

普罗布考下调氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达

苏波¹, 何慧², 罗其富¹, 朱炳阳¹, 廖端芳¹

(南华大学 1. 药理学教研室, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 普罗布考; ATP 结合盒转运体 A1; 巨噬细胞; 氧化型低密度脂蛋白

[摘要] 目的 观察普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 表达的影响。方法 用逆转录聚合酶链反应、免疫荧光分别检测 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平和蛋白的表达。结果 用氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)分别孵育细胞 0、12、24 及 48 h, 实验结果发现 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平呈时序上调; 用 50 μ mol/L 普罗布考预处理细胞 4 h, 再用氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h, 普罗布考加氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)处理组与氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)处理组 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 水平无明显差异, 但免疫荧光检测发现普罗布考加氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L)处理组 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白表达下调。结论 普罗布考下调氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白的表达。

[中图分类号] R9

[文献标识码] A

Probucol Downregulates ATP Binding Cassette Transporter-1 Protein Expression of THP-1 Macrophages Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

SU Bo¹, HE Hui², LUO Qi Fu¹, ZHU Bing Yang¹, and LIAO Duar Fang¹

(1. Department of Pharmacology, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Probucol; ATP Binding Cassette Transporter A1; Macrophages; Oxidized Low Density Lipoprotein

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of probucol on ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in THP-1 macrophages. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence were used to detect ABCA1 mRNA and protein expression respectively. **Results** ABCA1 mRNA levels in THP-1 macrophages increased in time dependence pattern after cells incubated for 0 h, 12 h, 24 h and 48 h with 100 mg/L ox-LDL. After pretreatment for 4 h with 50 μ mol/L probucol, ABCA1 protein expression induced by ox-LDL for 48 h attenuated, with no change of ABCA1 mRNA levels in THP-1 macrophages. **Conclusion** Probucol downregulated ABCA1 protein expression induced by ox-LDL.

ATP 结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 介导胆固醇和磷脂与载脂蛋白 AI 的结合, 并转运至高密度脂蛋白, 是巨噬细胞内脂质流出重要的途径。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 作为毒性脂质在巨噬细胞荷脂、细胞损伤以及动脉粥样硬化斑块的发展中起着重要的作用, 研究显示 ox-LDL 能上调 ABCA1 的表达, 促进脂质的流出^[1]。普罗布考(probucol) 作为一种抗氧化剂, 具有降血脂、抗脂质氧化、稳定斑块的作用^[2]。近来文献报道普罗布考具有抑制 ABCA1 介导脂质流出的作用^[3,4]。而普罗布考对

ox-LDL 诱导巨噬细胞 ABCA1 表达的影响尚无文献报道。本实验通过用 50 μ mol/L 普罗布考预处理 THP-1 巨噬细胞, 观察普罗布考对 ox-LDL 诱导巨噬细胞 ABCA1 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人单核细胞系 THP-1 细胞购自上海细胞生物所细胞中心; RPMI1640 培养基和 Trizol RNA 提取试剂为 Gibco 公司产品; 新生小牛血清购自杭州四季清生物研究所; 普罗布考和佛波酯购自 Sigma 公司; 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自 Promega 公司, ABCA1 和看家基因 GAPDH 引物由上海生工公司合成; ABCA1 抗体购自购自 Santa cruz 公司, FITC 二抗购自北京中山公司; 丙二醛(MDA) 测定试剂盒购自

[收稿日期] 2006-09-07 [修回日期] 2007-04-01

[基金项目] 湖南省教育厅资助项目(04C540)

[作者简介] 苏波, 硕士, 讲师, 联系电话 0734-8281408, E-mail 为 subosu123@163.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 联系电话 0734-8281308 或 8281307, E-mail 为 dfliao@hotmail.com。

南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白含量测定试剂盒购自 Hyclone-Pierce 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养与分组

THP-1 细胞用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 条件下培养至 1×10^6 时, 加入 100 nmol/L 佛波酯, 孵育 48 h, 诱导单核细胞分化成巨噬细胞。实验分三组, 分别为未处理的 THP-1 巨噬细胞为对照组, ox-LDL (100 mg/L) 处理组 (简称 ox-LDL 组) 和普罗布考 (50 μ mol/L) 加 ox-LDL (100 mg/L) 处理组 (简称普罗布考组)。

1.3 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人新鲜血浆购自衡阳市血站。按照文献 [5] 的方法制备 LDL, 将血浆置超速离心机作超速离心。将提纯的 LDL 置于含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS (pH 7.2) 中, 37℃温育 24 h。氧化修饰后的 LDL 置于含 200 μ mol/L 乙二胺四乙酸的 PBS 中透析 24 h, 终止氧化。氧化型 LDL 经硫代巴比妥反应物含量检测和琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 超滤除菌, BCA 试剂蛋白定量后, 调蛋白浓度至 1 g/L, 4℃保存。

1.4 半定量逆转录聚合酶链反应检测 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的表达

收集细胞, PBS 洗涤离心两次, Trizol 试剂提取细胞总 RNA。以细胞总 RNA 为模板逆转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内对照, 进行半定量逆转录聚合酶链反应。ABCA1 上游引物为 5'-GCT GCT GAA GCC AGG CCA TGG G-3', 下游引物为 5'-GTG GGG CAG TGG CCA TAC TCC-3', 扩增产物为 306 bp; 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上游引物为 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 下游引物为 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 扩增产物为 697 bp。聚合酶链反应首先 94℃变性 5 min 后, 94℃变性 1 min \rightarrow 58℃退火 1 min \rightarrow 72℃延伸 1 min, 共 32 个循环, 最后一次循环 72℃延伸 10 min; PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。用 Labwork 凝胶图像分析系统收集图像。

1.5 免疫荧光检测 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白的表达

细胞处理后, 弃培养基, 预冷的 PBS 洗 2 次, 甲醇孵育细胞 20 min, PBS 洗 3 次, 0.25% TritonX100 处理 30 min, PBS 洗 3 次, 羊血清封闭 1 h, 一抗 (1:100) 37℃孵育 1 h, PBS 洗 3 次, FITC 标记的二抗 (1:100) 37℃孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察并照相, 根据荧光强弱等级分析蛋白表达的差异。

1.6 统计学处理

用 Labworks 图像分析系统对逆转录聚合酶链反应结果进行灰度扫描, 结果以目的基因/3-磷酸甘油醛脱氢酶的相对面积灰度值表示。重复实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件进行数据分析, 两组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间对 THP-1 细胞源性巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响

用 100 mg/L ox-LDL 分别孵育 THP-1 巨噬细胞 0 h、12 h、24 h 和 48 h, ABCA1 mRNA 的表达见图 1 和表 1。结果发现, 与对照组比较, ox-LDL 组 ABCA1 mRNA 水平呈时序增高 (*P* 均 < 0.05), 24 h 达到最高, 48 h 较 24 h 无明显差异。表明在 ox-LDL 的作用下 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 转录水平持续升高。

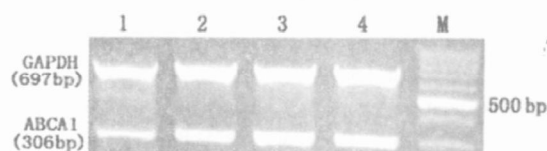


图 1. 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为 12 h 组, 3 为 24 h 组, 4 为 48 h 组。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

时 间	<i>n</i>	ABCA1 mRNA
0 h (对照组)	3	0.38 \pm 0.06
12 h	3	0.64 \pm 0.09 ^a
24 h	3	0.84 \pm 0.06 ^a
48 h	3	0.80 \pm 0.08 ^a

a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较。

2.2 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞源性巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响

用 50 μ mol/L 普罗布考预处理 THP-1 巨噬细胞 4 h 后, 再用 100 mg/L ox-LDL 孵育细胞 48 h, ABCA1 mRNA 的表达见图 2 和表 2。可见普罗布考组与 ox-LDL 组 ABCA1 mRNA 水平无明显差异 (*P* > 0.05)。提示普罗布考对 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 的表达没有影响。同时, 使用台盼蓝染色检测法观察普罗布考对细胞活性的影响, 结果发现 50 μ mol/L 普

罗布考处理 THP-1 巨噬细胞后, 细胞台盼蓝拒染率均 > 90%, 提示实验所采用的普罗布考浓度对细胞活性无明显影响。

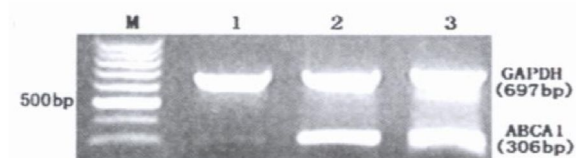


图 2. 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为普罗布考组。

表 2. 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	ABCA1 mRNA
对照组	3	0.24 ± 0.04
ox-LDL 组	3	0.88 ± 0.03 ^a
普罗布考组	3	0.86 ± 0.02 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

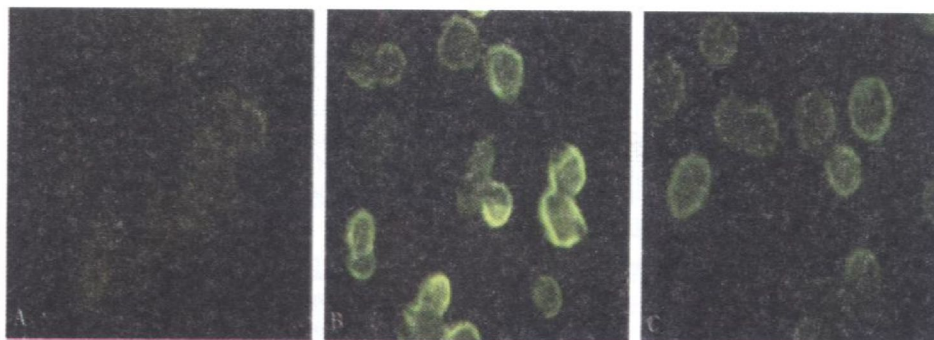


图 3. 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白表达的影响 A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为普罗布考组。

降解增加, 使得细胞外运脂质的能力降低^[6]。巨噬细胞内脂质蓄集在导致细胞泡沫化的同时, 脂质的过氧化使其细胞毒性增加是引起荷脂巨噬细胞凋亡进而导致斑块脂质坏死核心面积增加的重要原因。唐朝克等^[1]报道低浓度 ox-LDL (50 mg/L) 上调 ABCA1 的表达并能促进脂质的流出。近来 Li^[7]等发现 100 mg/L ox-LDL 能上调 RAW264.7 鼠巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达且能促进脂质的流出, 提示高浓度 ox-LDL 处理的巨噬细胞仍具有脂质流出的能力。为了检测较高浓度 ox-LDL 对人巨噬细胞 ABCA1 表达的影响, 本实验于是采用 100 mg/L 的 ox-LDL 刺激 THP-1 巨噬细胞, 结果发现 ABCA1 mRNA 水平呈时序增高。免疫荧光检测发现在 ox-LDL 处理 24 h 组

2.3 普罗布考对氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 细胞源性巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 蛋白表达的影响

用 50 μmol/L 普罗布考预处理 THP-1 巨噬细胞 4 h 后, 再用 100 mg/L ox-LDL 孵育细胞 48 h, 用免疫荧光检测 ABCA1 蛋白表达, 结果见图 3。ox-LDL 组与对照组比较, ABCA1 蛋白荧光强度显著增高; 与 ox-LDL 组比较, 普罗布考组 ABCA1 蛋白荧光强度明显下调, 提示普罗布考的抗氧化作用能抑制 ox-LDL 诱导 ABCA1 蛋白的表达。

3 讨论

巨噬细胞通过多种途径介导脂质的流出以维持细胞内脂质代谢的平衡。在细胞内脂质外向转运过程中, ABCA1 是一种重要的细胞膜蛋白。LDL 或修饰的 LDL 均可诱导 ABCA1 的表达, 后者能促进脂质的流出。随着巨噬细胞内脂质的增加, ABCA1 蛋白

和 48 h 组 ABCA1 蛋白水平明显升高, 与 Li 等报道一致。文献报道^[6]蛋白酶体抑制剂 lactacystin 能够抑制巨噬细胞内游离胆固醇所致 ABCA1 蛋白降解; 而 ox-LDL 具有抑制蛋白酶体的作用^[8]。本实验结果发现 ox-LDL (100 mg/L) 刺激 THP-1 巨噬细胞后, ABCA1 蛋白表达增加, 我们推测 ox-LDL 升高巨噬细胞 ABCA1 蛋白水平, 一方面是由于 ox-LDL 诱导 ABCA1 表达, 另一方面可能是与 ox-LDL 抑制 ABCA1 蛋白的降解有关。

普罗布考作为抗氧化剂具有抗动脉粥样硬化的作用, Kuzuya 等^[9]研究证实普罗布考能显著降低内皮细胞内氧化性脂质的含量; 我们也曾经报道普罗布考在巨噬细胞内具有抗脂质过氧化的作用^[10]。

而普罗布考抑制鼠巨噬细胞的脂质流出^[11],且并不能抑制巨噬细胞泡沫化;近来 Moore 等^[4]发现普罗布考处理的 THP-1 巨噬细胞脂质的蓄积增加; Favari 等^[3]报道普罗布考抑制 J774 巨噬细胞 ABCA1 介导非氧化修饰脂质的流出,与其抑制载脂蛋白 AI 与 ABCA1 的结合有关。为了观察普罗布考对 ox-LDL 诱导 ABCA1 表达的影响,本实验采用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的普罗布考预处理细胞 4 h,结果发现 ABCA1 mRNA 水平没有改变,ABCA1 蛋白的表达明显下调。我们推测普罗布考下调 ox-LDL 诱导 ABCA1 蛋白表达的机制可能是,一方面普罗布考的抗氧化作用降低了氧化性脂质的含量,抑制 ox-LDL 诱导 ABCA1 蛋白表达;另一方面如 Favari 等^[3]所报道得,普罗布考抑制 ABCA1 与载脂蛋白 A-I 结合及脂质转运功能,而游离的 ABCA1 蛋白可能通过负反馈调节影响 ABCA1 mRNA 的翻译过程;其次,文献^[6]报道,在脂质负载巨噬细胞,ABCA1 蛋白在促进脂质流出的同时,其降解也显著增加,提示虽然普罗布考能发挥抗细胞内脂质过氧化作用,并能降低细胞内氧化性脂质的含量,但细胞内大量蓄积的非氧化性脂质仍可能促进 ABCA1 的降解,这可能部分解释了文献所报道的普罗布考并不能促进 ABCA1 介导脂质流出的原因。Brasen 等^[2]发现高脂血症动物 WHHL 兔使用普罗布考 12 个月,动脉硬化斑块内巨噬细胞数量明显减少,平滑肌细胞增多和纤维帽增厚,脂质坏死核心面积减少,说明长期使用普罗布考能发挥抗动脉粥样硬化的作用;但同时发现普罗布考却不能降低斑块内脂质的含量。以上提示普罗布考作为抗氧化剂,其抗动脉粥样硬化的作用可能主要通过抑制细胞内脂质的过氧化和氧化性脂质刺激细胞炎性介质的分泌,从而减少斑块内巨噬细胞的聚集;另一方

面通过防止氧化应激所致细胞凋亡以维护斑块的稳定。本实验发现普罗布考能下调 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞 ABCA1 蛋白的表达,而有关普罗布考对 ABCA1 表达调控的机制以及对 ox-LDL 致人巨噬细胞泡沫化的影响还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 唐朝克,易光辉,唐国华,王佐,王燕,刘录山,等. ATP 结合盒转运体 A1 在泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (4): 304-308.
- [2] Brasen JH, Koenig K, Bach H, Kontush A, Heinle H, Witting PK, et al. Comparison of the effects of α -tocopherol, ubiquinol and probucol at therapeutic doses on atherosclerosis in WHHL rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 163 (2): 249-259.
- [3] Favari E, Zanotti I, Zimetti F, Ronda N, Bernini F, Rothblat GH. Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (12): 2345-350.
- [4] Moore EH, Napolitano M, Avella M, Bejta F, Suckling KE, Bravo E, et al. Protection of chylomicron remnants from oxidation by incorporation of probucol into the particles enhances their uptake by human macrophages and increases lipid accumulation in the cells [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271 (12): 2417-2427.
- [5] 袁中华,杨永宗,杨小毅,谭建苗,万载阳. 消斑肽加速氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17 (10): 935-937.
- [6] Feng B, Tahas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (8): 43271-280.
- [7] Li Y, Bi H, Wu F, Y Zong, Wang Y, Qu S. Effects of oxidized low density lipoprotein on the expression and function of ABCA1 in macrophages [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25 (2): 113-116.
- [8] Vieira O, Blanc IE, Jurgens G, Bomer C, Almeida L, Salvayre R, et al. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis [J]. *FASEB J*, 2000, 14 (3): 532-542.
- [9] Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Asai K, Kuzuya F. Probucol prevents oxidative injury to endothelial cells [J]. *J Lipid Res*, 1991, 32 (2): 197-204.
- [10] Liu GX, Ou DM, Liu JH, Huang HL, Liao DF. Probucol inhibits lipid peroxidation of macrophage and affects its secretory properties [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21 (7): 637-640.
- [11] Takemura T, Sakai M, Matsuda H, Matsumura T, Biwa T, Anami Y, et al. Effects of probucol on cholesterol metabolism in mouse peritoneal macrophages: inhibition of HDL-mediated cholesterol efflux [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 152 (2): 347-357.

(此文编辑 胡必利)

编辑部更正

本刊 2007 年第 15 卷第 3 期第 165 页第三作者张辉更改为张珏辉;作者简介中张勇刚 E-mail 为 zhangyg8686@hotmail.com 更改为 zhangyg8686@hotmail.com;唐朝枢,汕头大学医学院博士后合作教授更改为博士后合作教授。以上因编校疏忽造成,特此更正,并向作者表示歉意。