tryptone、Agar powder 购自 OXOID 公司。 $\beta$ -actin 一抗、nCEH 一抗购自美国 Proteintech 公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自美国 EarthOx 公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自上海碧云天生物科技研究所。其余试剂为国产或进口分装分析纯。

### 1.2 细胞培养

小鼠胚胎成纤维细胞株 PA317 混悬后接种于高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 1~2 天换液, 约 3~4 天细胞密度达 90% 时传代; 小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 混悬后接种于 RPMI1640 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 1~2 天换液, 约 3~4 天细胞贴壁达 90% 时考虑传代。

### 1.3 实验分组

本研究分为两个部分: 首先, 观察 Adipophilin 不同表达水平状况下, RAW264.7 细胞中 nCEH 的 mRNA 及蛋白表达水平改变以及细胞内胆固醇酯含量的变化, 探索 Adipophilin 与 nCEH 之间的相互关系以及两者在脂质积蓄中发挥作用的可能机制, 进而用 PKC $\delta$  激动剂佛波酯 (PMA)、抑制剂卡马拉素 (Rottlerin) 处理 Adipophilin 高表达巨噬细胞, 探讨 PKC $\delta$  在 Adipophilin 通过 nCEH 促进 RAW264.7 巨噬细胞脂质积蓄中所起的作用。构建 pQCXIP-HA-Adipophilin 和 pSuper-Adipophilin siRNA 逆转录病毒载体, 经酶切和 PCR 鉴定确认构建成功后转染 PA317 包装细胞, 获得 pQCXIP-HA-Adipophilin 和 pSuper-Adipophilin siRNA 逆转录病毒。收集病毒液, 感染 RAW264.7 细胞, 用嘌呤霉素筛选, 获得 Adipophilin 稳定高表达和沉默表达的细胞株。实验

一(每组样本量为 3)分为:①空白对照组;②空载体对照组:用获得的 pQCXIP 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞;③Adipophilin 高表达组:用获得的 pQCXIP-HA-Adipophilin 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞;④siRNA 对照组:用获得的 pSuper-scramble siRNA 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞;⑤Adipophilin siRNA 组:用获得的 pSuper-Adipophilin siRNA 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞。实验二(每组样本量为 3):(1)PKC $\delta$  激动剂 PMA 处理实验,分为①空白对照组;②空载体+PMA 对照组:用获得的 pQCXIP 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞,予 PMA 孵育(100 nmol/L)30 min;③Adipophilin 高表达+PMA 组:用获得的 pQCXIP-HA-Adipophilin 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞,予 PMA 孵育(100 nmol/L)30 min;(2)PKC $\delta$  抑制剂 Rottlerin 处理实验,分为①空白对照组;②空载体+Rottlerin 对照组:用获得的 pQCXIP 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞,予 Rottlerin 孵育(100 nmol/L)30 min;③Adipophilin 高表达+Rottlerin 组:用获得的 pQCXIP-HA-Adipophilin 逆转录病毒感染 RAW264.7 细胞,予 Rottlerin 孵育(100 nmol/L)30 min。

#### 1.4 转化、鉴定和提取 pQCXIP-HA-Adipophilin、pSuper-Adipophilin siRNA 表达载体

首先制备感受态细胞 DH5 $\alpha$ (参考分子克隆中 CaCl<sub>2</sub> 法),将本课题组前期构建成功的 pQCXIP-HA-Adipophilin、pSuper-Adipophilin siRNA 逆转录病毒载体分别加入预冷的 DH5 $\alpha$  中使之转化,确认转化成功的 DH5 $\alpha$  单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,空气浴摇床振荡 18~24 h(37 $^{\circ}$ C、220 r/min);取一部分菌液提取质粒并进行酶切(EcoRI 或 NotI)鉴定,余下已鉴定的菌液重新划线并挑取阳性单菌落接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基,所得菌液用 E.Z.N.A Fastfilter Endo-free Plasmid Maxi Kit(具体操作见说明书)提取质粒,酶切及 PCR 检测质粒性质,紫外分光光度计检测质粒浓度。

#### 1.5 转染 pQCXIP-HA-Adipophilin、pSuper-Adipophilin siRNA 入 PA317 包装细胞,收集重组 DNA 逆转录病毒液

转染前一天将 PA317 细胞接种于 6 孔板中[接种密度约(5~7) $\times 10^5$  细胞/孔],37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中过夜。用 100  $\mu$ L 无血清 DMEM 稀释 pQCXIP-HA-Adipophilin 和 pSuper-Adipophilin siRNA 质粒各 2  $\mu$ L,另用 100  $\mu$ L 无血清 DMEM 稀释 6  $\mu$ L 梭华-So-fastTM,分别在室温下静置 5 min 后将两者混匀,室温下孵育 20 min,均匀滴加到 6 孔板中,10%血清无抗生素培养基中培养。4 h 后换含 2 mg/L 嘌呤霉素

的完全培养基,48 h 后筛选,每 2~3 天更换一次培养基,2 周后嘌呤霉素筛选浓度降为 1 mg/L,3~4 周后获得稳定转染并持续表达 Adipophilin 的抗性克隆,将细胞克隆进行转移和扩增,收集病毒液。

#### 1.6 病毒感染 RAW264.7 细胞

RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中(接种密度约 4 $\times 10^5$  细胞/孔),培养过夜。取 pQCXIP-HA-Adipophilin 和 pSuper-Adipophilin siRNA 病毒液上清并分别稀释 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 倍,加入凝聚胺使其终浓度为 8 mg/L。弃去 6 孔板中的培养基,取稀释后的 1 mL 病毒凝聚胺混合液加入,每种病毒加 2 孔,感染 6 h。补充培养基,此时凝聚胺浓度降为 4 mg/L。24 h 后将 RAW264.7 细胞传代,加入终浓度为 3 mg/L 的嘌呤霉素进行阳性筛选。RT-PCR 检测 mRNA 水平(感染后利用嘌呤霉素筛选 $\geq 3$  d 的细胞方可检测),Western blot 检测蛋白表达水平(筛选 $\geq 4$  d 的细胞方可检测)。

#### 1.7 逆转录聚合酶链反应

提取 RAW264.7 细胞总 RNA(具体见超纯 RNA 提取试剂盒说明书)。取 RNA 5  $\mu$ g 合成 cDNA,再取逆转录产物 2  $\mu$ L 进行 PCR 循环。Adipophilin 引物序列为上游 5' CCAAGGATTCTGTAGCCAGCA3', 下游 5' ACAGTGGGACTCATCGGTGTC3', 扩增片段长度 523 bp;内参 GAPDH 引物序列为上游 5' TGC-CATCAACGACCCCTTCA3', 下游 5' TGACCTTGC-CCACAG3', 扩增片段长度 354 bp;nCEH 引物序列为上游 5' TGTCCTCACAACTCCACAG3', 下游 5' GACCACAGGGCTTTTCTCAG3', 扩增片段长度 438 bp。PCR 反应共设置 35 个循环,循环参数:温育(94 $^{\circ}$ C, 5 min),变性(94 $^{\circ}$ C, 30 s),退火(57.5 $^{\circ}$ C, 45 s),延伸(72 $^{\circ}$ C, 7 min)。琼脂糖凝胶电泳进行产物的检测(1.2% 琼脂糖凝胶中加入 5  $\mu$ L PCR 产物)。电泳条带采用 UVP 凝胶图像分析系统拍摄,待测基因 mRNA 表达的差异以各组目的基因与内参基因吸光度比值来比较。

#### 1.8 蛋白免疫印迹分析

收集 RAW264.7 细胞,加入细胞裂解液冰上裂解 25 min,离心(12000 r/min, 10 min)取上清得总蛋白。蛋白定量试剂盒定量,加入上样缓冲液混匀后使蛋白变性(水浴 100 $^{\circ}$ C, 7 min),冰上冷却。配制并灌注 10%SDS-PAGE 分离胶和 5%的浓缩胶,加入蛋白样品,进行电泳(先恒压 80 V,约 30~40 min;后调至 120 V,约 1 h)。切凝胶转移至 PVDF 膜上(恒流 200 mA, 2 h,转移槽置于冰中);封闭液为 5%无抗脱脂牛奶(室温,4 h),封闭后并加入鼠源性一抗溶液(稀释度为 1:500),室温下摇床振荡孵育 1 h,

4℃ 过夜;TBST 清洗 PVDF 膜 3 次;加入相应二抗(稀释度为 1:1000),摇床上缓慢摇动与膜共孵育 1 h;TBST 洗 PVDF 膜 3 次。显影。

### 1.9 液体闪烁计数法

RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中(接种密度约  $6 \times 10^6$  细胞/孔),RPMI1640(含 5%胎牛血清)培养,0.2  $\mu\text{Ci/L}$  [ $^3\text{H}$ ]标记的胆固醇处理 48 h。PBS 清洗细胞 3 次。液体闪烁计数仪检测培养液和细胞中的 [ $^3\text{H}$ ]胆固醇含量。胆固醇流出率用培养液中 cpm/(培养液+细胞)中  $\text{cpm} \times 100\%$  表示[cpm:每分钟计数(counts per minute)]。

### 1.10 高效液相色谱分析

参考文献<sup>[7]</sup>超声破碎待进行高效液相色谱分析(high performance liquid chromatography, HPLC)的细胞,测定蛋白质含量。细胞裂解产物中加入 15%的醇溶性氢氧化钾(等体积,新鲜配制,  $-20^\circ\text{C}$ ),涡旋震荡至清亮后加入 6%三氯乙酸,然后加入等体积正己烷、异丙醇混合液(二者体积比为 4:1),涡旋震荡 5 min,离心(1500 r/min,  $15^\circ\text{C}$ , 5 min)。收集有机相,下层水相按上法再次抽提 2 次,最后转移全部有机相至试管中,真空冷冻干燥机中干燥( $65^\circ\text{C}$ )并室温下冷却,加入异丙醇:正庚烷:乙腈混合液(总体积 100  $\mu\text{L}$ ,三者体积比为 35:12:52)溶解样品,活性炭去色素,超声除气,离心(1500 r/min, 5 min)。取 10  $\mu\text{L}$  收集的上清液进样,采用 C18 柱,以异丙醇:正庚烷:乙腈为流动相进行非梯度洗脱(流速 1 mL/min,柱温  $4^\circ\text{C}$ ,波长 216 nm,检测时长 8 min)。以峰面积定量游离胆固醇和总胆固醇量(总胆固醇量需以胆固醇酯酶水解胆固醇酯后再行 HPLC 测定),胆固醇酯量则由总胆固醇量减去游离胆固醇量计算得到。

### 1.11 统计学分析

所采用实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用方差分析及 *t* 检验,由 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 5.0 软件处理完成,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Adipophilin 在感染逆转录病毒的 RAW264.7 细胞中的表达情况

检测感染 pQCXIP、pQCXIP-HA-Adipophilin、pSuper-scramble siRNA、pSuper-Adipophilin siRNA 包装病毒的 RAW264.7 巨噬细胞及未处理的 RAW264.7 巨噬细胞中 Adipophilin 表达水平,

Western blot 结果显示(图 1), pQCXIP-HA-Adipophilin 包装病毒感染组 Adipophilin 表达增高,而 pSuper-Adipophilin siRNA 包装病毒感染组 Adipophilin 表达减少,与空白对照组相比,差异具有统计学意义。

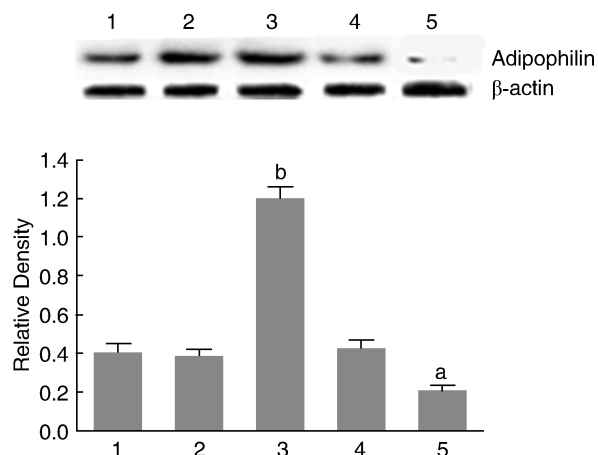


图 1. Western blot 检测 Adipophilin 在感染不同逆转录病毒的 RAW264.7 细胞中的表达情况( $n=3$ ) 1 为空白对照组,2 为空载体对照组,3 为 Adipophilin 高表达组,4 为 siRNA 对照组,5 为 Adipophilin siRNA 组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较。

Figure 1. The expression of adipophilin in RAW264.7 macrophages infected with retrovirus by Western blot( $n=3$ )

### 2.2 Adipophilin 对 RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH 表达以及脂质积蓄的影响

观察 Adipophilin 不同表达水平时, RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH 表达以及脂质积蓄的改变。RT-PCR 和 Western blot 的结果均显示(图 2),相对于空白对照组, pQCXIP-HA-Adipophilin 组(Adipophilin 高表达组) RAW264.7 巨噬细胞中, nCEH 的表达明显降低,而在 Adipophilin siRNA 组 RAW264.7 巨噬细胞中, nCEH 的表达明显增高,差异均有显著性( $P < 0.05$ )。液体闪烁计数仪及高效液相色谱法检测胆固醇流出及细胞内脂质成分的改变情况,结果显示(图 3 和表 1),相对于空白对照组, pQCXIP-HA-Adipophilin 组(Adipophilin 高表达组)胆固醇的流出明显减少,脂质积蓄增多,巨噬细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值为 51.5%,说明 Adipophilin 高表达组细胞已经泡沫化(细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值达 50% 以上为泡沫细胞的标准); Adipophilin siRNA 组胆固醇的流出明显增多,脂质积蓄减少,巨噬细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值仅为 18.9%,组间差异均有显著性( $P < 0.05$ )。综合以上检测结果,可以认为 Adipophilin 可抑制 nCEH 表达,同时影响

RAW264.7 巨噬细胞内的脂质积蓄与构成情况。

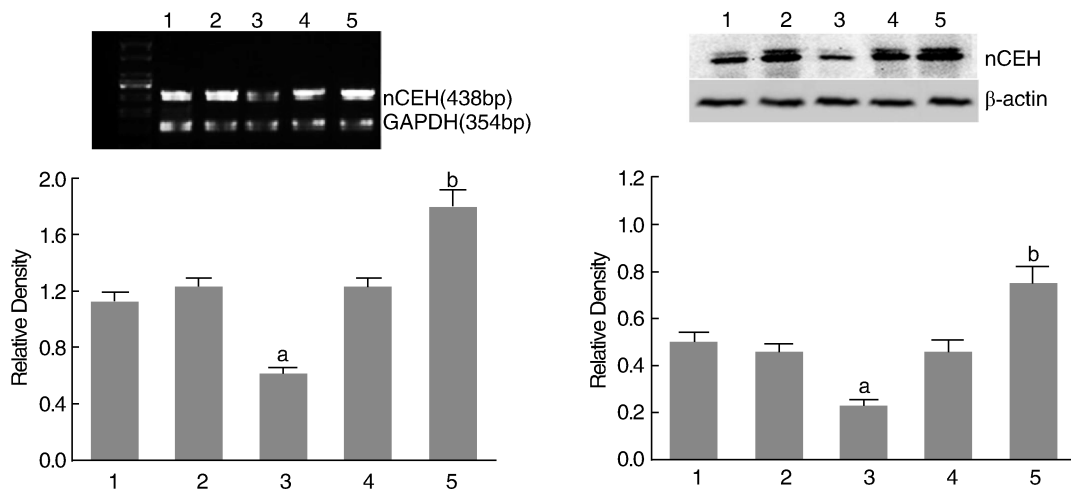


图 2. Adipophilin 对 RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH mRNA (左图) 和蛋白 (右图) 表达的影响 ( $n=3$ ) 1 为空白对照组, 2 为空载体对照组, 3 为 Adipophilin 高表达组, 4 为 siRNA 对照组, 5 为 Adipophilin siRNA 组。a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 2. Effect of adipophilin on nCEH mRNA and protein expression in RAW264.7 macrophages ( $n=3$ )

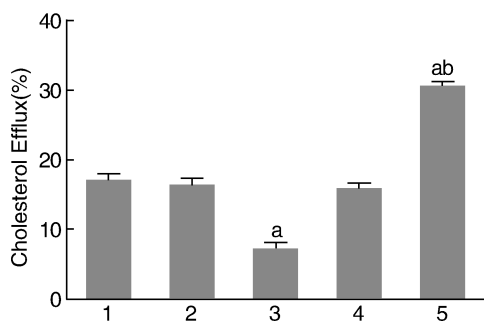


图 3. 液体闪烁计数器检测 Adipophilin 对 RAW264.7 巨噬细胞中胆固醇流出的影响 ( $n=3$ ) 1 为空白对照组, 2 为空载体对照组, 3 为 Adipophilin 高表达组, 4 为 siRNA 对照组, 5 为 Adipophilin siRNA 组。a 为  $P<0.05$ , 与空白对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 Adipophilin 高表达组比较。

Figure 3. Effect of adipophilin on cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages ( $n=3$ )

表 1. 各组 RAW264.7 巨噬细胞胆固醇、胆固醇酯含量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1. The cholesterol and cholesterol ester levels in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

分 组	FC (mg/g)	CE (mg/g)	TC (mg/g)	CE/TC (%)
空白对照组	217±23	118±19	335±34	35.3
空载体对照组	205±26	124±28	329±31	37.7
Adipophilin 高表达组	241±16 <sup>a</sup>	255±24 <sup>a</sup>	496±38 <sup>a</sup>	51.5
siRNA 对照组	223±14	118±18	341±32	34.8
Adipophilin siRNA 组	210±17 <sup>a</sup>	48.9±22 <sup>a</sup>	259±34 <sup>a</sup>	18.9

a 为  $P<0.01$ , 与空白对照组比较。

### 2.3 高表达 Adipophilin 的 RAW264.7 巨噬细胞中, PMA 和 Rottlerin 对 nCEH 表达的影响

对 pQCXIP-HA-Adipophilin 组 (Adipophilin 高表达组) RAW64.7 巨噬细胞给予 PMA 和 Rottlerin 处理后, RT-PCR 和 Western blot 的结果均显示: PKC $\delta$  激动剂 PMA 与 Adipophilin 协同增强对 nCEH 的抑制效应 (图 4), 而 PKC $\delta$  抑制剂 Rottlerin 则可以逆转 Adipophilin 对 nCEH 的抑制效应 (图 5)。这种变化趋势与 Adipophilin 不同表达水平对 nCEH 表达的作用趋势一致, 这说明在 Adipophilin 通过抑制 nCEH 促进细胞内脂质积蓄的这一过程中, PKC $\delta$  发挥了重要的作用, 很有可能是 PMA 或 Rottlerin 改变了 PKC 活性, 而 PKC 活性的变化又调控了 nCEH 的表达。

## 3 讨 论

作为脂滴相关蛋白家族的主要成员, Adipophilin 被认为是细胞内脂质积蓄的标志物, 不仅在脂滴外周含量最高促进细胞内脂质积蓄, 还可抑制胆固醇外流<sup>[8-10]</sup>。病理状态下, Adipophilin 与泡沫细胞的形成及动脉粥样硬化发生、发展密切相关<sup>[11]</sup>。临床研究发现, 有症状的颈动脉粥样硬化患者, 其动脉粥样硬化斑块中的 Adipophilin 含量较之无症状患者增加了 1.7 倍, 而且主要是分布在巨噬细胞来源的泡沫细胞区<sup>[12-13]</sup>。可见, Adipophilin 表达增高不仅会导致动脉粥样硬化斑块的形成, 还

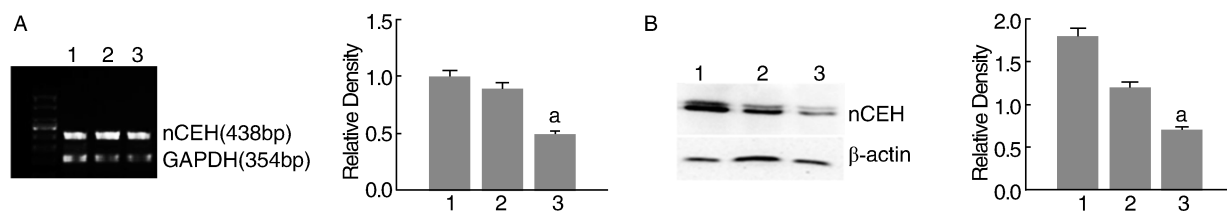


图 4. PMA 对高表达 Adipophilin 的 RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH 表达的影响 ( $n=3$ ) A 为 RT-PCR 检测 nCEH mRNA 水平, B 为 Western blot 检测 nCEH 蛋白表达水平。1 为空白对照组, 2 为空载体+PMA 对照组, 3 为 Adipophilin 高表达+PMA 组。a 为  $P<0.05$ , 与空白对照组比较。

Figure 4. Effect of PMA on nCEH expression in RAW264.7 macrophages with high adipophilin expression ( $n=3$ )

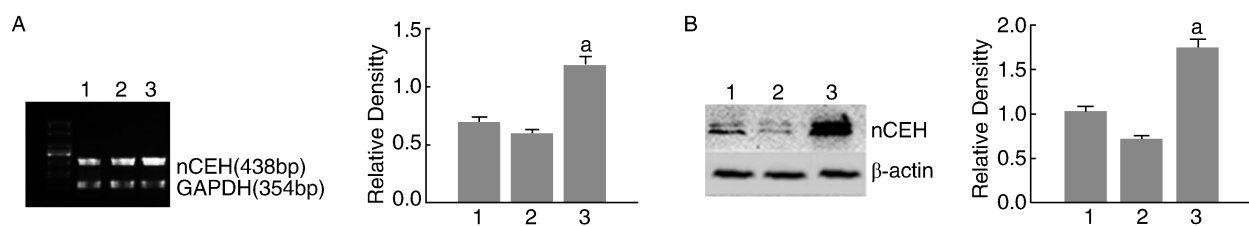


图 5. Rottlerin 对高表达 Adipophilin 的 RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH 表达的影响 ( $n=3$ ) A 为 RT-PCR 检测 nCEH mRNA 水平, B 为 Western blot 检测 nCEH 蛋白表达水平。1 为空白对照组, 2 为空载体+Rottlerin 对照组, 3 为 Adipophilin 高表达+Rottlerin 组。a 为  $P<0.05$ , 与空白对照组比较。

Figure 5. Effect of Rottlerin on nCEH expression in RAW264.7 macrophages with high adipophilin expression ( $n=3$ )

与动脉粥样硬化患者的临床症状轻重具有相关性。近年来随着对 Adipophilin 的不懈研究,我们对 Adipophilin 促脂质积蓄的作用已经相当熟识,对其结构、分布及功能也十分清楚,但其促进脂质积蓄的关键机制却尚不明确,还需要进一步的研究和探讨。

nCEH 是我们所熟知的中性胆固醇酯水解酶,其主要功能是水解细胞中的胆固醇酯,使本身不能从细胞内流出的胆固醇酯以游离胆固醇的形式流出细胞,从而减少细胞内的胆固醇积蓄<sup>[3-4]</sup>。很显然,在脂滴形成与水解过程中,Adipophilin 与 nCEH 存在着功能上的拮抗性。现有的研究表明,当 nCEH 水解胆固醇酯时,原本通过 N-端锚定在内质网的 nCEH 就会转移到脂滴,与 Adipophilin 同时存在于脂滴表面。而另有研究发现, nCEH 的表达信号亦出现在动脉粥样硬化病变区、外周血单核巨噬细胞以及 Adipophilin 表达增高的 CD68+ 细胞中<sup>[2]</sup>。再者,本课题组运用免疫共沉淀技术证明 Adipophilin 与 nCEH 可以结合<sup>[14]</sup>。那么 Adipophilin 与 nCEH 之间是否存在某种关系,由 Adipophilin 介导的细胞内脂质积蓄是否就是通过 nCEH 来实现的? 为此,本实验检测了 Adipophilin 不同表达水平时, RAW264.7 巨噬细胞中 nCEH 表达以及脂质积蓄的改变。RT-PCR 和蛋白质印迹的结果均显示, Adipophilin 高表达时, nCEH 表达明显降低,而 Adipophilin

被抑制时, nCEH 表达则明显增高; 而细胞内脂质积蓄的变化情况刚好与 nCEH 表达呈相反趋势。可见, Adipophilin 可抑制 nCEH 表达, nCEH 表达改变可以影响 RAW264.7 巨噬细胞内的脂质积蓄与构成情况。因此我们推测 nCEH 或许是 Adipophilin 的一个下游作用靶点, 正常生理情况下, Adipophilin 可以通过调节 nCEH 的表达使脂质的合成与分解处于平衡状态, 而当机体处于病理状态时, 在脂滴表面大量表达的 Adipophilin 则会抑制 nCEH 表达, 从而使胆固醇酯的分解及流出受到阻碍, 导致细胞内脂质的异常蓄积。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是重要的细胞内信号转导分子, 其同工酶可分为 4 大类 13 个亚型<sup>[15]</sup>。其中, PKC $\delta$  属非  $Ca^{2+}$  依赖性的, 受二酰基甘油调节<sup>[16]</sup>。静息状态下 PKC 多位于胞浆, 激活时从胞浆转位至胞膜。PKC 的活性可影响细胞内胆固醇流入和外排<sup>[17]</sup>。本课题组前期研究证实<sup>[6]</sup>, Adipophilin 介导的 THP-1 巨噬细胞脂质积蓄过程受到 PKC 活性的影响, 同时又有研究发现<sup>[18]</sup>, RAW264.7 巨噬细胞与油酸共孵育 5 min 后, PKC $\delta$  从胞浆向胞膜转位, 16 h 后, PKC $\delta$  表达减少并与 Adipophilin 共同位于脂滴表面。于是, 我们选取了 PKC 亚型 PKC $\delta$  作为重点研究对象。通过之前的实验, 我们得知 Adipophilin 可抑制 nCEH 表达, 而 Adipophilin 积聚细胞

内脂质的过程又涉及 PKC 信号途径,那么 PKC 活性的增加与 nCEH 的表达有没有调控与被调控的关系呢?总结有关 PKC 及 nCEH 的研究,我们推测 Adipophilin 可能是通过激活 PKC,进一步引起 nCEH 表达的减少,从而使细胞内胆固醇酯积聚。为了验证该推测,本研究采用了 PKC $\delta$  的特异性激动剂 PMA 和抑制剂 Rottlerin 处理 RAW264.7 巨噬细胞。结果显示,与空白对照组相比,Adipophilin 高表达细胞同时与 PKC $\delta$  激动剂 PMA 共孵育 30 min,可以协同增强 Adipophilin 对 nCEH 的抑制作用;而如果 Adipophilin 高表达细胞同时与 PKC $\delta$  抑制剂 Rottlerin 共孵育 30 min,则可以有效逆转高表达 Adipophilin 所致的 nCEH 低表达。这些结果说明,Adipophilin 促进细胞内脂质积蓄可以通过激活 PKC $\delta$  从而抑制 nCEH 表达来实现。

从本文的结果来看,nCEH 是 Adipophilin 促 RWA264.7 巨噬细胞脂质积蓄的关键点,PKC $\delta$  则在其中扮演着一个“桥梁”的角色。越来越多的研究已经把 Adipophilin 做为防治动脉粥样硬化的新靶点,对其促进细胞内胆固醇酯积聚的机制研究越透彻越有利动脉粥样硬化的防治。本研究探讨了 Adipophilin 与 nCEH 在调节脂质积蓄中的作用,在完善动脉粥样硬化机制研究的同时也将为临床防治动脉粥样硬化提供新的研究思路。

#### [参考文献]

- [1] Parks BW, Lusis AJ. Macrophage accumulation in atherosclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(24): 2352-353.
- [2] Igarashi M, Osuga JI, Isshiki M, et al. Targeting of neutral cholesterol ester hydrolase to the endoplasmic reticulum via its N-terminal sequence[J]. *J Lipid Res*, 2009, 51(2): 274-285.
- [3] Zhao B, Song J, Chow WN, et al. Macrophage-specific transgenic expression of cholesteryl ester hydrolase significantly reduces atherosclerosis and lesion necrosis in LDLr mice[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2983-992.
- [4] Zhao B, Fisher BJ, St Clair RW, et al. Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading[J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(10): 2114-121.
- [5] Okazaki H, Igarashi M, Nishi M, et al. Identification of neutral cholesterol ester hydrolase, a key enzyme removing cholesterol from

- macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33357-364.
- [6] 王中群, 杨永宗, 王佐, 等. 蛋白激酶 C 活性变化对 Adipophilin 介导 THP-1 巨噬细胞脂质积蓄的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(10): 1055-064.
- [7] 王佐, 李全忠, 杨向东, 等. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的 U937 细胞内胆固醇及胆固醇酯[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6(4): 317-320.
- [8] Larigauderie G, Furman C, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3): 504-510.
- [9] Liu PS, Ying YS, Zhao YM, et al. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3787-792.
- [10] Kumi TS, Shintaro O, Toshiaki H, et al. The surface of lipid droplets is a phospholipids monolayer with a unique fatty acid composition[J]. *Biol Chem*, 2002, 277(46): 44507-512.
- [11] Shiffman D, Mikita T, Tai JT, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37324-332.
- [12] Ijas P, Nuotio K, Saksi J, et al. Microarray analysis reveals overexpression of CD163 and HO-1 in symptomatic carotid plaques[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1): 154-160.
- [13] Nuotio K, Isoviita PM, Saksi J, et al. Adipophilin expression is increased in symptomatic carotid atherosclerosis: correlation with red blood cells and cholesterol crystals [J]. *Stroke*, 2007, 38(6): 1791-798.
- [14] 乔运成, 彭娟, 袁中华, 等. 巨噬细胞荷脂过程中脂肪分化相关蛋白与酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 及中性胆固醇酯水解酶相互结合[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(12): 1201-206.
- [15] Parker P J, Murray-Rust J. PKC at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(2): 131-132.
- [16] Jones JA, Stroud RE, Kaplan BS, et al. Differential protein kinase C isoform abundance in ascending aortic aneurysms from patients with bicuspid versus tricuspid aortic valves[J]. *Circulation*, 2007, 116(11 Suppl): I144-149.
- [17] Li Q, Tsujita M, Yokoyama S. Selective down-regulation by protein kinase C inhibitors of apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux in macrophages [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(40): 1045-052.
- [18] Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 86(4): 784-791.

(此文编辑 许雪梅)