

本文引用: 王 杨, 周琴怡, 王 刚, 等. 补骨脂酚通过抑制 ERK1/2 磷酸化并上调 ABCA1 表达减少巨噬细胞源性泡沫细胞形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(9): 763-770. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.09.004.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-09-0763-08

· 实验研究 ·

补骨脂酚通过抑制 ERK1/2 磷酸化并上调 ABCA1 表达减少巨噬细胞源性泡沫细胞形成

王 杨¹, 周琴怡^{1,2}, 王 刚^{3,4,5,6}, 唐朝克¹

1. 南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所 湖南省动脉硬化化学重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技合作创新基地;
2. 南华大学衡阳医学院附属南华医院心内科; 3. 心脏疾病多组学与人工智能湖南省重点实验室;
4. 南华大学衡阳医学院附属第一医院心内科; 5. 湖南省心肌损伤临床医学研究中心;
6. 南华大学衡阳医学院附属第一医院心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001

[摘 要] **[目的]** 探讨补骨脂酚(BAK)对巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响及机制。**[方法]** MTT 筛选 BAK 对泡沫细胞药物毒性浓度; 油红 O 染色、NBD 胆固醇、Dil-ox-LDL 检测泡沫细胞内脂质蓄积情况; 使用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 mRNA 和蛋白表达。**[结果]** BAK 可以促进胆固醇流出并减少泡沫细胞内脂质蓄积。BAK 可以上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)的 mRNA 和蛋白表达水平, 同时可下调细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)磷酸化水平。使用 ERK1/2 激动剂 Ro 67-7476 处理发现, 与 BAK 处理组相比, 加入 Ro 67-7476 处理后 ABCA1 蛋白表达下降。**[结论]** BAK 通过抑制 ERK1/2 的磷酸化, 上调 ABCA1 的表达并促进胆固醇的流出, 减少泡沫细胞中的脂质蓄积, 从而抑制泡沫细胞的形成。

[关键词] 补骨脂酚; 泡沫细胞; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 细胞外信号调节激酶 1/2

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Bakuchiol inhibits macrophage-derived foam cell formation by reducing ERK1/2 phosphorylation and upregulating ABCA1 expression

WANG Yang¹, ZHOU Qinyi^{1,2}, WANG Gang^{3,4,5,6}, TANG Chaoke¹

1. Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Hengyang Medical School, University of South China;
2. Department of Cardiology, the Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China; 3. Key Laboratory of Cardiovascular Diseases Multi-Omics and Artificial Intelligence, Hunan Province; 4. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China; 5. Clinical Medical Research Center for Myocardial Injury, Hunan Province; 6. Institute of Cardiovascular Diseases, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the impact of bakuchiol (BAK) on lipid accumulation in macrophage-derived foam cell and explore the underlying mechanisms. **Methods** MTT assay was used to determine the non-toxic concentration of BAK on foam cell. Oil red O staining, NBD cholesterol, and Dil-ox-LDL were used to assess lipid accumulation in foam cell. RT-qPCR and Western blot were utilized to measure mRNA and protein expression, respectively. **Results** BAK promoted cholesterol efflux and reduced lipid accumulation in foam cell. BAK upregulated the mRNA and protein expression levels of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and concurrently downregulated the phosphoryl-

[收稿日期] 2024-01-26

[修回日期] 2024-03-24

[基金项目] 湖南省教育厅重点项目(21A0275); 湖南省卫生健康委一般项目(202103011860); 创新平台与人才计划(2023TP1047); 湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30547 和 2022JJ30540); 湖南省卫生健康委重大专项(W20241008); 南华大学附属第一医院 4310 计划(20214310NHYCG03)

[作者简介] 王杨, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: wangyangtmu@163.com。通信作者王刚, 主任医师, 研究方向为冠心病及动脉粥样硬化, E-mail: 783224908@qq.com。通信作者唐朝克, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: tangchaoke@qq.com。

ation levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Treatment with the ERK1/2 activator Ro 67-7476 resulted in decreased ABCA1 protein expression compared with the BAK-treated group. **Conclusion** BAK reduced lipid accumulation in foam cell by inhibiting ERK1/2 phosphorylation, upregulating ABCA1 expression, and promoting cholesterol efflux, thereby suppressing foam cell formation.

[**KEY WORDS**] bakuchiol; foam cell; ATP-binding cassette transporter A1; extracellular signal-regulated kinase 1/2

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是诱发一系列心血管疾病的基础性病变。预防As的发生发展对于心血管疾病的防治具有重要意义。肥胖、吸烟、持续性炎症、衰老、节律紊乱等是诱发As的危险因素^[1-2]。脂质代谢功能紊乱也会诱导As的发生,其主要特征为大量脂质蓄积在大、中动脉内膜处并形成斑块^[3]。斑块形成的主要机制是血管内皮受损并释放趋化因子,循环中的单核细胞被募集到损伤处,迁移至损伤血管内膜下并转化为巨噬细胞^[4-5]。巨噬细胞吞噬被氧化的脂质成分形成泡沫细胞,此过程持续发生导致血管内斑块形成^[6]。巨噬细胞源性泡沫细胞的形成与胆固醇摄取和流出不平衡密切相关。因而控制胆固醇的摄取与流出对抑制As斑块的形成具有重要意义。清道夫受体家族蛋白大量表达在巨噬细胞中,是细胞识别和摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)的主要蛋白^[7-8]。ATP结合盒转运体A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)和ATP结合盒转运体G1(ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1)是向细胞外转运胆固醇的两个关键蛋白^[9]。ABCA1主要位于细胞膜上,它负责将胆固醇转运至载脂蛋白A I (apolipoprotein AI, ApoAI)并与之结合,形成新生高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)的颗粒。这些新生HDL颗粒在循环系统中运输,可以继续接收经ABCG1转运出的胆固醇,再经多种酶的加工形成成熟HDL,并将胆固醇从外周组织运送至肝脏。当ABCA1和ABCG1表达降低时,胆固醇滞留在细胞内,加速泡沫细胞的形成^[10]。表明ABCA1与ABCG1在防治As的过程中发挥重要作用。有丝分裂原活化蛋白激酶家族是一类细胞内信号传导的重要蛋白。激活的有丝分裂原活化蛋白激酶引起下游转录因子的磷酸化,从而调控各种响应,包括应激信号、病原体响应和激素信号等。细胞外信号调节激酶(extracellular regulated kinase, ERK)属于有丝分裂原活化蛋白激酶家族,是ERK1/2的统称。ERK1/2过度激活,进入细胞核并抑制ABCA1表达^[11-12]。因此,寻找可调控ABCA1的靶点,对防治斑块形成具有重要

意义。

目前,他汀类药物是临床应用广泛的治疗As的药物,但此类药物具有肌溶解和肝功能损伤等不良反应,存在患者主动停药的现象^[13-14]。因此,寻找一类新的治疗As的药物可对临床提供巨大帮助。补骨脂是一种中草药,又称为桑寄生,具有补益肾气的作用。补骨脂酚(bakuchiol, BAK)是补骨脂中的主要成分之一,它是一种植物类雌激素,属单萜酚类化合物,结构与白藜芦醇类似。白藜芦醇具有调控糖脂代谢和降低心血管疾病风险的作用。目前已有研究表明BAK具有抗衰老、抗氧化、抑炎等作用^[15-16]。这些特性表明BAK可能对As具有防治作用。因此,本研究探讨BAK对巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的调控作用,为As治疗研究提供新途径。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备

多功能微孔板读板机(Molecular devices), 细胞计数仪(Countstar), 正置倒置一体荧光显微镜(Thermo Fisher Scientific), Nano Drop超微量紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific), 热循环仪(Applied Biosystems), 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪(Applied Biosystems), 全自动化学发光成像系统(上海天能生命科学有限公司)。

1.2 药品与试剂

补骨脂酚(四川成都植标化纯生物技术有限公司), MTT试剂盒、油红O染色试剂盒(上海碧云天公司), 总胆固醇检测试剂盒、游离胆固醇检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), Dil-ox-LDL、ox-LDL(广州奕源生物科技有限公司), NBD胆固醇(Thermo Scientific), ApoA I (Sigma), RNA提取液、SYBR Green One-Step RT-qPCR试剂盒(上海碧云天公司), ABCA1抗体(CST), ERK1/2抗体、p-ERK1/2抗体(杭州华安生物技术有限公司), Ro 67-7476(MCE)。PCR引物由生工生物工程(上海)

股份有限公司合成。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞用 10% 胎牛血清和 RPMI1640 培养基(含 1% 青霉素-链霉素抗体)培养于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中。

1.4 泡沫细胞模型构建

取对数生长期 THP-1 细胞,用最终含 100 μg/L 的佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)处理 24 h,诱导其分化为巨噬细胞后用不含胎牛血清的培养基培养细胞 6~12 h,配制含 75 mg/L 的 ox-LDL 低血清培养基处理细胞 48 h 诱导转变为泡沫细胞。随后用含不同浓度 BAK 的培养基处理细胞 24 h。

1.5 MTT 法检测细胞活性

按照 1.4 将 THP-1 细胞接种于 96 孔板中,用含不同浓度 BAK 的培养基孵育细胞,设置复孔。孵育 20 h 后,用最终含 5 g/L 的 MTT 培养基溶液 20 μL 孵育细胞 4 h,弃上清,加入 200 μL 二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)溶解结晶,用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度。按说明书计算细胞存活率。

1.6 油红 O 染色

按照 1.4 将 THP-1 细胞接种于 6 孔板中,构建泡沫细胞模型并分别用浓度为 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的 BAK 孵育 24 h。去除培养液后用 PBS 清洗 3 次。用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min 后磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗,用 60% 异丙醇室温孵育 3 min 后,加入油红 O 工作液在 37 °C 中避光染色 20 min,再用 60% 异丙醇脱色 1 min,后用 PBS 漂洗 1 次,用苏木精染核 30 s,最后用 PBS 漂洗 5 次并用甘油覆盖。倒置显微镜观察脂滴并拍照。

1.7 细胞胆固醇含量检测

按照 1.4 将 THP-1 细胞接种于 6 孔板中,构建泡沫细胞模型并分别用浓度为 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的 BAK 孵育 24 h。去除培养液后用 PBS 清洗 3 次。加入 200 μL 的异丙醇提取细胞内胆固醇,并按试剂盒说明书配制工作液。按说明书操作并检测细胞内总胆固醇(total cholesterol, TC)及游离胆固醇(free cholesterol, FC)含量,并计算胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)含量。CE 含量(%)=(TC-FC)/TC×100%

1.8 胆固醇摄取实验

按照 1.4 将 THP-1 细胞诱导为巨噬细胞,用不含

胎牛血清的培养基培养 6~12 h,加入含不同浓度药物培养基[分为对照组、低浓度 BAK 组(BAK-L 组)、高浓度 BAK 组(BAK-H 组)三组]孵育 24 h,更换 Dil-ox-LDL(20 mg/L)的低血清培养基孵育 4 h,弃去上清用 PBS 漂洗 3 次,用胰蛋白酶消化并用完全培养基终止消化,离心并用 PBS 重悬混匀 3 次(5 min/次)。用多功能微孔板读板机检测荧光强度,其吸收光谱波峰为 549 nm,发射光谱波峰为 565 nm,用细胞计数仪计数。最后用荧光显微镜观察拍照。

1.9 胆固醇流出实验

按照 1.4 将 THP-1 细胞诱导为巨噬细胞,用不含胎牛血清的培养基培养 6~12 h,用含 NBD-胆固醇(5 mg/L)的低血清培养基孵育 24 h,弃培养基用 PBS 清洗 3 次,加入不同浓度药物培养基[分为对照组、低浓度 BAK 组(BAK-L 组)、高浓度 BAK 组(BAK-H 组)]孵育 18 h,取上清培养基并配制含 ApoA I (20 mg/L)的培养基,加入对应培养板孔孵育 6 h。用多功能读板仪测上清液荧光值其吸收光谱波峰为 483 nm,发射光谱波峰为 523 nm,细胞用 PBS 清洗 3 次,用裂解液裂解细胞 10 min,随后检测细胞内荧光值。胆固醇流出率(%)=培养基胆固醇量/(培养基胆固醇量+细胞内胆固醇量)×100%。

1.10 实时定量 PCR

构建泡沫细胞模型并分别用浓度为 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的 BAK 孵育 24 h。RNA 提取液提取细胞总 RNA, NanoDrop 仪器检查提取的 RNA 纯度和浓度,用一步法反转录定量试剂盒检测 RNA 水平。GAPDH 引物序列为 F: 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3', R: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'; ABCA1 引物序列为 F: 5'-GCTCAGTGGGATGGATGCAAAG-3', R: 5'-CTCCGTCTGGCAATTAGCACTCTC-3'。

1.11 Western blot 检测蛋白表达水平

构建泡沫细胞模型并分别用浓度为 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的 BAK 孵育 24 h。用 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂配制蛋白质提取液,加入培养皿并用细胞刮刀刮取,用 BCA 试剂盒进行蛋白定量并调平。通过 SDS-PAGE 对蛋白进行分离(80 V, 30 min; 120 V, 60 min)。转移至 PVDF 膜(0.45 μm)上,用快速封闭液室温封闭 15 min,再使用 ABCA1 抗体(1:1 000)、p-ERK1/2 抗体(1:5 000),4 °C 摇床孵育过夜,用对应种属二抗(1:1 000)室温孵育 2 h 后全自动化学发光图像分析系统显影并对蛋白条带进行灰度值统计。待显影结束用 Tris 盐

酸缓冲液+Tween 20 (Tris Buffered Saline with Tween 20, TBST) 清洗 10 min, 将待重生的膜放入抗体洗脱液中, 洗脱 10 min 后用 TBST 清洗并在全自动化学发光图像分析系统显影观察洗脱情况, 洗脱完成重新封闭后进行 ERK1/2 抗体 (1:5 000) 孵育及后续操作。 β -actin 抗体 (1:10 000) 孵育同 ERK1/2 孵育步骤。

1.12 分子对接

使用 OpenBabel2.4.1 将 BAK 的结构转化为 mol2 格式, AutodockTools1.5.6 对其加氢和电荷、检测配体的 root、进行可旋转键的搜索与定义, 并保存为 pdbqt 文件。从 RCSB Protein Data Bank 下载 ERK2 蛋白的 3D 结构。通过 AutodockTools1.5.6 加氢、计算 GAsteiger 电荷、合并非极性氢后, 将其定义为受体并保存成 pdbqt 文件。确定 Vina 分子对接的坐标和盒子大小, 设置 exhaustiveness 的参数为 25 (为了计算准确), 其他参数采用默认值。Autodock vina 1.1.2 进行半柔性对接, 其最终的对接构象为 affinity 最佳的构象; 选取对接结合能量最低的构象用于对接结合模式分析, 并使用 Pymol 对结果进行可视化。

1.13 免疫荧光

按照步骤 1.4 将 THP-1 细胞接种于 6 孔板中, 构建泡沫细胞模型并分别用浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BAK 孵育 24 h。去除培养液后用 PBS 清洗 3 次。用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min 后 PBS 清洗, 加入 0.2% TritonX-100, 室温通透 10 min, 用 PBS 清洗 2 次, 每次 5 min。用 10% 山羊血清室温封闭 1 h。使用一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。用 PBS 清洗 3 次, 每次 10 min。使用相应二抗, 避光室温孵育 1 h 后, 用 PBS 清洗。DAPI 染核, 避光孵育 5 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。最后用荧光显微镜观察拍照。

1.14 统计学方法

应用 Image J 软件和 GraphPad Prism 9.0 版软件对结果进行分析统计和绘图。实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 并选择多组间相互比较对不同组间进行差异分析, $P < 0.05$ 即差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 补骨脂酚对巨噬细胞源性泡沫细胞活性的影响

为检测 BAK 的细胞毒性, 使用 MTT 法检测不

同浓度 BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞活力的影响。结果显示, 60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞的存活率影响出现差异 (图 1), 表明 BAK 浓度高于 60 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞有明显毒性。后续细胞实验均选择 BAK 20 $\mu\text{mol/L}$ (低浓度 BAK, BAK-L) 和 40 $\mu\text{mol/L}$ (高浓度 BAK, BAK-H) 为处理浓度。

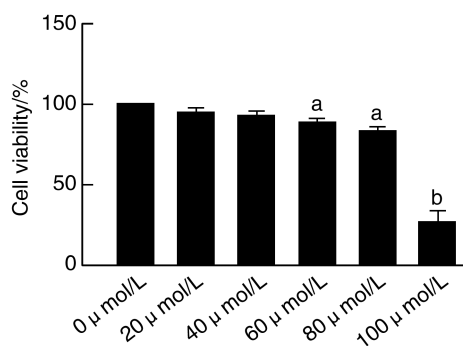


图 1. BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞存活率的影响 ($n=3$)
a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组) 相比。

Figure 1. Effect of BAK on the survival rate of macrophage-derived foam cells ($n=3$)

2.2 补骨脂酚对巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响

应用油红 O 染色和酶氧化法检测巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积情况。结果显示, 与 ox-LDL 组相比, 加入 BAK-L 处理细胞内脂质蓄积无明显变化, 而加入 BAK-H 处理细胞内脂质蓄积显著减少 (图 2)。检测细胞内胆固醇水平的变化, 发现与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+BAK-H 组细胞内 TC 含量降低 20%, 而 FC 水平无明显差异, 通过计算得到细胞内 CE 水平, 发现 ox-LDL+BAK-H 组细胞内 CE 占比降低 11.74% (表 1)。高浓度 BAK 能显著抑制巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积。

表 1. BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇含量的影响 ($n=3$)

Table 1. Effect of BAK on cholesterol content in macrophage-derived foam cells ($n=3$)

分组	TC/($\mu\text{mol}/10^4$ cells)	FC/($\mu\text{mol}/10^4$ cells)	CE/TC%
对照组	4.65 \pm 0.45	2.52 \pm 0.05	45.62 \pm 4.10
ox-LDL 组	6.10 \pm 0.38 ^a	2.42 \pm 0.26	60.11 \pm 5.83 ^a
ox-LDL+BAK-L 组	5.46 \pm 0.39	2.28 \pm 0.14	58.22 \pm 1.31
ox-LDL+BAK-H 组	4.87 \pm 0.23 ^b	2.51 \pm 0.13	48.37 \pm 3.98 ^b

注: a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组相比。

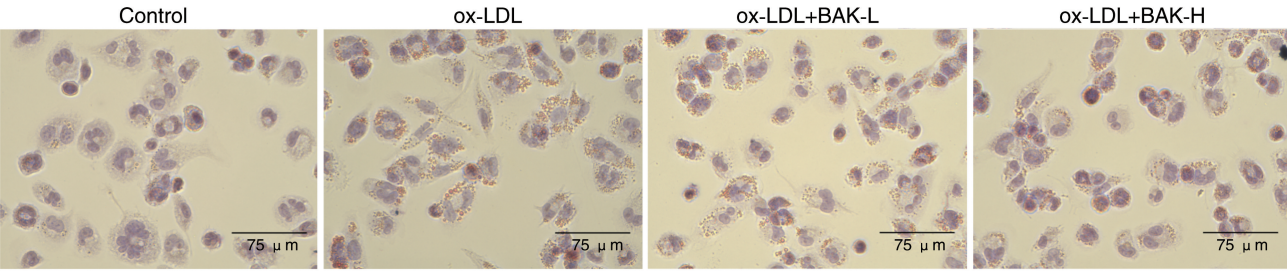


图 2. BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞脂质蓄积的影响(油红 O 染色)

Figure 2. Effect of BAK on lipid accumulation in macrophage-derived foam cells(Oil red O staining)

2.3 补骨脂酚对巨噬细胞胆固醇摄取和流出的影响

使用 Dil-ox-LDL 和 NBD-胆固醇孵育巨噬细胞,检测巨噬细胞摄取胆固醇和介导胆固醇流出的能力。结果显示,与对照组相比,BAK-L 组和 BAK-H 组细胞内荧光信号强度与细胞数值比值无明显差异(图 3)。BAK-H 组细胞内胆固醇流出比例增加。

与对照组和 BAK-L 组相比,BAK-H 组由于细胞内向细胞外转运的胆固醇增加,细胞内所剩余的 NBD 标记胆固醇细胞减少,与细胞胆固醇流出量成反比(图 4A),细胞外荧光信号,与细胞胆固醇流出成正比(图 4B),经过计算可知 BAK 孵育巨噬细胞后,细胞内胆固醇流出量升高 10.25%。推测 BAK 通过促进胆固醇流出,减少泡沫细胞内脂质蓄积。

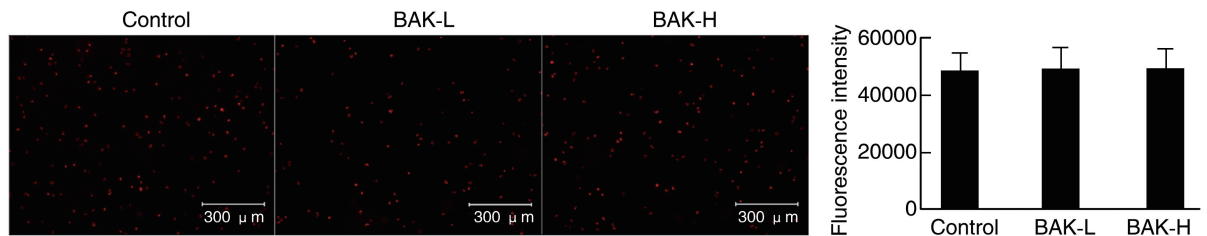


图 3. BAK 对巨噬细胞胆固醇摄取的影响($n=3$)

Figure 3. Effect of BAK on cholesterol uptake in macrophage cells($n=3$)

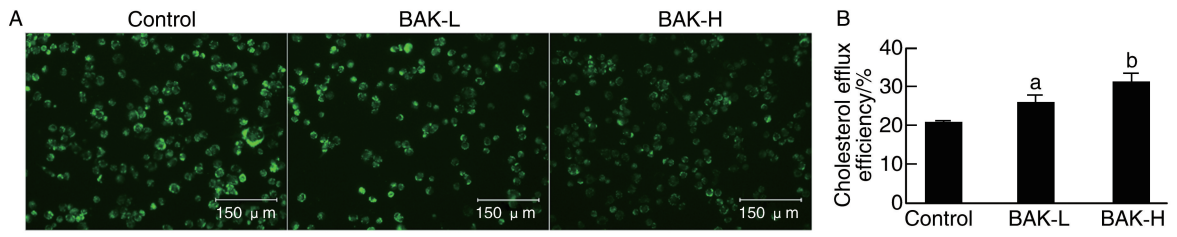


图 4. BAK 对巨噬细胞胆固醇流出的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组相比。

Figure 4. Effect of BAK on cholesterol efflux in macrophage cells($n=3$)

2.4 补骨脂酚对 ABCA1 表达的影响

ABCA1 是介导巨噬细胞内胆固醇转运的关键蛋白,ABCA1 表达升高可以促进细胞内的胆固醇流出。为验证 BAK 通过上调 ABCA1 表达促进胆固醇流出,使用 RT-qPCR 及 Western blot 检测 ABCA1 表达情况。结果显示,与 ox-LDL 组相比,ox-LDL + BAK-L 组 ABCA1 mRNA 和蛋白水平无显著差异,而 ox-LDL+BAK-H 组 ABCA1 mRNA 水平升高 87%,蛋白水平升高 91%(图 5)。表明 BAK 可通过上调

ABCA1 表达促进细胞内胆固醇流出,从而减少泡沫细胞内脂质蓄积。

2.5 补骨脂酚对 ERK1/2 磷酸化水平的影响

ERK1/2 是细胞外调节蛋白激酶,ERK1/2 过度激活可进入细胞核抑制 ABCA1 表达^[11-12]。分子对接发现 ERK2 具有与 BAK 结合的位点(图 6A),可能影响 ERK1/2 激活。通过 Western blot 和免疫荧光染色检测细胞内 ERK1/2 磷酸化水平。结果显示,与对照组相比,ox-LDL 组 ERK1/2 磷酸化水平

升高了 55% ;与 ox-LDL 组相比,ox-LDL+BAK-H 组 ERK1/2 磷酸化水平降低了 63% (图 6B 和 6C)。应用 ERK1/2 激动剂 Ro 67-7476 促进 ERK1/2 磷酸化

可抵消 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BAK 上调 ABCA1 的作用(图 7)。所以 BAK 可能通过抑制 ERK1/2 磷酸化水平促进 ABCA1 表达,从而促进细胞内胆固醇流出。

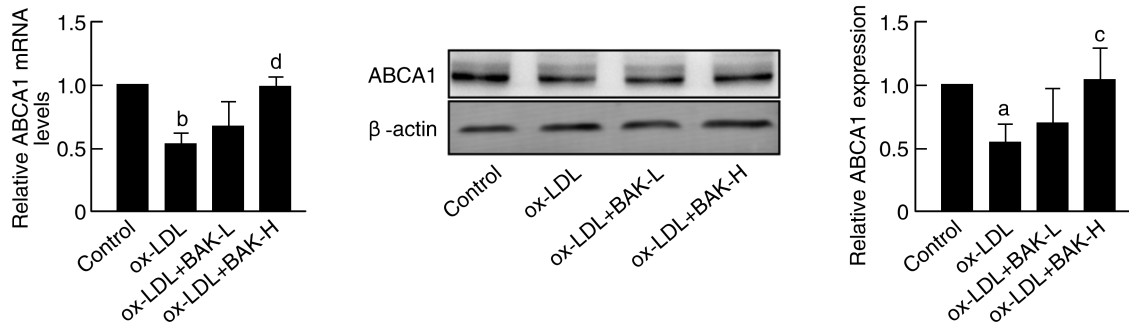


图 5. BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响($n=4$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组相比; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组相比。

Figure 5. Effect of BAK on the expression of ABCA1 in macrophage-derived foam cells($n=4$)

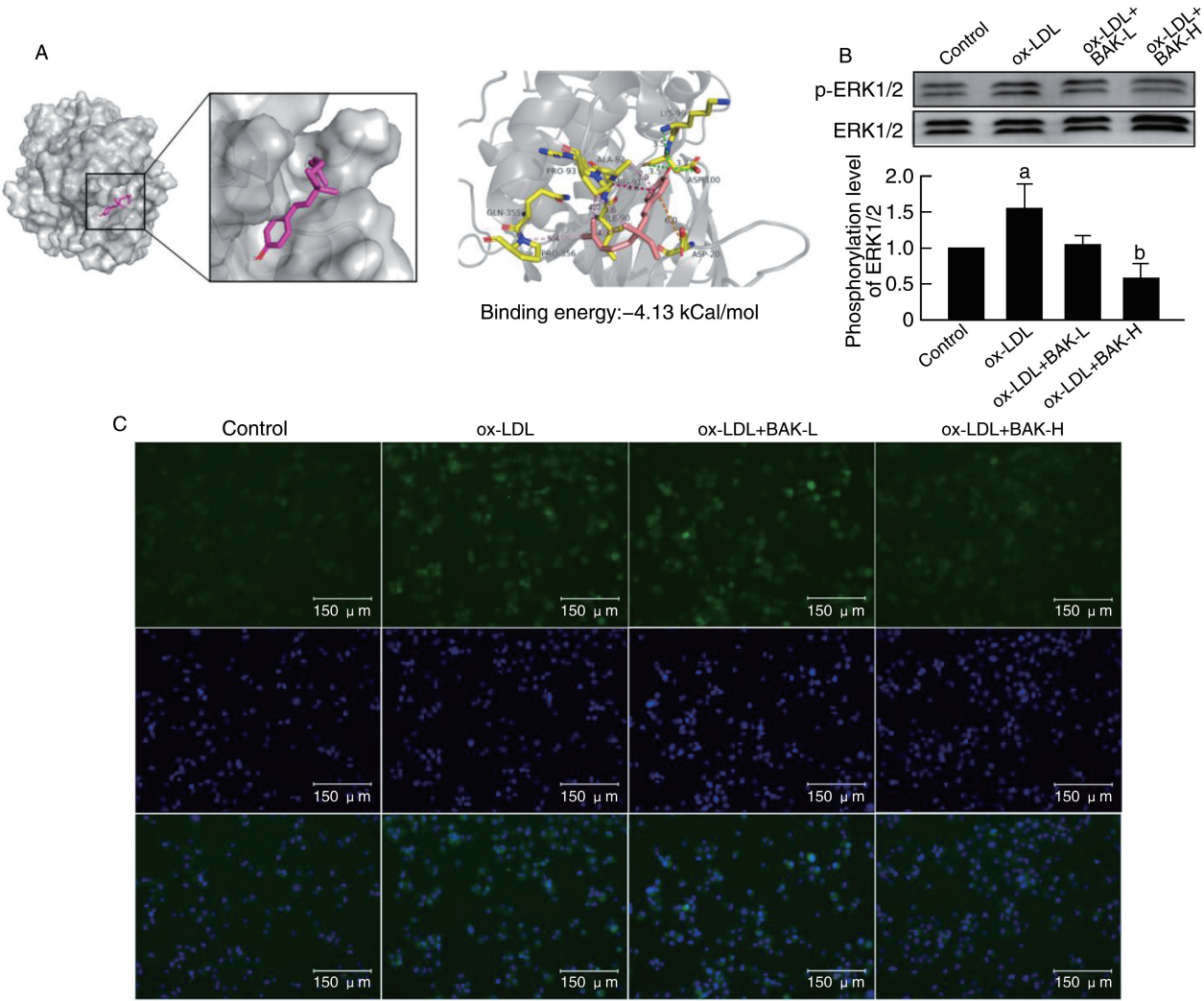


图 6. BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞 ERK1/2 磷酸化水平的影响

A 为分子对接结果;显示 BAK 与 ERK2 具有结合的可能,结合能为-4.13 kCal/mol。B 为 Western blot 检测 BAK 对细胞内 ERK1/2 磷酸化水平的影响;a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.01$,与 ox-LDL 组相比($n=3$)。

C 为免疫荧光检测 BAK 对细胞内 ERK1/2 磷酸化强度的影响。

Figure 6. Effect of BAK on the phosphorylation level of ERK1/2 in macrophage-derived foam cells

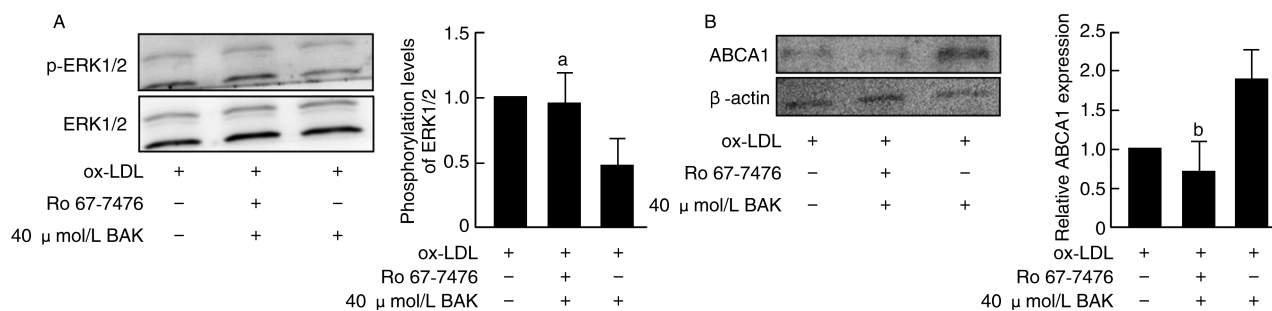


图 7. Ro 67-7476 促进 ERK1/2 磷酸化后 BAK 对巨噬细胞源性泡沫细胞 ERK1/2 磷酸化水平 (A) 和 ABCA1 表达 (B) 的影响 ($n=4$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL+40 μ mol/L BAK 组相比。

Figure 7. Effects of BAK on the phosphorylation level of ERK1/2 (A) and ABCA1 expression (B) in macrophage-derived foam cells after ERK1/2 phosphorylation promoted by Ro 67-7476 ($n=4$)

3 讨论

心血管疾病已成为导致人类死亡的主要原因,而 As 是多种心血管疾病的主要诱因之一^[17]。泡沫细胞形成是 As 的特征之一,防止泡沫细胞形成是降低 As 发生风险的关键手段^[18-19]。ABCA1 作为介导巨噬细胞胆固醇流出的主要蛋白,其表达上调可以促进胆固醇的流出,具有抑制泡沫细胞形成的作用,降低 As 发生的风险^[20]。

BAK 作为一种植物类雌激素,在多项研究中表现出抗菌、抗炎、抗氧化等作用,同时具有雌激素样效果^[21-22]。BAK 可能通过抗炎症和抗脂质过氧化等过程防止 As 的发生,还可能发挥雌激素样作用对 As 具有保护效果,这表明 BAK 有望成为治疗 As 的有效药物^[23-25]。本研究探讨 BAK 是否通过调控胆固醇流出影响巨噬细胞源性泡沫细胞的形成。研究发现,BAK 显著降低巨噬细胞源性泡沫细胞的脂质蓄积,表明 BAK 具有抑制泡沫细胞形成的作用。胆固醇摄取和流出实验结果显示,BAK 不影响胆固醇的摄取,但可以促进胆固醇的流出。ABCA1 是介导胆固醇流出的主要蛋白,检测 ABCA1 mRNA 和蛋白水平,结果表明 ABCA1 mRNA 和蛋白水平表达增加,证明 BAK 通过上调 ABCA1 表达防止泡沫细胞的形成。ERK1/2 是一种可调控 ABCA1 表达的磷酸激酶,当其受多种刺激激活时,可抑制 ABCA1 的表达。研究结果显示,ox-LDL 处理细胞后,细胞内 ERK1/2 磷酸化水平上升,同时用 BAK 处理可降低 ERK1/2 磷酸化水平。为验证 BAK 抑制 ERK1/2 磷酸化上调 ABCA1 表达,促进胆固醇流出,我们使用 ERK1/2 激动剂与 BAK 共同孵育细胞,发现激活 ERK1/2 可以抵消 BAK 上调 ABCA1 表达的作用。

因此,BAK 通过抑制 ERK1/2 磷酸化并上调 ABCA1 表达,减少细胞内脂质蓄积,从而防止泡沫细胞的形成。

尽管本研究结果证明了 BAK 具有抑制泡沫细胞形成的作用,但其对小鼠体内 As 形成的防治效果仍需进一步实验验证。同时,对于 BAK 调控 ERK1/2 磷酸化的作用机制还需要进一步验证。本研究明确了 BAK 对胆固醇流出的作用效果及机制,表明其可能成为治疗 As 的有效候选药物,为临床上 As 的防治提供帮助。综上所述,本研究证明了 BAK 通过上调 ABCA1 调控胆固醇从泡沫细胞流出,为 As 的防治提供新途径。

[参考文献]

- [1] 秦练,马翔,王忠,等. 细胞代谢因子 Betatrophin 脂质调控研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(12): 1085-1088.
QIN L, MA X, WANG Z, et al. Research progress of Betatrophin lipid regulation[J]. Chin J Arterioscler, 2021, 29(12): 1085-1088.
- [2] 张瑜,涂均楚,李玉洁,等. 动脉粥样硬化危险因素衰老、肥胖、生物钟紊乱与核糖体新生的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(11): 921-928.
ZHANG Y, TU J C, LI Y J, et al. Research progress of atherosclerosis risk factors like aging, obesity, circadian clock disorders and ribosome biogenesis[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(11): 921-928.
- [3] BADIMON L, VILAHUR G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture[J]. J Intern Med, 2014, 276(6): 618-632.
- [4] LIU Y C, ZOU X B, CHAI Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520-529.

- [5] TEDGUI A, MALLAT Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 515-581.
- [6] MAGUIRE E M, PEARCE S W A, XIAO Q. Foam cell formation: a new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease[J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 54-71.
- [7] CHISTIAKOV D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(11): 1153-1165.
- [8] GUO X, LI B, WEN C, et al. TREM2 promotes cholesterol uptake and foam cell formation in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(5): 137.
- [9] YU X H, TANG C K. ABCA1, ABCG1, and cholesterol homeostasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1377: 95-107.
- [10] YU X H, FU Y C, ZHANG D W, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424: 245-252.
- [11] ZHOU X, YIN Z, GUO X, et al. Inhibition of ERK1/2 and activation of liver X receptor synergistically induce macrophage ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6316-6326.
- [12] CHEN Y, DUAN Y, YANG X, et al. Inhibition of ERK1/2 and activation of LXR synergistically reduce atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(4): 948-959.
- [13] TOMASZEWSKI M, STEPIEŃ K M, TOMASZEWSKA J, et al. Statin-induced myopathies[J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(4): 859-866.
- [14] LEE S H, LEE Y J, HEO J H, et al. Combination moderate-intensity statin and ezetimibe therapy for elderly patients with atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 81(14): 1339-1349.
- [15] NIZAM N N, MAHMUD S, ARK S M A, et al. Bakuchiol, a natural constituent and its pharmacological benefits[J]. *F1000 Res*, 2023, 12: 29.
- [16] XIN Z, WU X, JI T, et al. Bakuchiol: a newly discovered warrior against organ damage[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 208-213.
- [17] MARKINA Y V, KIRICHENKO T V, TOLSTIK T V, et al. Target and cell therapy for atherosclerosis and CVD[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10308.
- [18] YU X H, ZHANG J, ZHENG X L, et al. Interferon- γ in foam cell formation and progression of atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441: 33-43.
- [19] 彭雪英, 武怀珠, 王敏杰, 等. 高脂血症、单核细胞亚型与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(9): 815-822.
- PENG X Y, WU H Z, WANG M J, et al. Hyperlipidemia, monocyte subtypes and atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(9): 815-822.
- [20] GUI Y Z, YAN H, GAO F, et al. Betulin attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by up-regulating ABCA1 and ABCG1[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(10): 1337-1348.
- [21] MAO H, WANG H, MA S, et al. Bidirectional regulation of bakuchiol, an estrogenic-like compound, on catecholamine secretion[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(1): 180-189.
- [22] LIM H S, KIM Y J, KIM B Y, et al. Bakuchiol suppresses inflammatory responses via the downregulation of the p38 MAPK/ERK signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3574.
- [23] LV Y, ZHANG S, WENG X, et al. Estrogen deficiency accelerates postmenopausal atherosclerosis by inducing endothelial cell ferroptosis through inhibiting NRF2/GPX4 pathway[J]. *FASEB J*, 2023, 37(6): e22992.
- [24] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 80.
- [25] BAI T, LI M, LIU Y, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 92-102.
- (此文编辑 许雪梅)