

血清淀粉样 P 物质对泡沫细胞形成的影响

廉会娟, 石镜明, 崔海燕, 李岩松, 孙正启

(西藏民族大学医学部, 陕西省咸阳市 712082)

[关键词] 淀粉样 P 物质; 泡沫细胞; 脂肪分化相关蛋白

[摘要] **目的** 通过观察泡沫细胞形成、脂滴形态以及脂滴表面蛋白分子表达的情况, 探讨血清淀粉样 P 物质(SAP)对泡沫细胞发生发展的影响。**方法** 利用 THP-1 细胞, 通过佛波酯(PMA)处理 48 h, 诱导其分化成为巨噬细胞, 再用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)联合脂多糖(LPS)诱导其成为泡沫细胞作为对照组, 实验组在上述过程中加入不同浓度 SAP(10、20 mg/L)进行干预。采用油红 O 染色分析 SAP 对泡沫细胞形成的影响, 观察脂质蓄积; 同时利用 Bodipy493/503 染色, 在荧光显微镜下观察泡沫细胞内脂滴形态及数量; 提取上述泡沫细胞内的脂质, 通过试剂盒定量测定细胞内甘油三酯(TG)和胆固醇酯(CE)含量; 利用 Western blot 对脂滴表面相关的蛋白进行分析, 如乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC1)、脂肪分化相关蛋白(ADRP)、47 kDa 的尾连蛋白(TIP47)、组蛋白去甲基化酶(JMJD3)、脂肪酸合成酶(FAS)的表达水平。**结果** 油红 O 染色和 Bodipy493/503 染色显示, 实验组细胞内的脂滴大小更大、数量更多, 且 20 mg/L SAP 干预组较 10 mg/L SAP 干预组趋势更明显; 脂质定量检测结果显示, 实验组 TG、CE 含量增高, 20 mg/L SAP 干预组较 10 mg/L SAP 干预组更高; Western blot 结果显示, SAP 能够增强 ADRP、TIP47、JMJD3、FAS 的表达水平, 除了 FAS 在不同 SAP 浓度干预组表达水平一样外, 其余均随着 SAP 浓度的增加表达水平也增强。**结论** SAP 能够促进泡沫细胞形成, 增强脂质蓄积; SAP 能够增强相关脂蛋白的表达水平。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of serum amyloid P component on foam cell formation

LIAN Huijuan, SHI Jingming, CUI Haiyan, LI Yansong, SUN Zhengqi

(Department of Medicine, Tibet Nationalities University, Xianyang, Shaanxi 712082, China)

[KEY WORDS] serum amyloid P component; foam cells; adipocyte differentiation related protein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of serum amyloid P component (SAP) on the formation and development of foam cells by observing the formation of foam cells, the morphology of lipid droplets and the expression of lipid droplet surface protein molecules. **Methods** THP-1 cells were induced to differentiate into macrophages after 48 hours of PMA treatment, and then foam cells were induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) combined with lipopolysaccharide (LPS) as control group. Different concentrations of SAP (10, 20 mg/L) were added to the experimental group for intervention. Oil red O staining was used to analyze the effect of SAP on foam cell formation and lipid accumulation, and Bodipy493/503 staining was used to observe the morphology and quantity of lipid droplets in foam cells under fluorescence microscope. The lipids in the foam cells were extracted and the contents of triglyceride (TG) and cholesterol ester (CE) in the foam cells were quantitatively determined by kit. Western blot was used to analyze lipid droplet surface related proteins, such as acetyl coenzyme A carboxylase (ACC1), adipogenesis related protein (ADRP), 47 kDa telopenin (TIP47), histone demethylase (JMJD3), fatty acid synthase (FAS). **Results** Oil red O staining and Bodipy493/503 staining showed that intracellular lipid droplets in the experimental group were larger and more numerous, and the trend was more obvious in the 20 mg/L SAP intervention group than in the 10 mg/L SAP intervention group. The results showed that SAP could enhance the expression levels of ADRP, TIP47, JMJD3 and FAS. Except for the same expression level of FAS in different concentration of SAP intervention group, the expression level of FAS increased with the increase of SAP concentration. **Conclusion** SAP can promote the formation of foam cells and enhance the accumula-

[收稿日期] 2018-02-09

[修回日期] 2018-03-27

[基金项目] 西藏自治区科技厅项目(2016ZR-MQ-04);西藏民族大学青年学人培育计划项目(16MYQP08)

[作者简介] 廉会娟, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的形成与发展, E-mail 为 xiaoye12999@163.com。通信作者孙正启, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化的形成与发展, E-mail 为 szq712082@163.com。

tion of lipid, SAP can enhance the expression of related lipoproteins.

泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化发生发展的病理学基础,多种机制共同作用于诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞^[1],但详细的分子机制尚未阐明。目前,炎症反应学说以及脂质代谢异常学说最被认可^[2-3],低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的升高以及高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的降低被认为是动脉粥样硬化的独立危险因素,而脂质代谢异常和内皮的损伤也是动脉粥样硬化的始动因素^[4-5]。血清淀粉样P物质(serum amyloid P component, SAP)作为C反应蛋白(C reactive protein, CRP)的同家族成员,以钙离子依赖性而与多种受体结合^[6]。越来越多的研究发现, SAP在粥样斑块中表达增强,并且含量随着病变的严重而不断加重。也有研究发现,心脑血管疾病患者的血清中SAP水平明显增加,证实SAP与心脑血管疾病的发生存在一定关系^[7],但是详细机制尚未明确。本研究利用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导THP-1源性泡沫细胞形成,观察SAP对细胞内脂质蓄积、脂滴数目和大小以及相关蛋白表达水平的影响,为研究SAP影响泡沫细胞形成的分子机制提供新的证据及思路。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1人单核细胞系购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);胎牛血清购自杭州四季青公司;RPMI1640培养基购自Gibco公司;LPS、SAP、油红O购自Sigma公司;SAP购自美国EMD Chemicals公司;PMA购自Promega公司;DRP、TIP47、FAS、ACC1、JMJD3S兔多克隆抗体购自Abcam公司;甘油三酯(triglyceride, TG)及胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)试剂盒购自Wako公司;ox-LDL购自广州奕源公司;Bodipy493/503购自Invitrogen公司。

1.2 泡沫细胞的诱导以及实验分组

所有细胞均使用THP-1细胞,以RPMI1640培养基培育,在开始诱导之前,将每一皿细胞数调至 2×10^9 Cells/L。首先将细胞诱导为贴壁的巨噬细胞,以100 μ g/L PMA培育48 h。换培养液,实验分组:①对照组:ox-LDL 50 mg/L联合LPS 1 mg/L;②SAP 10 mg/L干预组:ox-LDL 50 mg/L、LPS 1 mg/L联合

SAP 10 mg/L;③SAP 20 mg/L干预组:ox-LDL 50 mg/L、LPS 1 mg/L联合SAP 20 mg/L;37℃、95% CO₂条件下培育48 h,形成泡沫细胞。上述分组均设立5组样本分析。

1.3 荧光显微镜下细胞内脂滴的观察

通过上述流程诱导泡沫细胞,以冷PBS轻轻清洗3次,然后以多聚甲醛固定泡沫细胞,浓度为40 g/L,再以浓度为1 g/L的染色剂(Bodipy403/503)处理30 min,荧光显微镜观察处理后的细胞内脂滴大小及数量。油红O染色观察细胞内脂质。

1.4 脂质定量检测

待泡沫细胞诱导成功后,以冷PBS轻轻清洗3次,再将培养皿内细胞刮下,并完全洗涤,收集细胞全部悬液以3:2的正己烷:异丙醇提取细胞脂质,待干燥后以TritonX-100的PBS溶解脂类,浓度为20 mL/L,根据试剂盒说明书检测样本中相关脂质含量,测定结束后,待总蛋白干燥,利用氢氧化钾溶解样品,再以Bradford测定其浓度。

1.5 相关蛋白表达水平检测

为了将细胞内的相关脂蛋白水平进行检测,首先将细胞裂解,提取蛋白。上述流程结束后转膜,封闭时用50 g/L脱脂牛奶处理60 min, PBST洗膜5 min \times 3次,然后分别加入兔抗鼠ACC1、JMJD3、ADRP、TIP47、FAS抗体,4℃摇床下过夜,再以PBST洗膜,方法同上,加入HRP标记的羊抗兔二抗,室温培育1 h,再次洗膜,时间次数同上,最后以ECT化学发光显色,X线片显影,以 β -tubulin做对照组。

1.6 统计学分析

所有数据均采用SPSS 19.0统计学分析软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAP促进THP-1细胞源性泡沫细胞形成

THP-1细胞经PMA诱导为贴壁的巨噬细胞,再由LPS联合ox-LDL诱导泡沫细胞形成,48 h后,油红O染色观察,细胞内均有脂质形成;镜下显示, SAP能够促进泡沫细胞形成,相比对照组,加入SAP的细胞内脂质明显增多;Bodipy403/503染色显示,相比对照组, SAP干预组脂滴更大、数量更多,并且随着SAP浓度的增加脂质蓄积及脂滴形成情况更明显(图1和图2)。

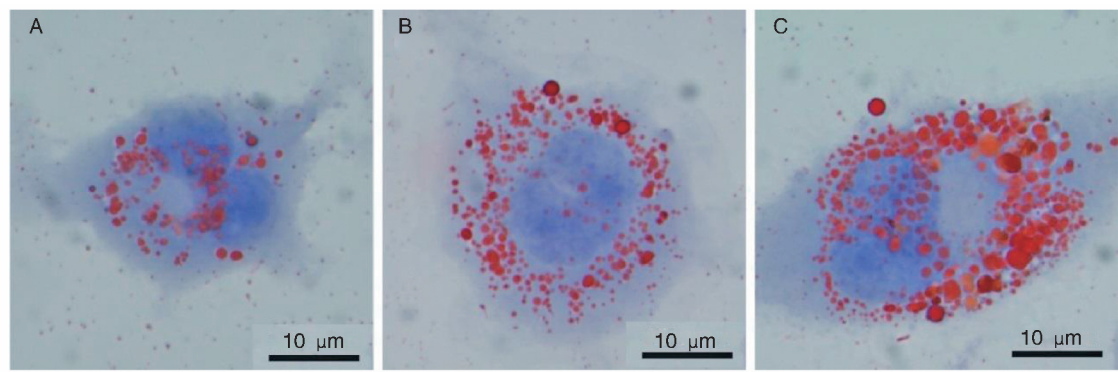


图 1. SAP 对泡沫细胞脂质蓄积的影响 A 为对照组,B 为 SAP 10 mg/L 干预组,C 为 SAP 20 mg/L 干预组。

Figure 1. Effect of SAP on lipid accumulation in foam cells

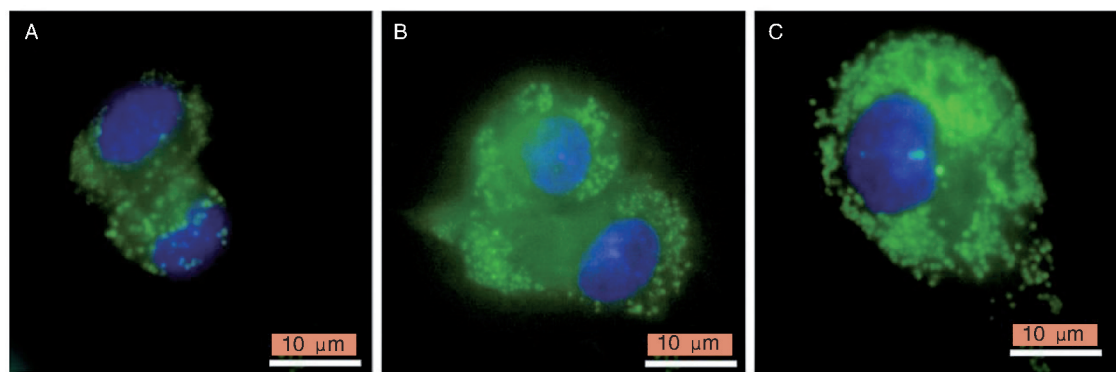


图 2. SAP 对泡沫细胞脂滴形成的影响 A 为对照组,B 为 SAP 10 mg/L 干预组,C 为 SAP 20 mg/L 干预组。

Figure 2. Effect of SAP on the formation of lipid droplets in foam cells

2.2 细胞内脂质蓄积情况

为明确 SAP 对泡沫细胞内 TG、CE 形成的影响,实验中提取细胞内总脂质,以试剂盒检测 TG、CE 含量。结果发现,随着 SAP 的加入,细胞内 TG、CE 含量明显增加,并且随着 SAP 浓度的增加 TG 和 CE 的含量均增加,脂滴变化与其观察一致(图 3 和图 4)。

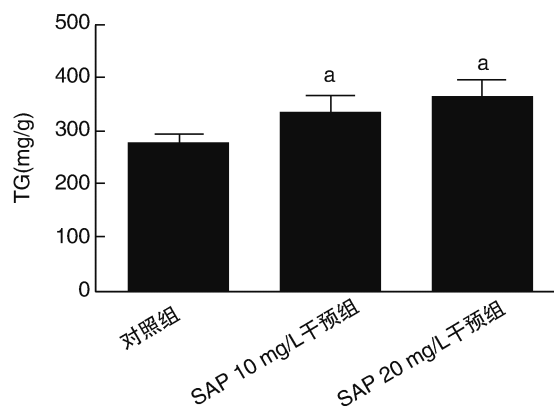


图 3. SAP 对泡沫细胞中 TG 含量的影响($n=5$) a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

Figure 3. Effect of SAP on TG content in foam cells

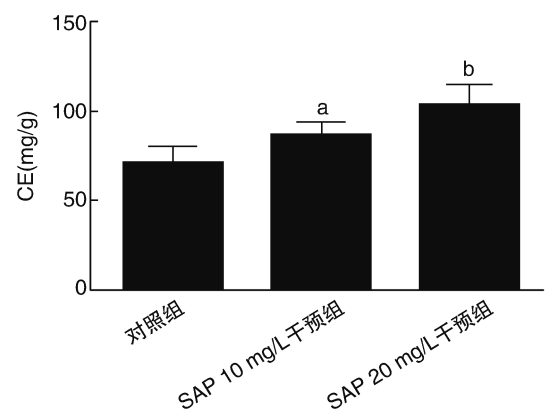


图 4. SAP 对泡沫细胞中 CE 含量的影响($n=5$) a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 4. Effect of SAP on CE content in foam cells

2.3 SAP 对相关脂蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测 ADRP、TIP47、FAS、ACC1、JMJD3 表达水平,结果发现,SAP 能够增强 ADRP、TIP47、JMJD3、FAS 的表达水平,并且其中除了 FAS 在 SAP 不同浓度表达水平一样外,其余均随着 SAP 浓度的增加表达水平也增强。但 SAP 对

ACC1 的表达水平无明显作用(图 5)。

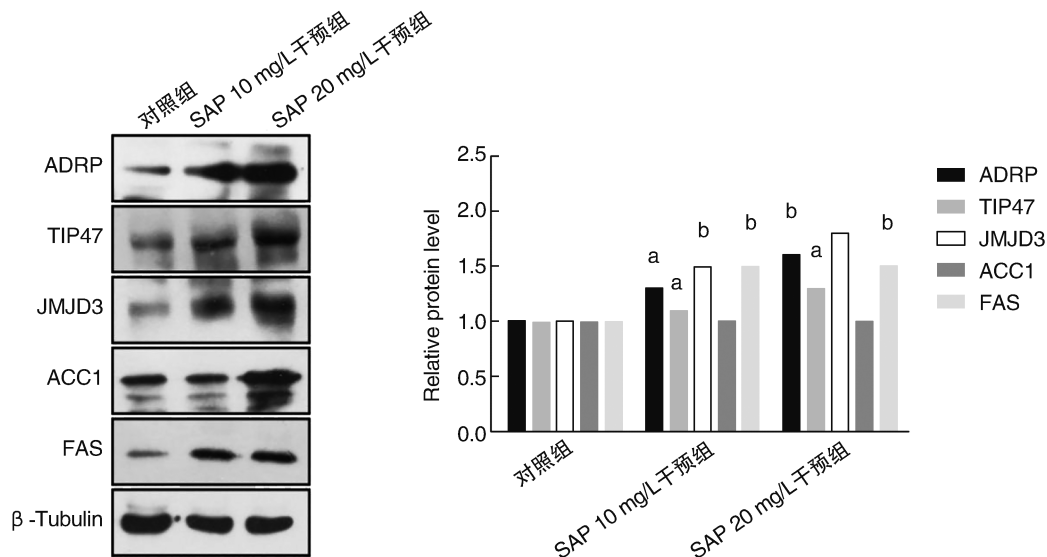


图 5. SAP 对泡沫细胞形成过程中相关脂蛋白表达的影响 ($n=5$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 5. Effects of SAP on the expression of lipoproteins in the formation of foam cells

3 讨论

动脉粥样硬化的形成机制^[8], 仍然众说纷纭, 但毋庸置疑的是多种因素参与其中。目前脂质浸润学说、内皮损伤学说以及炎症反应学说最被接受, 传播也较为广泛, 内皮损伤是动脉粥样硬化的起始环节, 炎症反应以及脂质浸润贯穿于整个过程, 从而促进了动脉粥样硬化的发生发展^[9]。血浆 LDL 升高能够诱导脂质浸润血管内皮, 将破损细胞、胆固醇沉积于此, 与此同时, 经过氧化应激反应从而形成的 ox-LDL, 具有诱导巨噬细胞吞噬脂质、清除破损泡沫细胞的功能, 大多是通过激活清道夫受体从而实现的。在进程中, 泡沫细胞以及破损细胞大量聚集, 是形成粥样斑块^[10]的关键环节。

内皮损伤是动脉粥样硬化发生发展的始动因素, 完整的血管内皮细胞在人体内发挥多重作用, 与此同时还能够自身调节血管张力^[11], 借此调控血压水平。一旦血管内皮细胞的完整性遭到破坏, 血管内膜屏障即发生破坏, 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 均可以诱导巨噬细胞在血液中的黏附水平, 更容易黏附于破损的血管内皮以及浸润, 借此吞噬大量脂质从而形成泡沫细胞, 也能促进平滑肌细胞增殖并向内膜迁移摄取 ox-LDL 形成泡沫

细胞^[12]。

Perilipin 是真核细胞脂滴的标志性分子^[13], Perilipin 家族中的第二个蛋白即为脂肪分化相关蛋白 (adipocyte differentiation related protein, ADRP)、Plin3 即 47 kDa 尾连蛋白 (tail-interacting protein of 47 kDa, TIP47) 等与脂质蓄积密切相关, JMJD3 作为组蛋白去甲基化酶, 在巨噬细胞被 LPS 刺激中表达明显上调, 据报道与炎症反应密切相关。SAP 与 CRP 同属于血清正五聚体蛋白家族成员, 主要依托于钙离子与多种受体结合, 而参与到炎症反应、免疫调节等过程中。有研究报道^[14], SAP 能与血清中 LDLC 相结合, 提示与动脉粥样硬化的发生发展有关, 并且在体内, 由肝脏细胞表达的 SAP 蛋白, 也是一种急性反应期蛋白, 轻微的炎症刺激, 即可有着显著性的变化。也有研究显示, SAP 的表达往往通过影响结构中相对临近的氨基酸残基, 借此改变功能性空间结构, 从而起到联合 LPS、调节凋亡细胞小体的能力^[15]。多种报道均显示 SAP 从多种角度影响了动脉粥样硬化的发生发展^[16], 本课题组前期通过分析临床患者 SAP 表达水平同冠心病、脑梗死发生的相关性, 结果显示, 随着冠状动脉狭窄程度的增加, SAP 水平逐渐提高, 并且随着 SAP 水平的升高, 患者脑白质变性的严重程度也随之增加, 患者出现认知功能障碍的程度也在增加。本次研究从机制上尝试解释 SAP 对动脉粥样硬化的影响, 利用油红 O 染色发现相比传统泡沫细胞的诱导, SAP 的

增加明显促进了泡沫细胞的形成,加剧了脂质的蓄积;通过 Bodipy403/503 染色发现,相比对照组,实验组泡沫细胞内的脂滴数目更多,并且大小更大,随着 SAP 浓度的增加趋势更加明显;通过试剂盒定量检测泡沫细胞内脂质含量发现,TG 的含量随着 SAP 浓度的增加,细胞内脂质含量也逐级增加,相比对照组,实验组均明显增加。同时,胆固醇的定量检测也符合这一趋势;Western blot 检测相关脂蛋白表达水平发现,SAP 能够增强 ADRP、TIP47、JMJD3、FAS 的表达水平,并且其中除了 FAS 在 SAP 不同浓度表达水平一样外,其余均随着 SAP 浓度的增加表达水平也增强。但 SAP 对 ACC1 的表达水平无明显作用。

本次研究表明,SAP 能够促进泡沫细胞的脂质蓄积,增强脂滴形成,通过增强 ADRP 等相关脂蛋白的表达,从而促进了巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,并且 SAP 的浓度增加时,脂质蓄积也明显增加。但本次研究尚有不足之处,比如 SAP 是否通过刺激 NF- κ B 的表达增强 ADRP 的表达?对相关炎症因子的表达有如何影响?体外实验虽有一定依据,应设计动物实验进一步说明其机制。

[参考文献]

- [1] 谭艳美,孟磊,汪江波.巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2016,24(2):207-212.
- [2] Kurtz J, Rael B, Lerma J, et al. Effects of reactive oxygen species on the physical properties of polypropylene surgical mesh at various concentrations: a model for inflammatory reaction as a cause for mesh embrittlement and failure[J]. Surg Endosc, 2016, 30(8): 3250-3255.
- [3] 郝阳,郭晓辰,张军平.氧化应激和自噬在动脉粥样硬化中的作用研究新进展[J].中国动脉硬化杂志,2017,25(4):404-411.
- [4] Croca S, Rahman A. Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017, 31(3): 364-372.
- [5] 喻思扬,王燕,刘洋,等.炎性体在动脉粥样硬化等心血管疾病中的作用及机制[J].中国动脉硬化杂志,2014,22(12):1281-1287.
- [6] Ratheesh M, Svenia JP, Asha S, et al. Anti-inflammatory effect of a novel formulation of coconut inflorescence sap against ox-LDL induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells by modulating TLR-NF-kappaB signaling pathway[J]. Toxicol Mech Methods, 2017, 27(8): 615-621.
- [7] Zheng L, Wu T, Zeng C, et al. SAP deficiency mitigated atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice[J]. Atherosclerosis, 2016, 244: 179-187.
- [8] Yong WC, Sanguankee A, Upala S. Association between sarcoidosis, pulse wave velocity, and other measures of subclinical atherosclerosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Rheumatol, 2017, doi: 10.1007/s10067-017-3926-9.
- [9] Aladin AI, Al Rifai M, Rasool SH, et al. Relation of coronary artery calcium and extra-coronary aortic calcium to incident hypertension (from the multi-ethnic study of atherosclerosis)[J]. Am J Cardiol, 2018, 121(2): 210-216.
- [10] Liao H, Wan S, Zhang X, et al. Intermedin ameliorates atherosclerosis by increasing cholesterol efflux through the cAMP-PKA pathway in macrophage RAW264.7 cell line[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 5462-5471.
- [11] Caffarelli C, Montagnani A, Nuti R, et al. Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: update and systematic review of clinical studies[J]. Clin Interv Aging, 2017, 12: 1819-1828.
- [12] Long L, Song Y. Myeloperoxidase: A promising therapeutic target in prevention of atherosclerosis[J]. Int J Cardiol, 2018, 256(1): 57-72.
- [13] Hayward GC, Fenech RK, Yang AJ, et al. The role of PLIN protein in healthy lipid storage and lipid droplet expansion[J]. J Physiol, 2017, 595(24): 7273-7274.
- [14] Nagatoshi A, Ueda M, Ueda A, et al. Serum amyloid P component: A novel potential player in vessel degeneration in CADASIL[J]. J Neurol Sci, 2017, 379: 69-76.
- [15] Helmfors L, Bergkvist L, Brorsson AC. Serum amyloid P component ameliorates neurological damage caused by expressing a lysozyme variant in the central nervous system of drosophila melanogaster[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e159294.
- [16] Klotz SA, Sobonya RE, Lipke PN, et al. Serum amyloid P component and systemic fungal infection: Does it protect the host or is it a trojan horse[J]. Open Forum Infect Dis, 2016, 3(3): w166.

(此文编辑 文玉珊)