

脂多糖对小鼠巨噬细胞 ABCA1 表达和胆固醇流出的影响

曾志青¹, 李金凤², 谢 笛², 汤石林³

(1. 南华大学附属第一医院神经外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院;
3. 南华大学附属第一医院重症医学科)

摘要: **目的** 观察脂多糖(LPS)对小鼠腹腔巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)表达和胆固醇流出的影响,探讨肝 X 受体 α (LXR α)信号途径的作用。 **方法** 60 只 C57 小鼠分成两组,分别注射 LPS(1.0 mg/kg)和等量生理盐水。12 h 后取腹腔巨噬细胞,实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 印迹法检测 ABCA1 和 LXR α mRNA 和蛋白质表达水平,液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。LXR α 激动剂 22(R)-羟基胆固醇(22(R)-Hch)预处理小鼠,观察对 LPS 调节 ABCA1 表达和胆固醇流出的影响。 **结果** LPS 抑制 LXR α 和 ABCA1 的 mRNA 和蛋白质表达;22(R)-Hch 预处理抑制 LPS 对 ABCA1 表达和胆固醇流出的下调作用。 **结论** 通过抑制 TLR4/LXR α 信号途径的激活,可以减轻 LPS 诱导的急性时相反应中的炎症程度,上调 ABCA1 的表达,促进细胞内胆固醇的流出。

关键词: 脂多糖; 肝 X 受体 α ; 炎症; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

中图分类号: R453.9 **文献标识码:** A

The Effect of Lipopolysaccharide-Induced Acute Phase Reaction on Expression of ABCA1 in Macrophages of Mice

ZENG Zhiqing, LI Jinfeng, XIE Di, et al

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of lipopolysaccharide(LPS) on the expression of the ABCA1 and cholesterol efflux in macrophages of mice, the role of LXR α in this process was also observed. **Methods** 60 C57 mice were divided into two groups. The experimental group were treated with LPS (1.0 mg/kg). The control group were treated with PBS (1.0 mg/kg). After 12 h, the mRNA and protein expression of ABCA1 and LXR α in peritoneal macrophages of mice were examined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western-blot. The cholesterol efflux of macrophages was determined by liquid scintillator. The cells were treated with LXR α agonist 22(R)-Hch, and the role of LXR α in the regulated effect of LPS on the expression of ABCA1 were observed. **Results** LPS decreased the expression of LXR α and ABCA1 in peritoneal macrophages of mice. And the cholesterol efflux of macrophages was also inhibited by LPS. After treated with 22(R)-Hch, the inhibited effect of LPS on expression of ABCA1 and cholesterol efflux were obviously abolished in mice macrophages. LPS-induced acute phase reaction down-regulated the expression of ABCA1 and decreased cellular cholesterol efflux in macrophages of mice, which may be related to the LXR α -dependent pathway. **Conclusion** Inhibiting the activation of signaling pathways TLR4/LXR α , which can reduce inflammation during LPS-induced APR response and increase expression of ABCA1 to promote the outflow of intracellular cholesterol.

Key words: lipopolysaccharide; liver X receptor α ; acute phase reaction; ATP-binding cassette transporter A1

收稿日期:2013-06-13

基金项目:衡阳市科技计划项目(2010kj17, 2010kj41), 国家级大学生创新创业训练计划(201210555018), 湖南省研究生科研创新项目(2012SCX13)。

作者简介:曾志青, 本科, 主治医师, 研究方向:心血管疾病发病机制及其防治, E-mail: lijinfenglibing@163.com. 通讯作者汤石林, 硕士, 主治医师, 研究方向:心血管疾病发病机制及其防治, E-mail: kaiyinby@hotmail.com.

革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分脂多糖(LPS)可以作用于炎症和免疫细胞,如单核/巨噬细胞、内皮细胞等,诱导体内急性时相反应(acute phase reaction, APR)^[1]。研究发现,持续给予LPS刺激能够促进细胞内胆固醇蓄积和泡沫细胞形成,从而加速动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等慢性炎症疾病的发生发展^[2]。然而,LPS诱导的APR对胆固醇流出的影响尚不明确,而APR与脓毒症等疾病的发生发展密切相关^[3,4]。ATP结合盒转运体A1(ABCA1)是一种膜整合蛋白,促进细胞内脂质流出,与高密度脂蛋白(HDL)的形成和胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)密切相关^[5]。ABCA1的表达和功能受到多种因素的调控,例如,炎症因子干扰素 γ (IFN- γ)可通过下调肝X受体 α (liver X receptor α , LXR α),抑制ABCA1的表达和细胞内胆固醇流出^[6]。研究发现,APR能调节体内RCT,从而参与机体对免疫炎症反应的调节作用^[7]。本文拟建立LPS诱导的APR小鼠模型,观察LPS对小鼠腹腔巨噬细胞ABCA1表达和胆固醇流出的影响,并探讨LXR α 信号途径在此过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠购自南华大学实验动物中心;1640培养基购自美国Gibco公司;LPS购自美国Sigma公司;22(R)-Hch购自美国Sigma公司;Reverse Transcription System(ReverAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, #k1622)购自美国Promega公司;ABCA1、LXR α 兔抗鼠一抗购自Novus公司; β -actin兔抗鼠一抗购自武汉博士德公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司;Western blot荧光检测试剂盒购自武汉博士德公司;ELISA试剂盒购自武汉博士德公司;硝酸纤维素膜(NC)、PVDF购自Minipore公司;小牛血清购自杭州四季青公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 动物及分组

从南华大学实验动物中心购买60只C57小鼠,分成两组,实验组45只,其中的15只经静脉注射LPS(1.0 mg/kg),另外15只采用LXR α 特异性激动剂22(R)-Hch(50 mg/kg)腹腔注射预处理(给药剂量按有效剂量换算)24 h,剩余的15只采用22(R)-Hch 24 h后再用LPS处理,对照组15只静脉注射等

量的生理盐水。静脉注射12 h采血超离心后用ELISA法检测血清淀粉样蛋白(SAA)、C反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)的水平,验证LPS制备小鼠APR模型成功。

1.3 酶联免疫吸附法(ELISA)

按说明书方法,将100 μ L样品和标准品加入板孔,盖上封板膜,室温孵育2 h。扣去孔内液体,重复洗板3次。加入50 μ L生物素标记抗体,孵育2 h。扣去孔内液体,又重复洗板3次。加入抗生物素蛋白链菌素-HRP,室温孵育30 min。重复洗板3次后,加入显色剂,室温孵育15 min。终止反应后,用450 nm波长读值。

1.4 实时定量聚合酶链反应(PCR)

将1 μ g总RNA用逆转录试剂盒(Fermentas)反转录成20 μ L cDNA。实时定量PCR在应用生物系统7900HT(Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System)上进行,采用DyNAmoTMSYBR[®] Green qPCR Kits(FINNzymes公司)试剂盒。鼠ABCA1、LXR α 和 β -actin的PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C复性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。鼠ABCA1引物序列:上游5'-GAT TGG CTT CAG GAT GTC CAT GTT GGA A-3',下游5'-GTA TTT TTG CAA GGC TAC CAG TTA CAT TTG ACA A-3'。鼠LXR α 引物序列:上游5'-AGC GTC CAC TCA GAG CAA GT-3',下游5'-GG G GAC AGA ACA GTC ATT CG-3'。鼠 β -actin的引物序列:上游5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'。扩增混合体系包括:去离子水13.5 μ L, Master Mix 15 μ L, cDNA 1 μ L, Primer 0.5 μ L,共30 μ L。溶解曲线分析表明PCR反应产物为单独的双链DNA。用 $\Delta\Delta C_t$ 值法,以 β -actin表达为内参定量其它基因的表达。

1.5 Western印迹分析

收集各组小鼠腹腔巨噬细胞,经PBS离心(4 $^{\circ}$ C, 3 000 rpm, 10 min)洗涤3次,于悬浮缓冲液中裂解后,离心(4 $^{\circ}$ C, 10 000 rpm, 10 min)收集上清液,用BCA法进行蛋白定量。取提取的蛋白质样品:5 $\times$ SDS上样缓冲液:10% β -巯基乙醇以16:4:1混匀。100 $^{\circ}$ C煮6~8 min,6%或10%SDS-PAGE电泳(积层胶80 V,分离胶120V)后电转移(100 mA, 1.5 h)至PVDF膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5%脱脂牛奶室温封闭4 h,分别加

入 1: 500 LXR α 、ABCA1 和 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 ~8 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。加入 1: 1 000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。用 Western 印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。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。

1.6 胆固醇流出实验

检测方法参照文献[8], 细胞置于含有 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养基中共同孵育待细胞长至 85% 时, 采用 PBS 液洗涤细胞, 置于含脂蛋白的无血清 RPMI-1640 培养基中培养 24 h。采用 PBS 液洗涤细胞, 闪烁液裂解细胞后, 用闪烁计数法检测培养基和细胞中的^[3H]胆固醇。胆固醇流出率用培养基中 CPM 除以总 CPM(培养基 CPM + 细胞 CPM), 再乘以 100% 来表示。

1.7 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 12.0 进行统计处理, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 判定差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 APR 小鼠腹腔巨噬细胞 LXR α 和 ABCA1 的表达情况

分别取对照组和 LPS 组小鼠腹腔巨噬细胞, 提取总 RNA。RT-PCR 检测 LXR α 和 ABCA1 mRNA 表达情况。如图 1 所示, 与对照组相比, LPS 组 LXR α 和 ABCA1 mRNA 的表达显著降低 (*P* < 0.05)。

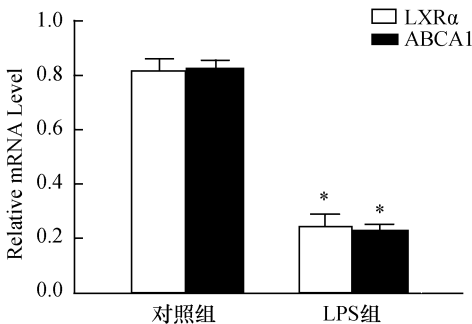


图1 LPS 处理小鼠腹腔巨噬细胞 LXR α 和 ABCA1 mRNA 表达的变化 与对照组比较, * : *P* < 0.05 (*n* = 3)

取总蛋白。采用 Western 印迹分析法检测细胞内 LXR α 和 ABCA1 蛋白质含量。如图 2 所示, 与对照组相比, LPS 组 LXR α 和 ABCA1 蛋白质表达显著降低 (*P* < 0.05)。

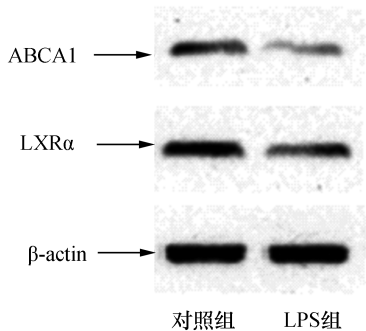


图2 LPS 处理小鼠腹腔巨噬细胞 LXR α 和 ABCA1 蛋白质表达的变化

2.2 APR 小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇流出情况

分别取对照组和 LPS 组小鼠腹腔巨噬细胞, 用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。如图 3 所示, 与对照组相比, LPS 组细胞内胆固醇流出减少 (*P* < 0.05)。

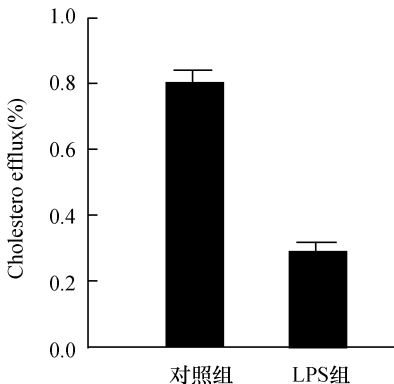


图3 LPS 处理小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇流出情况 与对照组比较, * : *P* < 0.05 (*n* = 3)

2.3 LXR α 激动剂 22(R)-Hch 对 LPS 调节 ABCA1 表达

小鼠腹腔巨噬细胞经 LPS 单独处理或 LXR α 特异性激动剂 22(R)-羟基胆固醇(22(R)-Hch)预处理 24 h 后联合 LPS 处理, 提取细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 检测 ABCA1 mRNA 表达。如图 4 所示, 与 LPS 组相比, 22(R)-Hch 与 LPS 联合处理组 ABCA1 mRNA 表达明显增加 (*P* < 0.05)。

分别取对照组和 LPS 组小鼠腹腔巨噬细胞, 提

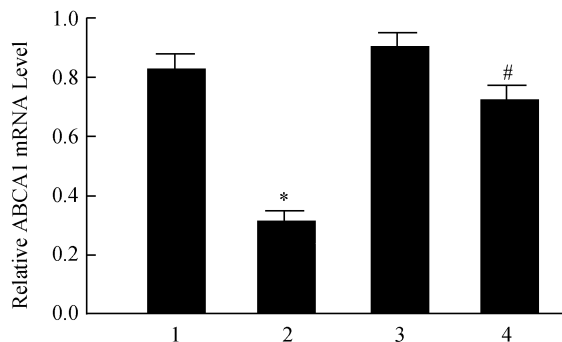


图4 22(R)-Hch对LPS处理的小鼠腹腔巨噬细胞ABCA1 mRNA表达的影响 1:对照组;2:LPS组;3:22(R)-Hch组;4:LPS+22(R)-Hch组. 与对照组比较,*: $P < 0.05$;与LPS组比较,#: $P < 0.05$ ($n=3$)

2.4 LXR α 激动剂22(R)-Hch对LPS调节胆固醇流出的影响

分别取LPS组和LPS+22(R)-Hch组巨噬细胞,用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。如图5所示,与LPS组相比,LPS+22(R)-Hch处理组细胞内胆固醇流出增加($P < 0.05$)。

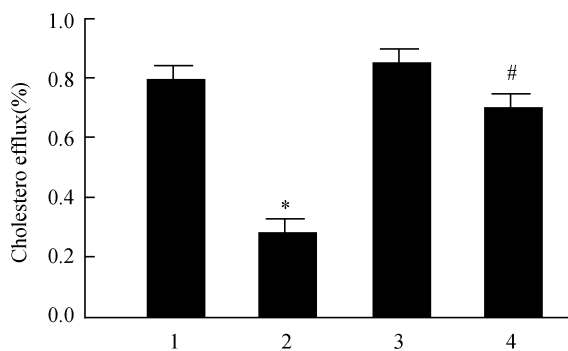


图5 22(R)-Hch对LPS处理的小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇流出的影响 1:对照组;2:LPS组;3:22(R)-Hch组;4:LPS+22(R)-Hch组. 与对照组比较,*: $P < 0.05$;与LPS组比较,#: $P < 0.05$ ($n=3$)

3 讨论

LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分。在动物体内注射LPS制备APR模型中可观察到胆固醇逆向转运减少^[3]。LPS与TLR4结合后可引起一系列连锁酶促反应,引起多种炎症相关基因表达的变化,同时通过增加单核巨噬细胞的募集和抑制细胞内脂质的流出促进As发生发展^[9]。ABCA1是促进细胞内脂质流出的关键转运蛋白,具有减少细胞内

胆固醇蓄积的作用^[10]。本实验采用来源于大肠埃希菌的LPS,采用静脉注射法制备APR小鼠模型。观察LPS诱导小鼠APR对ABCA1表达和胆固醇流出的影响。在本实验LPS诱导的APR模型中,LPS抑制ABCA1 mRNA和蛋白质表达。Trasino等^[11]最近报道,LPS抑制ABCA1表达,本课题组的实验结果与其结果相一致,LPS诱导的APR抑制ABCA1表达。ABCA1具有促进细胞内游离胆固醇和磷脂流出的功能,ABCA1的蛋白质表达减少,不能将细胞内过多的脂质转运到细胞外,导致细胞内大量脂质蓄积,这为LPS加速As斑块的形成提供了理论依据。ABCA1的表达在转录水平和转录后水平受到高度调控,涉及多种调控因素,其中促炎细胞因子,如TNF- α 、IL-1 β 、C反应蛋白(CRP)和IFN- γ 等在转录水平通过LXR α 下调ABCA1的表达,LPS、EPA、钙蛋白酶和钙调蛋白等在转录后水平通过降低ABCA1的稳定性促进其降解;主要的转录调控子是LXR α 激动剂、过氧化物酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) α 和PPAR γ 激动剂^[6];其中LXR α 在脂质代谢途径中具有重要作用^[12-13],与RXR形成LXR/RXR异二聚。研究表明,氧化固醇和反式维甲酸都可以活化此二聚体^[14]。LXRs/RXR通过对参与胆固醇脂肪酸代谢的靶基因转录的调节,调控ABCA1、ABCG1、脂肪酸合成酶(FAS)和胆固醇7 α 羟化酶等^[3],进而调控胆固醇代谢,在脂质代谢途径中发挥着关键作用^[15]。LXR α 是ABCA1的上游基因,激活LXR α 可以上调ABCA1的表达^[16-17]。本实验结果显示,与对照组相比,LPS处理组小鼠腹腔巨噬细胞LXR α 表达显著降低,与Wang等^[18]的结果相一致,LPS诱导的APR抑制LXR α 表达。因此,推测在APR过程中LPS抑制ABCA1的表达可能与TLR4/LXR α 信号途径有关。

本实验结果还显示,与LPS组相比,22(R)-Hch+LPS处理组ABCA1 mRNA和蛋白质表达增加,提示LXR α 激动剂22(R)-Hch拮抗LPS对ABCA1的抑制作用,但并不能完全解除对ABCA1的抑制作用。因此推测,LPS除了通过TLR4/LXR α 信号途径外,还存在其他的途径抑制ABCA1表达。有研究报道,TLR4/NF- κ B信号途径介导LPS对ABCA1表达及细胞内胆固醇流出的抑制作用^[6]。

因此,本研究进一步阐明了在LPS诱导的APR小鼠模型中,LPS对ABCA1表达和胆固醇流出的影

响,并探讨 LXR α 在此过程中的作用;在 APR 反应中,通过抑制 LPS/TLR4/LXR α 信号途径的激活,可以减轻炎症,上调 ABCA1 的表达,促进细胞内胆固醇的流出,减少细胞内脂质的蓄积,为 As 的防治提供新的调控靶点。在 APR 过程中,是否还存在与 TLR4/LXR α 途径有关的其他调节 ABCA1 表达机制,还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Cuaz-Perolin C, Billiet L, Bauge E, et al. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-kappaB inhibitor acetyl-11-keto-beta-boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(2):272-277.
- [2] Yin K, Tang SL, Yu XH, et al. Apolipoprotein A-I inhibits LPS-induced atherosclerosis in ApoE(-/-) mice possibly via activated STAT3-mediated upregulation of tristetraprolin[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(6):837-846.
- [3] Annema W, Nijstad N, Tolle M, et al. Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2) [J]. *J Lip Res*, 2010, 51(4):743-754.
- [4] Bauer M, Press AT, Trauner M. The liver in sepsis: patterns of response and injury [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2013, 19(2):123-127.
- [5] Vaisman BL, Demosky SJ, Stonik JA, et al. Endothelial expression of human ABCA1 in mice increases plasma HDL cholesterol and reduces diet-induced atherosclerosis[J]. *J Lip Res*, 2012, 53(1):158-167.
- [6] 谈春芝. 白介素 4 下调 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 的表达及其介导的胆固醇流出[D]. 衡阳: 南华大学, 2012:4-40.
- [7] Yin K, Tang C. Inflammation, lipid metabolism dysfunction, and hypertension; active research fields in atherosclerosis-related cardiovascular disease in China[J]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(10):976-979.
- [8] 曹冬黎, 尹凯, 莫中成, 等. 脂多糖通过核因子- κ B 途径下调泡沫细胞 ABCA1 的表达[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37(5):540-548.
- [9] McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, et al. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo [J]. *Circulation*, 2009, 119(8):1135-1145.
- [10] Chang YC, Lee TS, Chiang AN. Quercetin enhances ABCA1 expression and cholesterol efflux through a p38-dependent pathway in macrophages [J]. *J Lip Res*, 2012, 53(9):1840-1850.
- [11] Trasino S, Dawson H, Wang T, et al. The probiotic, *Lactobacillus casei*, prevents cholesteryl-ester (CE) accumulation and LPS antagonism of LXR-responsive genes in alveolar macrophages from Ossabaw pigs fed a high fat/high cholesterol (HF/HC) diet [J]. *FASEB J*, 2011, 25:784.
- [12] Zhao JF, Ching LC, Kou YR, et al. Activation of TRPV1 prevents OxLDL-induced lipid accumulation and TNF- α -induced inflammation in macrophages; role of liver X receptor α [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 26:925171.
- [13] Zhao JF, Shyue SK, Lin SJ, et al. Excess nitric oxide impairs liver X receptor α -ATP-binding cassette transporter A1-dependent cholesterol efflux in macrophage foam cells [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 4, 229(1):117-125.
- [14] Chow EK, Razani B, Cheng G. Innate immune system regulation of nuclear hormone receptors in metabolic diseases [J]. *J Leuk Biol*, 2007, 82(2):187-195.
- [15] Hu YW, Ma X, Li XX, et al. Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204(2):e35-43.
- [16] Dai XY, Ou X, Hao XR, et al. The effect of T0901317 on ATP-binding cassette transporter A1 and Niemann-Pick type C1 in apoE^{-/-} mice [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2008, 51(5):467-475.
- [17] Bischoff ED, Daige CL, Petrowski M, et al. Non-redundant roles for LXRA α and LXRB β in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice [J]. *J Lip Res*, 2010, 51(5):900-906.
- [18] Wang Y, Moser AH, Shigenaga JK, et al. Downregulation of liver X receptor- α in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines [J]. *J Lip Res*, 2005, 46(11):2377-2387.

(此文编辑:朱雯霞)