

# Calphostin C 抑制脂肪分化相关蛋白诱导的 ACAT1 表达

袁中华<sup>1</sup>, 陶媛<sup>1</sup>, 刘清南<sup>2</sup>, 黄谔非<sup>3</sup>, 刘晓辉<sup>4</sup>, 田国平<sup>5</sup>, 唐朝克<sup>1</sup>, 易光辉<sup>1</sup>, 王佐<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. 益阳医学高等专科学校护理系基础护理学教研室, 湖南省益阳市 413000; 3. 深圳市西丽医院病理科, 广东省深圳市 518050; 4. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏省苏州市 215400; 5. 南华大学附属第二医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 脂肪分化相关蛋白; 乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1; Calphostin C

[摘要] **目的** 我们已经发现 adipophilin 通过改变乙酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 (ACAT1) 的表达来促进细胞内脂质蓄积, 病理状态下形成泡沫细胞, 成为动脉粥样硬化的始动因素。本研究旨在探讨该过程所涉及的信号通路, 阐明 adipophilin 引起细胞内脂质积聚的机制。**方法** 通过克隆 adipophilin 基因, 构建逆转录病毒载体 pQCXIP-HA-Adi, 使用 siRNA 技术构建 pSuper-retro-adipophilin siRNA 逆转录病毒载体, 包装病毒后, 感染 RAW264.7 细胞, 筛选后获得高或低表达 adipophilin 的细胞。将该细胞分别与 300 nmol/L PKC 抑制剂 Calphostin C 孵育 16 h 或同时再加入 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 共孵育, 应用 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞内 ACAT1 的表达。当低表达 adipophilin 的细胞与 Calphostin C 共孵育时, 在不同的时间点取样, RT-PCR 和 Western blot 检测各时间点细胞内 ACAT1 的表达。**结果** 高表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 表达增加, 低表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 表达减少。无论在高或低表达 adipophilin 的细胞中, Calphostin C 能够抑制 ACAT1 的表达, 与不孵育 Calphostin C 组相比差别有显著性。与 ox-LDL 孵育使高表达 adipophilin 的细胞荷脂, 同样能够发现 Calphostin C 抑制 ACAT1 的表达。低表达 adipophilin 的细胞与 Calphostin C 共孵育 1 h 后, ACAT1 mRNA 开始下降; 孵育 8 h 后, ACAT1 蛋白开始下降; 孵育 16 h 后 ACAT1 mRNA 及蛋白表达均明显下降, 与对照组相比差别有显著性。高及低表达 adipophilin 或负荷脂质状态下, Calphostin C 能够时间依赖性的抑制 ACAT1 的表达。**结论** adipophilin 引起细胞内脂质积聚的机制可能是, PKC 信号分子作用于 adipophilin, 并进一步影响 ACAT1 的表达, 最终导致细胞内脂质积聚。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Calphostin C Inhibit Adipophilin-induced Expression of ACAT 1

YUAN Zhong-Hua<sup>1</sup>, TAO Yuan<sup>1</sup>, LIU Qing-Nan<sup>2</sup>, HUANG An-Fei<sup>3</sup>, LIU Xiao-Hui<sup>4</sup>, TIAN Guo-Ping<sup>5</sup>, TANG Chao-Ke<sup>1</sup>, YI Guang-Hui<sup>1</sup>, and WANG Zuo<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Basic Nursing, Yiyang Medical College, Yiyang, Hunan 413000, China; 3. Department of Pathology, Xili People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518050, China; 4. Cyrus Tang Hematology Center, Jiangsu Institute of Hematology, The First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215400, China; 5. Department of Cardiovascular Medicine, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Adipophilin; Acyl-coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase 1; Calphostin C

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the signaling pathways involved in the process which adipophilin induced the intracellular lipid accumulation. **Methods** We obtained the RAW264.7 cells of high or low expression of adipophilin by constructing retroviral vector. Then the cells were incubated with 300 nmol/L of Calphostin C (PKC inhibitor) for 16 h or incubated with 50 mg/L ox-LDL simultaneously. The expression of ACAT1 was detected by RT-PCR and Western blot.

[收稿日期] 2012-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30971268); 教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[2008]890号)

[作者简介] 袁中华, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为泡沫细胞形成的分子机制。陶媛, 硕士研究生, 研究方向为泡沫细胞形成的分子机制。通讯作者田国平, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压防治, E-mail 为 pgtian555@hotmail.com。

**Results** The results showed that RAW264. 7 cells with high expression of adipophilin increased the expression of ACAT1, and decreased in cells of low expression of adipophilin. Calphostin C inhibited the expression of ACAT1 in the cells with high or low expression of adipophilin. Compared with the cells incubated without Calphostin C, the difference was significant. Calphostin C also inhibited the expression of ACAT1 when incubated the cells of high expression of adipophilin with ox-LDL for lipid-loading. Both mRNA and protein were significantly decreased after incubated for 16 h and the difference was significant compared with the control. In the condition of lipid-loaded, Calphostin C could inhibit ACAT1 expression time-dependently in cells of low expression of adipophilin.

**Conclusion** The results indicated that PKC signaling molecules affected adipophilin expression and further affected the expression of ACAT1. It suggests that PKC signal could be related to adipophilin causing intracellular lipid accumulation.

脂肪分化相关蛋白(adipose differentiation-related protein, ADRP)属脂滴周围蛋白 PAT 家族中的一员,与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生及发展密切相关<sup>[1,2]</sup>。它是细胞内积聚脂质以及与脂质积聚有关疾病的标志物<sup>[3]</sup>。我们的研究发现<sup>[4,5]</sup>,它促进细胞内脂质积聚主要通过酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1(acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1, ACAT1)而实现的。ACAT1 是细胞内主要合成胆固醇酯的酶,主要作用是维持细胞内胆固醇的代谢平衡。ACAT1 位于内质网上,合成的脂质根据细胞的状态决定其去向。当细胞内脂质增多时,合成的脂质将形成脂滴,贮存在细胞质。Forcheron 等<sup>[6]</sup>在 As 斑块中同时检测出了 adipophilin 与 ACAT1,与斑块周围组织相比,adipophilin 与 ACAT1 均高表达,两者均分布在巨噬细胞丰富区域。

既然 adipophilin 通过 ACAT1 促进细胞内脂质积聚,那么,寻找涉及该过程的信号通路就是急需解决的问题。Chen 等<sup>[7]</sup>和我们课题组<sup>[5]</sup>均发现,adipophilin 的表达可受到蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的激动剂和抑制剂的调控,提示在 adipophilin 引起细胞内脂质增多的过程中与 PKC 信号通路有关。

本课题拟在前期研究的基础上,使用基因表达及 RNA 干扰技术获得高及低表达 adipophilin 的细胞,应用这两类细胞,加入 PKC 抑制剂 Calphostin C 分别验证 adipophilin 影响 ACAT1 的表达是否通过 PKC 信号通路,揭示 adipophilin 导致细胞内脂质积聚,病理状态下,形成泡沫细胞,促进 As 的发生发展的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及分组

RAW264. 7 细胞(购自中国科学院上海细胞生物研究所)使用 RPMI1640 培养基, PA317 细胞

(中南大学湘雅医学院生物化学教研室馈赠)使用 DMEM-high 培养基,培养基中加入 10% 胎牛血清,在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度状态下培养。实验共分为三组:Control 组用 Raw 细胞;Vector 组用空质粒所包装的病毒感染 Raw 细胞;Hi-Adi 组或 L-Adi 组用 pQCXIP-HA-Adi (Hi-Adi 组)或 pSuper-retro-adipophilin siRNA (L-Adi 组)质粒所包装的病毒感染 Raw 细胞。另外,在低表达 adipophilin 的研究中,增加了 scramble 组作为阴性对照(用 pSuper-retro-scramble siRNA 质粒所包装的病毒感染 Raw 细胞)。

1.2 载体的构建及扩增

从培养的小鼠(C57BL/6J)血管平滑肌细胞(第 6 代)克隆 adipophilin 基因,先构建克隆载体 pCR2. 1-adipophilin,测序正确后,再构建逆转录病毒表达载体 pQCXIP-HA-Adi,具体方法见文献[4]。

根据 adipophilin mRNA 序列(AY035850),使用 Oligoengine Co. (USA)的 RNAi 系统软件设计 adipophilin siRNA 序列,序列为 AUG CAC AGU GCC AAC CAG A,对应于 AY035850 的 793-811 位置。在引物的两端分别加上 Bgl II 和 Hind III 酶切位点,中间加入发夹结构。Forward 链序列为 5'-GAT CCC CAT GCA CAG TGC CAA CCA GAT TCA AGA GAT CTG GTT GGC ACT GTG CAT TTT TTA-3', Reverse 链序列为 5'-AGC TTA AAA AAT GCA CAG TGC CAA CA G ATC TCT TGA ATC TGG TTG GCA CTG TGC ATG GG-3'。同时根据文献[8]设计 scramble siRNA 作为阴性对照。把合成的 forward 链和 reverse 链溶解到 anealing buffer 中,使用 PCR 仪从 90℃开始逐渐降温,直到 4℃,使两条链互补。Bgl II 和 Hind III 酶切 pSuper. retro. puro 载体,使之线性化。然后,用 T4 DNA 连接酶连接,用连接产物转化到 DH5α,扩增,提取质粒。使用 EcoR I 和 Hind III 酶切,与空质粒对照,鉴定阳性克隆。然后测序确定序列正确。得到 pSuper-retro-adipophilin siRNA 和 pSuper-retro-scramble siRNA 逆转录病毒载体。

使用  $\text{CaCl}_2$  法制备 DH5 $\alpha$  感受态细胞,把构建的质粒分别转入细菌内,抗生素筛选,扩增。使用 B 型超纯质粒小提试剂盒(北京 Fermentas 公司)进行质粒提取,对提取的质粒进行酶切(EcoR I 和 Hind III)及 PCR 反应进行鉴定。

### 1.3 获得高及低表达 adipophilin 的细胞

双嗜性包装细胞系 PA317 细胞按  $4 \times 10^5$  接种于 6 孔板中,95% 铺满培养板后,用 100  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养基分别稀释 2  $\mu\text{g}$  质粒,轻轻混匀。取 6  $\mu\text{L}$  梭华基因转染试剂(厦门太阳马生物工程有限公司)加入 100  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养基中稀释,轻轻混匀。再将梭华稀释液滴加到 DNA 稀释液中,室温孵育 20 min。PA317 用无血清培养基洗 2 次,再将梭华/DNA 混合物滴加入每孔的包装细胞上,轻轻摇动使之均匀混合。37 $^{\circ}\text{C}$  下培养 4 h,更换含 10% 体积血清的培养基继续培养。继续培养至 48 h,用 2 mg/L Puromycin 进行筛选,以后每 2~3 天更换一次含 2 mg/L Puromycin 的完全培养基,筛选 10~12 天后,大部分细胞已经死亡,此时更换含 1 mg/L Puromycin 培养基维持筛选,继续培养 3~4 周,可获得稳定转染抗性克隆,将细胞克隆进行转移和扩增,收集含有病毒的培养液。

将  $4 \times 10^5$  RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日取各种病毒上清分别以  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  倍稀释,并加入 polybrene 至终浓度为 8 mg/L,混匀。弃去 RAW264.7 细胞的培养基,分别吸取 1 mL 稀释的病毒液,加入 6 孔板中,每种病毒加 2 孔,感染 6 h。补充含 10% 小牛血清的 1640 培养基,使 polybrene 浓度为 4 mg/L。培养 24 h 后将 RAW264.7 细胞以 1:2 传代,并加入终浓度为 3 mg/L Puromycin 筛选阳性克隆。待大部分细胞死亡后,改为 1.5 mg/L Puromycin 的完全培养基继续筛选。持续培养 2 周,可见阳性细胞克隆生长,可获得高(Hi-Adi 组)及低(L-Adi 组)表达 adipophilin 的 RAW264.7 细胞。分别使用 RT-PCR 及 Western blot 鉴定细胞中 adipophilin mRNA 及蛋白的表达,结果显示,与非感染病毒的对照组相比,Hi-Adi 组 adipophilin 表达显著增高,L-Adi 组 adipophilin 表达显著降低,且差别有显著性<sup>[4,9]</sup>。

### 1.4 氧化型低密度脂蛋白的制备

参考文献[10]的方法制备氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。取新鲜人血浆 100~200 mL(购自衡阳市中心血站),采用序列超速离心法制备低密度脂蛋白(low density

lipoprotein, LDL)。将新鲜的 LDL 置含 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  的 PBS 中,37 $^{\circ}\text{C}$  透析 18 h,40 mmol/L BHT 和 20 mmol/L EDTA 终止氧化,然后在 0.9% NaCl、0.003% EDTA (pH7.4)、4 $^{\circ}\text{C}$  中透析 24 h,除菌保存。蛋白定量后调蛋白浓度至 1 g/L,4 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。采用琼脂糖凝胶电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 ox-LDL,结果显示,ox-LDL 为单一蛋白条带,琼脂糖凝胶电泳的迁移速率快于 LDL,颜色由氧化前的橙黄色变为氧化后的乳白色。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应

用 Trizol 试剂提取 RNA,取 RNA 2  $\mu\text{g}$ ,用 Im-Prom-ITM Reverse Transcriptase 合成 cDNA,再取逆转录产物 10  $\mu\text{L}$  进行 PCR。ACAT1 引物序列为 5'-TGC CTG AGC TAC TTC TAC CCA-3' (forward) 和 5'-CAC GTA ACG ACA AGT CCA GGT-3' (reverse),PCR 扩增产物长度为 266 bp; GAPDH 引物序列为 5'-CAG TCC ATG CCA TCA CTG CCA-3' (forward) 和 5'-AGG TGG AGG AGT GGG TGT CGC -3' (reverse),扩增片断长度 395 bp。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 5 min。反应结束后,取 RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析,以各组目的基因与内参照基因吸光度值的比值来比较待测基因 mRNA 的表达差异。

### 1.6 蛋白免疫印迹分析

细胞处理结束后,裂解细胞,细胞蛋白定量后,用水调整各样本浓度相等,行 Western blot 分析。抗体分别使用 ACAT1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、 $\beta$ -actin 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描,以对照组的面积灰度值为 100%,与实验组进行比较和半定量分析。

### 1.7 统计学方法

实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析和  $t$  检验,由 SPSS11.0 统计软件完成,以  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Calphostin C 对高或低表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 表达的影响

无论是 mRNA 或蛋白的水平,在 Control 组和 Vector 组 Calphostin C 可以抑制 ACAT1 的表达;在

Hi-Adi 组 Calphostin C 能明显抑制 ACAT1 的表达, 加与不加 Calphostin C 的两组相比差异有显著性。高表达 adipophilin 后, ACAT1 的表达也明显增加 (图 1)。加入 Calphostin C 后, 对于 Control 组和

Vector 组, ACAT1 的表达改变不显著; L-Adi 组 ACAT1 的表达显著下降, 与阴性对照组相比差异有显著性。另外, 使用 siRNA 抑制了 adipophilin 的表达, 也使得 ACAT1 表达大幅度降低 (图 2)。

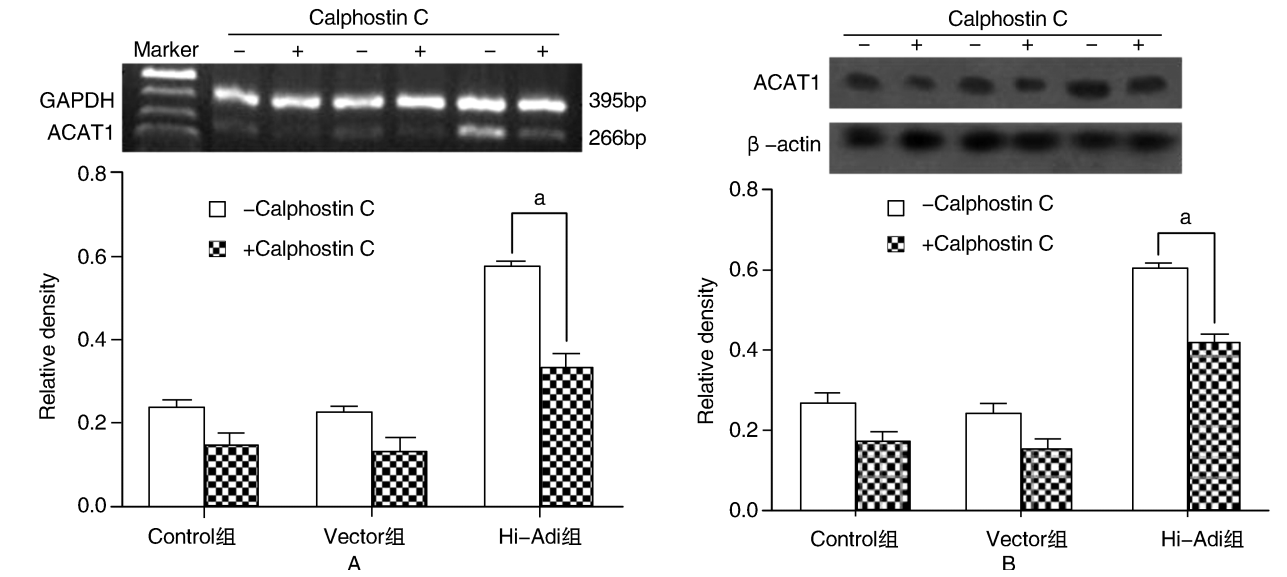


图 1. Calphostin C 处理高表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 的表达变化 ( $n = 3$ ) A 图为 RT-PCR 结果, B 图为 Western blot 结果。a 为  $P < 0.05$ 。

Figure 1. Expression of ACAT1 in cells with high expression adipophilin incubated with Calphostin C

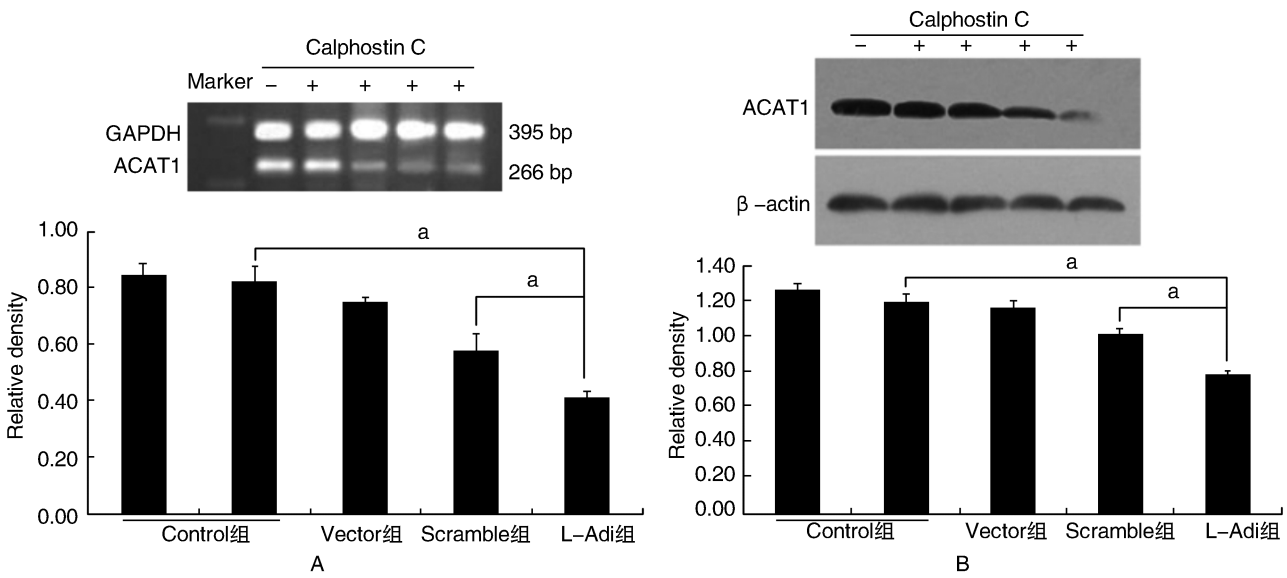


图 2. Calphostin C 处理低表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 的表达变化 ( $n = 3$ ) A 图为 RT-PCR 结果, B 图为 Western blot 结果。a 为  $P < 0.05$ 。

Figure 2. Expression of ACAT1 in cells with low expression adipophilin incubated with Calphostin C

### 2.2 Calphostin C 对荷脂的高表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 表达的影响

各组在荷脂的情况下, Calphostin C 仍能抑制 ACAT1 mRNA 和蛋白的表达。尤其在 Hi-Adi 细胞, 加与不加 Calphostin C 的两组比较差别有显著性 (图 3)。

### 2.3 Calphostin C 处理低表达 adipophilin 细胞后 ACAT1 表达变化的时效性

RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, 与 Calphostin C 孵育 1 h 后, ACAT1 mRNA 开始下降; 孵育 8 h 后, ACAT1 蛋白开始下降; 孵育 16 h 后 ACAT1



mRNA 及蛋白表达明显下降,与 0 时间点相比差异有显著性(图 4)。

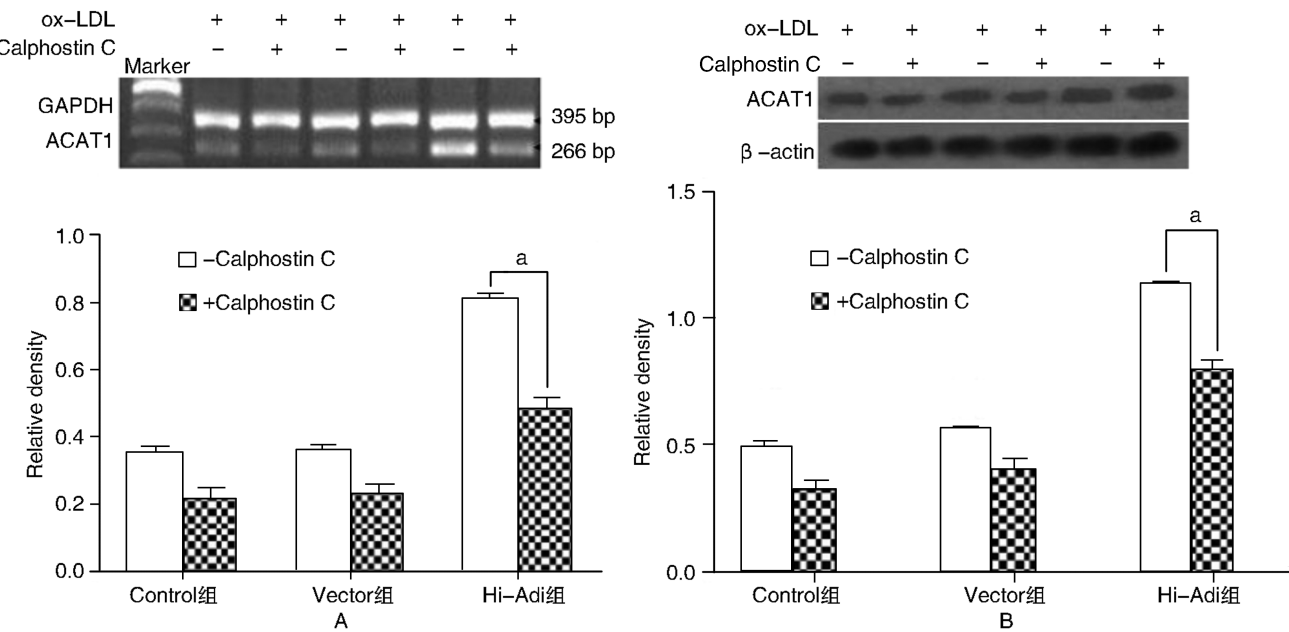


图 3. Calphostin C 对荷脂的高表达 adipophilin 细胞中 ACAT1 表达的影响( $n=3$ ) A 图为 RT-PCR 结果,B 图为 Western blot 结果。a 为  $P<0.05$ 。

Figure 3. Expression of ACAT1 in lipid-loading cells with high expression adipophilin incubated with Calphostin C

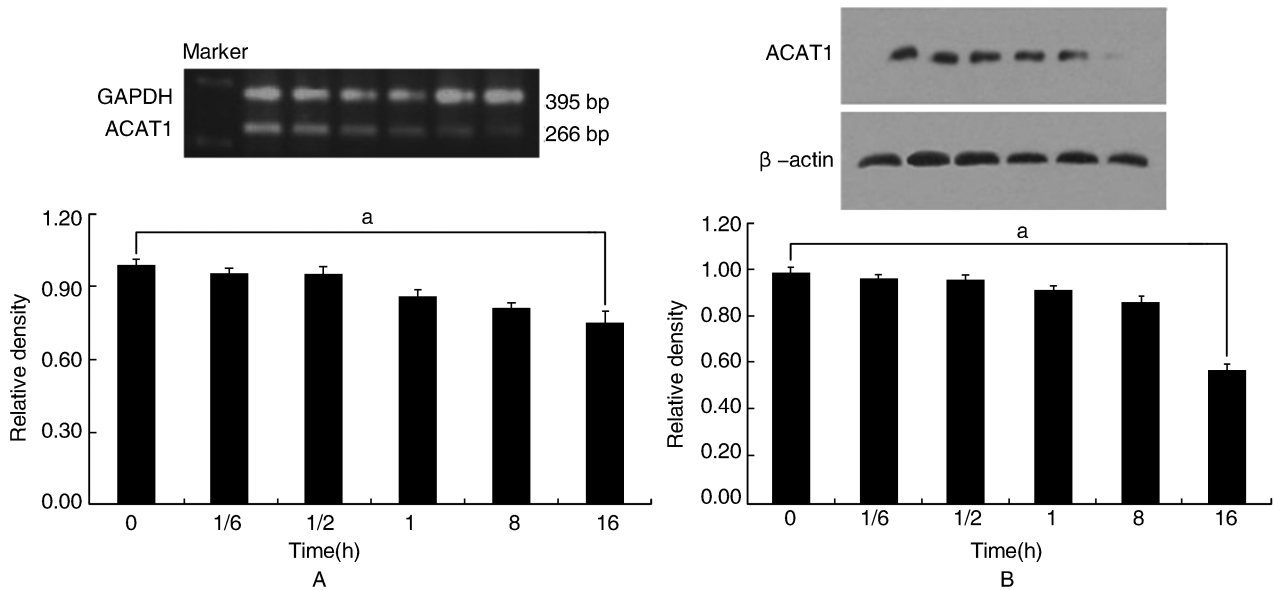


图 4. Calphostin C 处理低表达 adipophilin 细胞后 ACAT1 表达变化的时效关系( $n=3$ ) A 图为 RT-PCR 结果,B 图为 Western blot 结果。a 为  $P<0.05$ 。

Figure 4. Time dependent changes of ACAT1 in cells with low expression adipophilin incubated with Calphostin C

### 3 讨论

泡沫细胞形成是 As 病变中主要的细胞学改变,泡沫细胞来源于巨噬细胞和血管平滑肌细胞,甘油三酯、胆固醇酯等中性脂质大量蓄积于细胞内。在

泡沫细胞中,蓄积的脂质主要以脂滴的形式贮存于胞浆中,adipophilin 是脂滴相关蛋白中含量较高的一种<sup>[11]</sup>,是 1992 年 Jiang 等<sup>[12]</sup>从小鼠 1246 脂肪细胞中分离到的一个由 425 个氨基酸组成的蛋白,分子量在 47 kDa ~ 53 kDa 之间,等电点为 6.72,属于

脂滴周围蛋白家族。

在兔 As 斑块中有 adipophilin 的高表达,提示 adipophilin 与 As 发生密切相关<sup>[13]</sup>。Hao 等<sup>[2]</sup>把颈动脉内膜切除术患者的斑块进行组织学分级研究,发现症状较重的患者(Ⅳ级)纤维帽中 adipophilin 阳性的巨噬细胞浸润多,与神经病学状态不稳定一致。Larigauderie 等<sup>[14]</sup>使用高表达 adipophilin 的 THP-1 巨噬细胞在以乙酰化 LDL 为脂质负荷的情况下,其细胞内甘油三酯及胆固醇分别上升了 43% 和 67%。以 siRNA 抑制 adipophilin 表达后,两者的蓄积均明显下降。尽管这些研究已经表明 adipophilin 与 As 发生发展密切相关,但是,它作用的机制尚不清楚。

有研究发现,adipophilin 与 ACAT 并行出现在 As 疾病中。Forcheron 等<sup>[6]</sup>在 As 斑块中同时检测了 adipophilin 与 ACAT1,与斑块周围组织相比,adipophilin 与 ACAT1 均高表达。我们发现<sup>[4,15,16]</sup>,使用反义寡核苷酸抑制 adipophilin 表达的同时,也使得 ACAT 的活性降低。THP-1 巨噬细胞及 RAW264.7 细胞高表达 adipophilin 后,ACAT1 也表达增高,同时,细胞蓄积脂质加强。提示 adipophilin 通过 ACAT1 促进细胞内胆固醇酯蓄积。本研究结果也证实,在 RAW264.7 细胞中,无论是 mRNA 水平,还是蛋白水平,高表达 adipophilin 会引起 ACAT1 高表达;反之,使用 siRNA 抑制 adipophilin 的表达会导致 ACAT1 低表达。

既然 adipophilin 通过 ACAT1 促进细胞内胆固醇酯蓄积,那么,adipophilin 是通过哪条信号通路而作用于 ACAT1 就是一个非常关键的问题。

Chen 等<sup>[7]</sup>发现负荷胆固醇酯的 RAW 264.7 巨噬细胞中脂滴的集聚与 PKC 抑制剂(Calphostin C)或激动剂(PMA)有关,其间也伴随着 adipophilin 表达的改变。我们发现<sup>[5,17]</sup>负荷脂质后,高表达 adipophilin 的 RAW 264.7 细胞中,PKC 活性增加,ACAT1 表达也增加。使用 PKC 激动剂及抑制剂可以影响细胞内的脂质积聚。这些研究提示,adipophilin 在通过改变 ACAT1 表达导致细胞内脂质积聚的过程中,可能有 PKC 信号分子参与。

PKC 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,是细胞内信号转导的重要分子,静息状态下 PKC 多位于胞浆,激活时从胞浆转位至胞膜,并经历一系列复杂的磷酸化过程。活化后的 PKC 催化 ATP 的磷酸基团转移至不同的底物蛋白,通过其下游底物磷酸化引发相应的生物学功能改变,参与多种生理和病理过程。其中,PKC 的活性可改变细胞胆固醇流入和

流出,是近来在 As 研究领域倍受关注的一个热点。

所以,本研究通过构建逆转录病毒载体,转染并获得稳定高及低表达 adipophilin 的 RAW264.7 细胞株,使用 PKC 抑制剂 Calphostin C,观察其对 ACAT1 的影响,探讨 adipophilin 引起 ACAT1 表达的改变是否通过 PKC 信号通路。PKC 抑制剂 Calphostin C 是从 *Cladosporium chadosponoides* 分离出来的具有多醌结构、作用于 PKC 调节区的特异性抑制剂。预实验结果显示,Calphostin C 作用于细胞具浓度依赖性,且当浓度为 300 nmol 时,有统计学意义,所以,本研究选择此浓度作为处理浓度。在高表达 adipophilin 的细胞中,加入 Calphostin C,能够抑制 ACAT1 的表达,与不加 Calphostin C 的 Hi-Adi 组相比差别有显著性;在低表达 adipophilin 的细胞中,加入 Calphostin C,也能抑制 ACAT1 的表达,与阴性对照组及 Control 组相比差别均有显著性。

已有研究显示<sup>[18]</sup>,在 adipophilin 基因启动子区域,有一个 5'-AGG TGA AAG GGC G-3'的过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)反应元件(PPAR response element, PPRE)能够被 PPAR 结合并调控 adipophilin 基因的表达。PPAR 调控 adipophilin 表达时,它需要与视黄醇类 X 受体(retinoid X receptor, RXR)形成异源二聚体,同时还需要再结合转录共激活物(peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein, PBP)才能发挥转录活性。目前已知 PBP 上有 3 个 PKC 磷酸化位点,PKC 信号传导途径可能通过 PBP 上的磷酸化位点或者直接通过对 PPAR 的磷酸化修饰,达到调控 adipophilin 转录的目的<sup>[17]</sup>。也有一些研究发现<sup>[19]</sup>,adipophilin 是一个磷酸化的蛋白,磷酸化的位点在 291 位的丝氨酸上。那么,该位点是否能被 PKC 磷酸化,从而引起 ACAT1 的表达也是一个值得怀疑的地方,但是,这方面尚未见报道。而本研究结果显示 PKC 抑制剂 Calphostin C 能下调 ACAT1 的 mRNA 和蛋白的表达,因此可以推测 PKC 可能首先影响 adipophilin 的表达,通过 adipophilin 的改变进一步影响 ACAT1 的表达。

巨噬细胞会大量摄入 ox-LDL,在细胞内以脂滴的形式保存,在这种情况下,adipophilin 会表达增多。本研究还观察了在荷脂的情况下,adipophilin 高表达的细胞中,Calphostin C 仍能抑制 ACAT1 表达,与不加 Calphostin C 组相比差别有显著性。在低表达 adipophilin 的细胞中,当给予 Calphostin C 后 ACAT1 的表达下降尤为显著,那么,在低表达 adipophilin 的细胞中,PKC 抑制剂 Calphostin C 对 ACAT1 表达的抑制

作用是否具有时效性呢?结果显示,孵育 1 h 后, ACAT1 mRNA 开始下降;孵育 8 h 后, ACAT1 蛋白开始下降;孵育 16 h 后 ACAT1 mRNA 及蛋白表达均明显下降,与 0 时间点相比差别有显著性。这些结果更进一步验证了我们的推测, Calphostin C 作用于 adipophilin, 再抑制 ACAT1 表达。

综上所述,本工作验证了 PKC 活性变化对 adipophilin 介导 ACAT1 变化的影响,结合以前研究,我们可以推测 adipophilin 促进细胞内脂质蓄积的机制可能为:外源性的修饰脂蛋白引起 PKC 信号通路发生变化,改变 PPRE 的状态,使得 adipophilin 基因表达, adipophilin 的表达进一步导致 ACAT1 表达增加,合成细胞内脂质增加,形成大量脂滴。病理状态下,形成泡沫细胞,进一步发展为 As。若能在这一调控通路上设计相应的药物,将会阻止泡沫细胞的形成,并进一步防治 As。

#### [参考文献]

- [1] Buers I, Hofnagel O, Ruebel A, et al. Lipid droplet associated proteins: an emerging role in atherogenesis[J]. *Histol Histopathol*, 2011, 26 (5): 631-642.
- [2] Hao H, Iihara K, Ishibashi-Ueda H, et al. Correlation of thin fibrous cap possessing adipophilin-positive macrophages and intraplaque hemorrhage with high clinical risk for carotid endarterectomy[J]. *J Neurosurg*, 2011, 114 (4): 1 080-087.
- [3] Buechler C, Ritter M, Duong CQ, et al. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1532 (1-2): 97-104.
- [4] 乔运成, 黄谔非, 田国平, 等. 脂肪分化相关蛋白促进 RAW264.7 细胞内酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 高表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (8): 643-647.
- [5] 袁中华, 刘晓辉, 王中群, 等. 脂肪分化相关蛋白通过蛋白激酶 C 和酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 促进 THP-1 巨噬细胞蓄积脂质[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24 (5): 833-842.
- [6] Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, et al. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (8): 1 711-717.
- [7] Chen JS, Greenberg AS, Tseng YZ, et al. Possible involvement of protein kinase C in the induction of adipose differentiation-related protein by Sterol ester in RAW 264.7 macrophages [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 83 (2): 187-199.
- [8] Zhang L, Fogg DK, Waisman DM. RNA interference-me-

- diated silencing of the S100A10 gene attenuates plasmin generation and invasiveness of Colo 222 colorectal cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (3): 2 053-062.
- [9] Liu QN, Dai ZB, Liu ZQ, et al. The effects of high expression and knockdown adipophilin in the activity of ERK1/2 and expression of PPAR $\gamma$  and lipid accumulation in cells[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2011, 38 (12): 1 132-144.
- [10] Yuan ZH, Yang YZ, Yang XY. Oxidized-LDL leads to cholesteryl ester accumulation and apoptosis in porcine aortic smooth muscle cells[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29 (2): 217-222.
- [11] Liu P, Ying Y, Zhao Y, 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): 3 787-792.
- [12] Jiang HP, Serrero G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (17): 7 856-860.
- [13] Yuan ZH, Yang YZ, Yin WD, et al. Induced expression of adipophilin with high cholesterol diet in rabbit atherosclerotic lesions and reduced lipid accumulation with adipophilin antisense in mouse macrophages[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2003, 30 (4): 549-554.
- [14] Larigauderie G, Furman C, Jaye M, 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.
- [15] Yuan ZH, Yang YZ, Yin WD, et al. Adipophilin antisense oligonucleotides decreased ACAT activity[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2004, 31 (10): 930-935.
- [16] 袁中华, 贾薇, Niu XL, 等. 脂肪分化相关蛋白通过酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶 1 促进巨噬细胞脂质蓄积[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (2): 101-106.
- [17] 王中群, 杨永宗, 王 佐, 等. 蛋白激酶 C 活性变化对 Adipophilin 介导 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34 (10): 1 055-064.
- [18] Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, et al. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1728 (1-2): 95-104.
- [19] Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, et al. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6 (8): 3 256-265.

(此文编辑 文玉珊)