

脂联素对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达及细胞内胆固醇含量的影响

徐 萍, 陈连凤, 王晋峰, 方 全, 严晓伟

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院心内科, 北京市 100730)

[关键词] 细胞生物学; 脂联素; 泡沫细胞; 胆固醇逆转运; 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 通过研究脂联素对细胞内胆固醇外流的影响以及三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 的功能变化, 探讨其抗动脉粥样硬化作用的可能机制。方法 以 THP-1 来源的泡沫细胞模型为研究对象, 用脂联素进行体外干预; 采用逆转录聚合酶链反应、酶联免疫吸附试验和高效液相色谱等方法测定干预前后三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达和细胞内胆固醇含量的变化。结果 脂联素在体外上调泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 和蛋白的表达, 与载脂蛋白 A1 联合作用还能进一步增加细胞内胆固醇的流出。脂联素单独作用促进细胞内胆固醇酯转化为游离胆固醇。结论 脂联素上调泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 表达, 并促进其介导的细胞内游离胆固醇的外流; 脂联素还能促进细胞内胆固醇酯的水解。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Adiponectin on ATP Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux in THP-1 Derived Foam Cells

XU Ping, CHEN Lian-Feng, WANG Jing-Feng, FANG Quan, and YAN Xiao-Wei

(Peking Union Medical College (PUMC) Hospital, PUMC and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Adiponectin; Foam Cells; Reverse Cholesterol Transport; ATP Binding Cassette Transporter A1; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To further discuss the anti-atherosclerotic mechanism of adiponectin, the impact of adiponectin on cholesterol efflux mediated by ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in THP-1 derived foam cells was studied. **Methods** THP-1 derived foam cells were incubated with apolipoprotein A1 (apoA1), adiponectin, and apoA1+ adiponectin in vitro, respectively. RT-PCR, ELISA and HPLC were used to determine the influence of adiponectin on ABCA1 mRNA and protein expression and on intracellular cholesterol content before and after treatments. **Results** Adiponectin could up-regulate ABCA1 mRNA and protein expression in THP-1 derived foam cells in vitro. Adiponectin alone could enhance the transformation from cholesterol ester to free cholesterol. In combination with apoA1, it could increase the ABCA1 mediated efflux of intracellular cholesterol significantly. **Conclusions** Adiponectin inhibit intracellular cholesterol deposit in foam cells by enhancing the hydrolysis of intracellular cholesterol ester. It can up-regulate ABCA1 expression, and accelerate ABCA1 mediated intracellular free cholesterol efflux.

泡沫细胞形成是动脉粥样硬化的特征表现。促使胆固醇从泡沫细胞中流出对防止动脉粥样硬化的发生发展具有重要意义^[1]。胆固醇逆转运过程中最初的关键限速步骤是将细胞内游离胆固醇和磷脂转运到细胞外新生的高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 颗粒^[2], 而三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 在此过程中起重要作用。脂联素是脂肪细胞分泌的因子之一, 是脂肪细胞特异性血浆蛋白, 它能抑制内皮细胞

炎症反应及血管平滑肌细胞增殖, 同时抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化^[3-5], 从而发挥抗动脉粥样硬化作用, 但脂联素对胆固醇逆转运环节的影响并不清楚。本研究旨在探讨脂联素对泡沫细胞 ABCA1 表达及其介导的细胞内胆固醇外流的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

THP-1 细胞株为人急性单核细胞白血病细胞株, 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.2 主要试剂、药品及器材

佛波酯、载脂蛋白 A1、胆固醇、胆固醇氧化酶及胆固醇酯酶购自 Sigma 公司; 乙酰化低密度脂蛋白

[收稿日期] 2006-11-20 [修回日期] 2007-06-02

[作者简介] 徐萍, 博士, 住院医师。陈连凤, 主管技师, 主要从事细胞生物学和分子生物学实验研究。通讯作者严晓伟, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂质代谢和临床药理研究, E-mail 为 xswy_pumc@yahoo.com.cn。

(acetylate low density lipoprotein, ac-LDL) 购自中国医学科学院基础医学研究所; 重组人脂联素购自 Bio-Vendor 公司; ABCA1 和 β -actin 引物购自上海生工生物工程有限公司; 兔抗人 ABCA1 多克隆抗体购自 Abcam 公司; 抗人 CD68 单克隆抗体和 SP 免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; BCA 蛋白测定试剂盒购自 Pierce 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司。液相色谱仪为 Waters 公司产品。

1.3 泡沫细胞模型的建立及鉴定

THP-1 细胞用含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基在 37℃、5% CO₂-95% 空气的恒温培养箱中静置培养。传代 3 天后, 用 160 nmol/L 佛波酯与 THP-1 细胞共培养 48 h, 使其诱导分化成巨噬细胞; 再与 50 mg/L ac-LDL 共培养 48 h 建立泡沫细胞模型。用抗人 CD68 抗体鉴定 THP-1 来源的巨噬细胞, 根据 SP 免疫组织化学试剂盒说明步骤进行, 细胞被染成不均匀红褐色为阳性。再用油红 O 染色鉴定泡沫细胞, 显微镜下可见胞内亮红色脂滴。

1.4 实验分组

空白对照组为 RPMI 1640 完全培养基; 载脂蛋白 A1 组为含 10 mg/L 载脂蛋白 A1 的培养基; 脂联素组为含 1 和 5 mg/L 脂联素的培养基; 脂联素与载脂蛋白 A1 联合作用组为含 1 和 5 mg/L 脂联素 + 10 mg/L 载脂蛋白 A1 的培养基。脂联素的使用浓度参考以往的实验研究^[3, 10]。培养时间均为 48 h。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 的表达

按 Trizol 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA, 保证 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间。取 1 μ g 细胞总 RNA, 依据试剂盒说明步骤进行逆转录。再取 4 μ L 逆转录产物进行 PCR 循环, 共 35 个循环, 末次循环 72℃, 延伸 10 min。取扩增产物 5 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 测定各组 ABCA1 基因及 β -actin 基因灰度值, 以二者比值代表 ABCA1。ABCA1 引物序列上游 5'-GCT GCT GAA GCC AGG GCA TGG G-3', 下游 5'-GTG GGG CAG TGG CCA TAC TCC-3', 扩增产物长度为 306 bp。内参照 β -actin 的引物序列上游 5'-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG C-3', 下游 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC G-3', 扩增产物长度为 1128 bp。

1.6 酶联免疫吸附法检测泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白的表达

用 RIPA 裂解液裂解处理细胞, BCA 法测定总

蛋白, 使蛋白含量在 1~2 g/L。取 3 份各 20 μ L, 分别加入 96 孔板中, 碳酸盐包被 4℃ 下过夜。H₂O₂-乙醇除过氧化物酶。1:200 兔抗人 ABCA1 一抗 4℃ 过夜, 1:500 生物素化羊抗兔二抗 37℃ 孵育 15 min, 1:500 HRP 标记链亲和素 37℃ 孵育 15 min。TMB 显色, 15 min 后用 2% H₂SO₄ 终止反应。450 nm、620 nm 参考波长下读取 OD 值。实验重复 3 次。

1.7 酶法结合高效液相色谱法测定细胞内胆固醇含量

RIPA 裂解液裂解细胞, 使蛋白含量在 100~200 mg/L。取 2 份各 100 μ L, 参照文献[6], 采用酶法结合高效液相色谱法测定细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC) 和游离胆固醇(free cholesterol, FC), TC 与 FC 的差值为胆固醇酯(cholesterol ester, CE)。实验重复 2 次。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析和 Post-hoc 分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1 来源细胞的泡沫化

用 50 mg/L ac-LDL 与 THP-1 巨噬细胞共同培育 48 h, 经油红 O 染色, 显微镜下观察发现细胞内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特点(图 1)。同时用高效液相色谱分析发现胆固醇酯与总胆固醇比值达到 60% 以上, 已为泡沫化细胞。

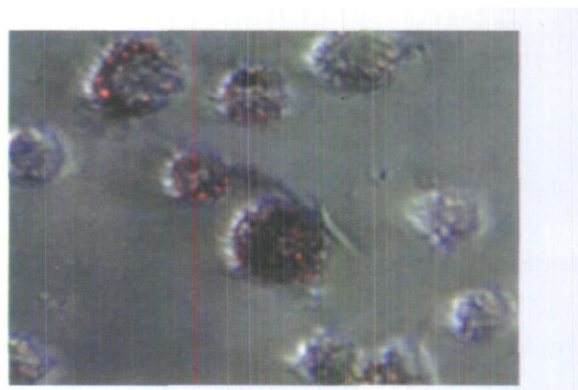


图 1 泡沫化的 THP-1 巨噬细胞

2.2 脂联素和载脂蛋白 A1 对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 表达的影响

脂联素能诱导泡沫细胞 ABCA1 mRNA 的表达(P<0.01), 5 mg/L 脂联素比 1 mg/L 的诱导作用更强(P<0.01); 但 10 mg/L 载脂蛋白 A1 对其无明显

影响(表 1 和图 2)。

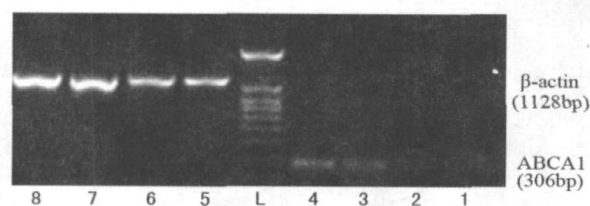


图 2. 脂联素和载脂蛋白 A1 对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 表达的影响 1 为 10 mg/L 载脂蛋白 A1 组, 2 为对照组, 3 为 1 mg/L 脂联素组, 4 为 5 mg/L 脂联素组, 5-8 分别为 1-4 的 β -actin, L 为 100 bp DNA ladder。

表 1. 脂联素和载脂蛋白 A1 对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.130 \pm 0.011	0.938 \pm 0.066
1 mg/L 脂联素	0.322 \pm 0.060 ^a	1.121 \pm 0.020 ^a
5 mg/L 脂联素	0.486 \pm 0.076 ^{ab}	1.225 \pm 0.096 ^a
10 mg/L 载脂蛋白 A1	0.114 \pm 0.011	1.084 \pm 0.039 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 1 mg/L 脂联素组比较。

2.3 脂联素和载脂蛋白 A1 对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白表达的影响

脂联素可刺激 ABCA1 蛋白的表达 ($P < 0.01$), 且 5 mg/L 脂联素的作用比 1 mg/L 脂联素更为显著 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 10 mg/L 载脂蛋白 A1 使 ABCA1 蛋白表达上升 ($P < 0.01$; 表 2 和图 3)。

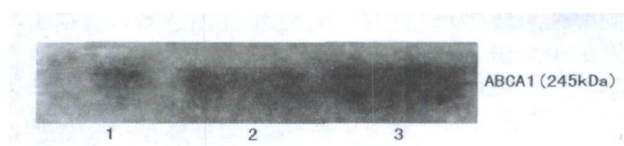


图 3. 脂联素对泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 1 mg/L 脂联素组, 3 为 5 mg/L 脂联素组。

2.4 泡沫细胞内胆固醇含量

脂联素单独作用对细胞内 TC 无显著影响, 却能促进 CE 转化为 FC, CE/FC 比值明显降低 ($P < 0.05$); 脂联素与载脂蛋白 A1 的联合作用使胞内 TC、FC 和 CE 均减少, 即能促进细胞内胆固醇的外流, 且比载脂蛋白 A1 单独作用效果更强 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 泡沫细胞经不同干预因素作用后细胞内胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s$, mg/g)

分 组	FC	CE	TC	CE/TC
空白对照组	17.4 \pm 1.6	41.2 \pm 5.0	58.6 \pm 6.6	0.70 \pm 0.01
1 mg/L 脂联素	31.6 \pm 4.3 ^a	28.8 \pm 1.4 ^a	60.5 \pm 5.7	0.48 \pm 0.02 ^a
5 mg/L 脂联素	51.5 \pm 4.8 ^a	3.7 \pm 2.1 ^a	54.7 \pm 6.7	0.07 \pm 0.03 ^a
10 mg/L 载脂蛋白 A1	10.4 \pm 1.4	20.1 \pm 3.3	31.0 \pm 4.7	0.65 \pm 0.01
1 mg/L 脂联素 + 10 mg/L 载脂蛋白 A1	9.3 \pm 0.6 ^b	17.8 \pm 2.5 ^b	27.3 \pm 3.0 ^b	0.65 \pm 0.02
5 mg/L 脂联素 + 10 mg/L 载脂蛋白 A1	2.4 \pm 0.2 ^b	4.9 \pm 0.8 ^b	7.3 \pm 1.0 ^b	0.67 \pm 0.02

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较, b 为 $P < 0.05$, 与脂联素和载脂蛋白 A1 组比较。

3 讨论

胆固醇逆转运是体内抗动脉粥样硬化的生理性保护机制。ABCA1 是 ATP 结合盒转运子超家族的成员, 是胆固醇逆转运起始步骤的关键, 有乏脂载脂蛋白 A1 存在时, 它能将巨噬细胞中的磷脂和 FC^[7,8] 转移到细胞外。在 ABCA1 介导的细胞内胆固醇外流中, 载脂蛋白 A1 是胆固醇流出的接受体^[9]。

本研究结果发现, 脂联素可以增加泡沫细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白的表达; 烟酸类药物也能上调 ABCA1 mRNA 的表达。但脂联素并不因此显著增强细胞内胆固醇外流, 它对胆固醇外流的促进作用只

有在载脂蛋白 A1 存在时才表现出来, 且促进胆固醇外流的作用比载脂蛋白 A1 单独存在时显著增强。说明脂联素必须在有细胞外脂质接受体载脂蛋白 A1 存在的前提下才能促进细胞内胆固醇外流, 即脂联素对胞内胆固醇外流的促进是在 ABCA1 的介导下完成的。

另外, 本研究还发现脂联素单独作用能促进胞内胆固醇酯转化为游离胆固醇。可以认为脂联素促进胆固醇酯转化为游离胆固醇是抑制胞内胆固醇沉积的机制之一, 因为只有当胞内胆固醇酯转化为游离胆固醇之后, 它才能被 ABCA1 介导流出。脂联素为 ABCA1 介导的脂质流出提供了更为丰富、获得更

好的游离胆固醇池。

细胞内胆固醇酯水解是细胞内胆固醇外流的前提和限速过程。在保持胞内胆固醇酯和游离胆固醇的动态平衡中,乙酰辅酶 A 胆固醇酰基转移酶 1 (ACAT1) 通过将游离胆固醇酯化为胆固醇酯抑制细胞内胆固醇外流,而中性胆固醇酯水解酶通过促胆固醇酯水解,为细胞内胆固醇外流创造条件。研究发现少量脂联素即可使 ACAT1 蛋白表达减少,活性降低,同时抑制 4 个 ACAT1 mRNA 转录子的表达^[10]。因此,脂联素可能通过对 ACAT1 的抑制从而阻止胞内游离胆固醇的酯化。Yamauchi 等^[11]以成纤维细胞为研究对象,发现 ACAT 的失活可以通过上调 ABCA1 而促进向载脂蛋白 A1 的胆固醇流出。本实验显示脂联素具有促进 ABCA1 表达、并同时增强向载脂蛋白 A1 的细胞内胆固醇流出的功能,很可能也是通过 ACAT 途径实现的,具体机制仍有待进一步验证。

本研究的局限之处为仅观察了脂联素对 ABCA1 介导的细胞内胆固醇外流的影响,尽管这是细胞内胆固醇外流的主要途径,并且是单向流动,但本研究没有观察脂联素对其它细胞内胆固醇外流途径影响。因此,从本研究无法确定脂联素对细胞内胆固醇外流的影响是否主要通过促进 ABCA1 介导的细胞内胆固醇外流来实现。

脂联素升高细胞内游离胆固醇含量,降低细胞内胆固醇酯含量,并显著促进 ABCA1 介导的巨噬细胞内胆固醇外流。这是脂联素发挥抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (12): 1 221-232.
- [2] Martinez LO, Jacquet S, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R. New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, **61** (18): 2 343-360.
- [3] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages [J]. *Circulation*, 2001, **103** (8): 1 057-063.
- [4] Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, Muraguchi M, Ouchi N, Takahashi M, et al. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls [J]. *Horm Metab Res*, 2000, **32** (2): 47-50.
- [5] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway [J]. *Circulation*, 2000, **102** (11): 1 296-301.
- [6] Contreras JA, Castro M, Bocos C, Herrera E, Lasuncion MA. Combination of an enzymatic method and HPLC for the quantitation of cholesterol in cultured cells [J]. *J Lipid Res*, 1992, **33** (6): 931-936.
- [7] 严晓伟, 陈连凤, 江 恬. 阿托伐他汀钙和非诺贝特酸对 2 型糖尿病患者泡沫细胞胆固醇外流的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, **8** (5): 292-295.
- [8] Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance [J]. *J Biochim Biophys Acta*, 1999, **1 461**: 217-236.
- [9] Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of apoA I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (42): 33 053-058.
- [10] Furukawa K, Hori M, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Adiponectin downregulates acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 in cultured human monocyte derived macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **317** (3): 831-836.
- [11] Yamauchi Y, Chang CC, Hayashi M, Aber-Dohmae S, Reid PC, Chang TY, et al. Intracellular cholesterol mobilization involved in the ABCA1/apolipoprotein mediated assembly of high density lipoprotein in fibroblasts [J]. *J Lipid Res*, 2004, **45** (10): 1 943-951.

(此文编辑 文玉珊)