

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 *

王中群^{1,2)} 杨永宗¹⁾ 王佐¹⁾ 任重¹⁾ 唐朝克¹⁾ 刘录山¹⁾ 易光辉¹⁾ 袁中华^{1)**}

(¹⁾南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001; ²⁾新乡医学院病理教研室, 新乡 453003)

摘要 以 THP-1 巨噬细胞为研究对象, 观察蛋白激酶 C (PKC) 激动剂佛波酯 (PMA) 和抑制剂钙磷酸结合蛋白 C (Calphostin C) 对胞膜 PKC 活性、胞膜 PKC α 及胞浆内过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR γ) 和 adipophilin 表达以及细胞内脂质蓄积的影响, 初步探讨 PKC 调控 adipophilin 表达及脂质蓄积的作用机制. 采用 PepTag[®] Assay、RT-PCR、蛋白质印迹、油红 O 染色和高效液相色谱法, 观察到 100 nmol/L PMA 在激活胞膜 PKC ((0.2514 $\pm$ 0.0154) U/ml) 的同时可以与氧化低密度脂蛋白 (oxLDL) 协同增强 PKC α 、PPAR γ 和 adipophilin 表达并使细胞内脂滴的蓄积极大地增强. 细胞内胆固醇酯 / 总胆固醇比值增至 (69.8 $\pm$ 9.5)%; 300 nmol/L Calphostin C 对荷脂 THP-1 巨噬细胞的处理则抑制酶活性至 ((0.0927 $\pm$ 0.0056) U/ml, 细胞内脂滴减少, 胆固醇酯 / 总胆固醇比值降至 (40.1 $\pm$ 9.1)%; Calphostin C 呈剂量依赖性的方式下调酶活性、PKC α 、PPAR γ 和 adipophilin 表达, 400 nmol/L Calphostin C 基本上可以逆转 50 mg/L oxLDL 诱导的酶活化和 PKC α 、PPAR γ 和 adipophilin 表达的上调. 结果提示, 蛋白激酶 C 活性的改变可以影响 adipophilin 介导的脂质蓄积, 其中 PPAR γ 可能在这一调控机制中发挥了重要作用.

关键词 氧化低密度脂蛋白, 蛋白激酶 C, 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ , adipophilin, 脂滴, 动脉粥样硬化

学科分类号 Q291, R363.1

胆固醇等中性脂质的蓄积是动脉粥样硬化泡沫细胞形成和四期病变发生的核心环节^[1]. 在真核细胞中, 这些蓄积的脂质主要以脂滴的形式贮存于胞浆中. Adipophilin 就是脂滴外周 40 余种相关蛋白中含量最高的一种^[2,3]. 其功能主要是促进细胞中脂质的蓄积, 抑制胆固醇的外流^[4]. 下调或者封闭 adipophilin 的表达, 有可能为动脉粥样硬化性疾病的防治带来新的契机.

已有的研究显示, 在 adipophilin 基因启动子区有过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 各亚型的反应元件 (peroxisome proliferator responsive elements, PPRES), 能够与 PPAR γ_1 、PPAR γ_2 结合并调控人 adipophilin 基因的表达^[5]. 另外的独立研究则显示 PPARs 可能接受信号转导关键酶蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的磷酸化调控^[6]. 那么, 具有良好药物开发价值的 PKC 信号转导通路是否可以调控 adipophilin 的表达, 是否可以调控 adipophilin 介导的脂质蓄积, 其调控机制如何, 现有的资料尚无法

作出满意的回答. 为此, 本课题在项目组 adipophilin 的系列研究基础上, 以 PKC 激动剂佛波酯 (PMA) 和抑制剂钙磷酸结合蛋白 C (Calphostin C) 处理荷脂 THP-1 巨噬细胞, 观察 PKC 活性的改变对巨噬细胞 PKC α 、PPAR γ 和 adipophilin 表达的影响, 并检测细胞内脂质蓄积的改变情况, 以初步探讨信号转导途径中的关键酶 PKC 调控 adipophilin 介导脂质蓄积的可能机制.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

THP-1 细胞株购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; Olympus 倒置光学显微镜 (Olympus 公司), 200 型高效液相色谱仪 (PE 公司),

* 湖南省自然科学基金 (05JJ40039) 和湖南省卫生厅 (B20042082) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281311, Fax: 0734-8282232, E-mail: yzh5555@163.com

收稿日期: 2007-01-29, 接受日期: 2007-03-07

GOS7 500型UVP凝胶成像分析系统(UVP公司), CP100MX型超速离心机(日立公司), 5804型台式多功能高速冷冻离心机(Eppendorf公司), 超声波破碎仪(Sonics & Material Inc公司), 垂直电泳仪及转膜系统、水平电泳系统(BioRad公司). 佛波酯(PMA)、Oil Red O购自Sigma公司; Calphostin C购自Biomol公司; 总RNA提取试剂盒TRIzol购自上海Sangon公司; ImProm-II™ Reverse Transcriptase、PepTag® Non-Radioactive PKC Assay Kit 和 BCA™ Protein Assay Kit购自Promega公司; MasterMix一管便捷式PCR扩增试剂盒购自北京天为时代公司; 所有引物由上海生工生物工程服务有限公司合成; adipophilin 抗体购自 Research Diagnostic Inc; PPAR_γ 一抗, 蛋白质印迹荧光检测试剂购自 Santa Cruz公司; PKC_α 一抗, 辣根过氧化物酶标记二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

参考文献[7]的方法制备低密度脂蛋白, 新鲜人血浆购自衡阳市中心血站. 取新鲜人血浆100~200 ml, 加入PDB以防腐和防氧化. 置超速离心机作序列超速离心. 提纯的低密度脂蛋白(LDL)在含200 μmol/L EDTA的磷酸缓冲液(PBS)中透析48 h, BCA法蛋白质定量, CuSO₄氧化, 鉴定后过滤除菌, 调蛋白质浓度至1 g/L, 4℃保存.

1.3 实验分组

本研究分为2个部分, 首先观察PKC激动剂PMA与抑制剂Calphostin C对adipophilin介导脂质蓄积的影响, 观察到抑制效应后, 进一步用梯度Calphostin C处理荷脂巨噬细胞, 探讨PKC对adipophilin促脂质蓄积的调控机制并进而为筛选低毒有效可逆转泡沫细胞的药物奠定实验基础. 在每次实验前用160 nmol/L佛波酯孵育THP-1细胞24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞, 换含2 g/L BSA的无血清培养基培养3 h后加处理因素. 加入处理因素后每组细胞均在距20W Philip荧光灯10 cm处照射大约30 min, 以激活Calphostin C的药物活性. 实验1: a. 对照组, RPMI-1 640培养基+10 μl DMSO溶媒孵育16 h; b. 氧化低密度脂蛋白(oxLDL)对照组, 用50 mg/L oxLDL +10 μl DMSO溶媒孵育16 h; c. 100 nmol/L PMA处理组, 用50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA孵育 16 h; d. 300 nmol/L Calphostin C处理组, 用50 mg/L oxLDL+300 nmol/L Calphostin C孵育16 h. 实验2: a. 50 mg/L oxLDL +

10 μl DMSO孵育细胞16 h; b. 50 mg/L oxLDL + 25 nmol/L Calphostin C孵育细胞16 h; c. 50 mg/L oxLDL + 50 nmol/L Calphostin C孵育细胞16 h; d. 50 mg/L oxLDL+ 100 nmol/L Calphostin C孵育细胞16 h; e. 50 mg/L oxLDL +200 nmol/L Calphostin C孵育细胞16 h; f. 50 mg/L oxLDL +400 nmol/L Calphostin C孵育细胞16 h.

1.4 胞浆胞膜蛋白提取

弃培养基, 冰冷PBS清洗培养在100 ml培养瓶内单层贴壁细胞2~3次, 加入200 μl胞浆蛋白提取液(25 mmol/L Tris, pH 7.5, 2.0 mmol/L EDTA, 2.0 mmol/L EGTA, 2.0 mmol/L DTT, 250 mmol/L 葡萄糖, 1.0 mmol/L PMSF, 其中DTT和PMSF临用时加), 细胞刮子收集细胞后冰上静止10 min, 超声破碎(250 mA, 10 s×3次). 将经过裂解的细胞匀浆液4℃离心, 10 000 g, 15 min, 收集上清液即为胞浆蛋白. 离心沉淀部分加入含0.3% TritonX-100胞膜蛋白提取液(其余成分同胞浆蛋白提取液), 超声破碎(300 mA, 10 s×3次), 4℃静置1 h. 4℃离心 10 000 g, 10 min, 收集上清液, 即为胞膜蛋白. 将收集到的胞浆、胞膜蛋白粗提液用BCA蛋白检测试剂盒进行定量后, 各取150 μl分别加入5×SDS上样缓冲液和相应的DTT, 100℃7 min后, -20℃保存, 用于蛋白质印迹分析. 未经煮沸变性的胞膜蛋白粗提液用于PKC活性检测.

1.5 PepTag® Assay琼脂糖凝胶电泳

PepTag® Assay Kit应用了对激酶具有高度特异性的高亮度荧光PepTag® 肽底物 (PKC特异性肽底物PepTag®C1肽的氨基酸序列是P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K). 特异性荧光肽底物的磷酸化使肽的电荷和分子质量发生变化, 从而使得琼脂糖凝胶电泳可以快速分离底物磷酸化和非磷酸化部分. 取9 μl未变性胞膜蛋白的粗提液加入到16 μl经过30℃ 2 min的PKC活性检测反应液 (PepTag®PKC反应5×缓冲液5 μl; PepTag®C1肽5 μl; PKC活化剂5×溶液5 μl; 肽保护液1 μl), 混匀后构成25 μl的反应体系(阴性对照则将9 μl未变性胞膜蛋白的粗提液替换为9 μl去离子水), 30℃ 30 min, 95℃ 10 min. 4℃避光保存. 取5 μl反应终产物, 于0.8%琼脂糖凝胶100 V电压条件下水平电泳15 min. 终止电泳后, UVP凝胶电泳分析系统摄像, 显示胞膜PKC的磷酸化与非磷酸化条带.

1.6 PepTag® Assay分光光度法

在紫外灯照射下用手术刀片快速切下磷酸化区

带250 μl 放入1.5 ml刻度离心管, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热至凝胶溶解. 将175 μl 的热琼脂糖倒入含有75 μl 凝胶增溶性溶液(试剂盒部分)、100 μl 冰乙酸和150 μl 去离子水的试管中. 摇匀后将500 μl 溶液倒入0.5 ml比色杯中. 可见/紫外分光光度计读取 570 nm的吸光度值. 以液化的不含PepTag[®] Peptide的琼脂糖作为空白值. 根据试剂盒提供的数据和Beer's定律 $A = \Sigma BC$ (A : 样品吸光度; Σ : 肽的摩尔吸收率, 单位 $\text{L/mol}\cdot\text{cm}^{-1}$; B : 比色杯宽度, 单位 cm ; C : 样品中肽浓度, 单位 mol/L) 逐步计算酶活性 (1单位酶活性指每毫升溶液中的磷酸盐每分钟转移至底物的纳摩尔数).

1.7 逆转录聚合酶链反应RT-PCR

用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 溶于无RNase水中, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的比值在1.8~2.0之间. 取总RNA 2 μg , 用ImProm- II[™] Reverse Transcriptase合成cDNA, 再取逆转录产物10 μl 进行PCR循环. Adipophilin引物序列为 5'AGGGGCTAGACAGGATTGAGGAGA 3' (上游), 5'ACGGAGTGAAGCTTGCTAGAC 3'(下游), 扩增片段长度 436 bp; 内参照 β -actin 引物序列 5'ATCCCTGTACGCCTCTGG 3' (上游), 5'TCC TTCTGCATCCTGTCTG 3'(下游), 扩增片段长度 500 bp. PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min变性, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s延伸, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min继续延伸. PPAR γ 的引物序列: 5'TTCAGAAATGCCTTGCACTG 3' (上游), 5'GGGGGTGATGTGTTT G AACT 3'(下游), PCR扩增产物长度为308 bp. PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s变性, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s退火, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s延伸, 30个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min继续延伸. 反应结束后, 取RT-PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶中电泳, 加样量均为10 μl , 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.

1.8 蛋白质印迹检测

取出1.4中提取的经过BCA蛋白质定量并煮沸变性的蛋白质样品 (50 μg /泳道) 用8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离 (积层胶 80 V, 分离胶 120 V) 后, 电转移 (100 mA 2 h) 至PVDF膜上, 丽春红染色观察蛋白质转移情况, 并确定蛋白质分子质量标准位置. 5%脱脂牛奶4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床摇育过夜后, 按比例加入一抗(胞膜蛋白 $\text{PKC}\alpha$ 一抗, 胞浆蛋白

孵Adipophilin、PPAR γ 抗体), 于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h. TBST洗涤3次, 每5 min换液1次. 按1:1 000比例加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育1.5 h. TBST洗3次, 每5 min换液1次. 然后用蛋白质印迹荧光检测试剂激发荧光, 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.

1.9 油红O染色

将THP-1细胞培养于放有盖玻片的6孔培养板内, 待细胞被诱导分化为巨噬细胞后, 换含2 g/L BSA的无血清培养基培养3 h, 加入oxLDL处理24 h. 细胞贴壁生长于培养板, 用PBS液冲洗3次, 每次5 min. 50%异丙醇固定1 min, 油红O染色10 min, 苏木素衬染5 min, 盐酸酒精分色. 水性封片剂封片, 显微镜观察. 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色, 图像分析系统收集图像并于显微镜下摄像保存.

1.10 高效液相色谱分析

参考文献[8], 将经过处理的THP-1巨噬细胞吸弃旧培养基, PBS洗2次, 加入1 ml 0.9% NaCl溶液, 细胞刮子收集细胞. 冰浴中超声破碎细胞, 工作条件600 W, 工作时间4 s, 间歇时间8 s, 定时次数6次. 用BCA法测定蛋白质含量. 在细胞溶解产物中加入等体积新鲜配制的15%醇溶性KOH (-20 $^{\circ}\text{C}$), 涡旋至细胞溶解产物清亮, 加入6%三氯乙酸去蛋白质, 再加入等体积的正己烷: 异丙醇4:1溶液 (体积比), 将混合物涡旋5 min, 然后1 500 r/min, 15 $^{\circ}\text{C}$ 下离心5 min, 收集上层有机相, 将下层水相按上述方法重复抽提2次, 将混合的有机相转移到一个带盖的试管, 再在真空冷冻干燥机中65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 室温冷却后, 加入100 μl 异丙醇: 正庚烷: 乙腈35:12:52 (体积比), 将样品溶解, 用活性炭去色素, 超声除气5 min, 1 500 r/min离心5 min后, 收集上清液, 取10 μl 进样, 进行高效液相色谱 (HPLC) 分析. 采用C18柱, 以异丙醇: 正庚烷: 乙腈为流动相进行非梯度洗脱, 流速1 ml/min, 柱温保持4 $^{\circ}\text{C}$, 216 nm检测8 min. 以峰面积定量胆固醇和胆固醇酯, 总胆固醇量为游离胆固醇量加上胆固醇酯的量.

1.11 统计学处理

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析及 t 检验, 由SPSS11.0统计软件完成, 以 $P < 0.05$ 判定差异有显著性.

2 结 果

2.1 PMA和Calphostin C对荷脂THP-1巨噬细胞PKC活性的影响

观察PKC激动剂佛波酯PMA和抑制剂钙磷结合蛋白Calphostin C对荷脂THP-1巨噬细胞激酶活性的影响. 琼脂糖凝胶电泳显示(图1a), 相对于溶媒对照组, 高特异性PepTag®荧光肽底物磷酸化条带在50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA处理组明显增强变亮, 而在50 mg/L oxLDL +300 nmol/L Calphostin C处理组则明显变暗减淡. 570 nm分光光度计下检测结果并进一步计算, 获得相应酶活性(图1b)依次为10 μ l DMSO溶媒组(0.0503 ± 0.0012) U/ml, 50 mg/L oxLDL +10 μ l DMSO组(0.1233 ± 0.0086) U/ml, 50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA组(0.2514 ± 0.0154) U/ml, 50 mg/L oxLDL +300 nmol/L Calphostin C组(0.0927 ± 0.0056) U/ml ($\Sigma = (1.6852 \pm 0.0746) \times 10^6$ L/mol $\cdot$ cm $^{-1}$), t 检验显示组间差异有显著性 $P < 0.05$ ($n = 5$). 结果提示, PMA可以显著增强PKC活性, 而Calphostin C则明显地抑制PKC活性.

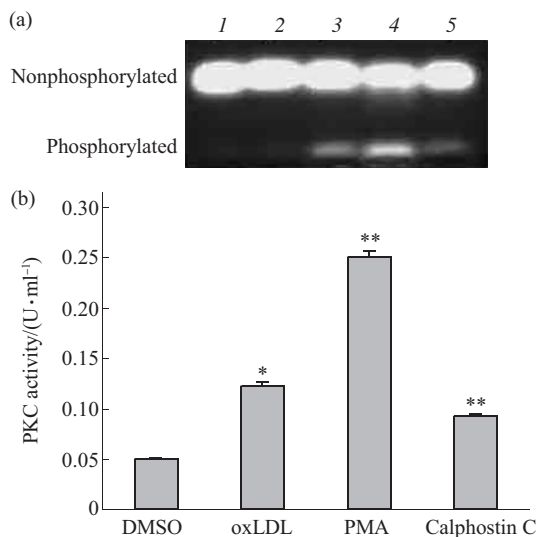


Fig. 1 Effects of PMA and Calphostin C on the cytomembrane PKC activities in oxLDL-loaded THP-1 macrophage

(a) Qualitative PepTag® Assay on Agarose Gel Electrophoresis. The phosphorylated versions reflect the PKC activities. 1: Negative control; 2: 10 μ l DMSO(solvent); 3: 10 μ l DMSO(solvent) + 50 mg/L oxLDL; 4: 50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA; 5: 50 mg/L oxLDL+300 nmol/L CalphostinC. (b) Quantitative PepTag® Assay by Spectrophotometry According to the 570 nm absorbance, PKC activity can be calculated by using Beer's Law. * $P < 0.05$, compared with DMSO solvent group; ** $P < 0.05$, compared with oxLDL group (10 μ l DMSO + 5 mg/L oxLDL).

进一步检测THP-1巨噬细胞, 给予50 mg/L oxLDL+10 μ l DMSO、50 mg/L oxLDL+25 nmol/L Calphostin C、50 mg/L oxLDL+50 nmol/L Calphostin C、50 mg/L oxLDL+100 nmol/L Calphostin C、50 mg/L oxLDL+200 nmol/L Calphostin C、50 mg/L oxLDL+400 nmol/L Calphostin C处理16 h后细胞膜PKC活性的改变. 相对于DMSO溶媒对照组, 琼脂糖凝胶电泳显示(图2a), 随着Calphostin C浓度的增加, 细胞膜PKC活性呈剂量依赖性的方式降低. 定量检测结果显示(图2b), 当给予细胞50 mg/L oxLDL+200 nmol/L Calphostin C处理时, 胞膜激酶活性下降幅度最大, 由(0.1715 ± 0.0135) U/ml降低至(0.1050 ± 0.0247) U/ml ($\Sigma = (1.6958 \pm 0.0541) \times 10^6$ L/mol $\cdot$ cm $^{-1}$).

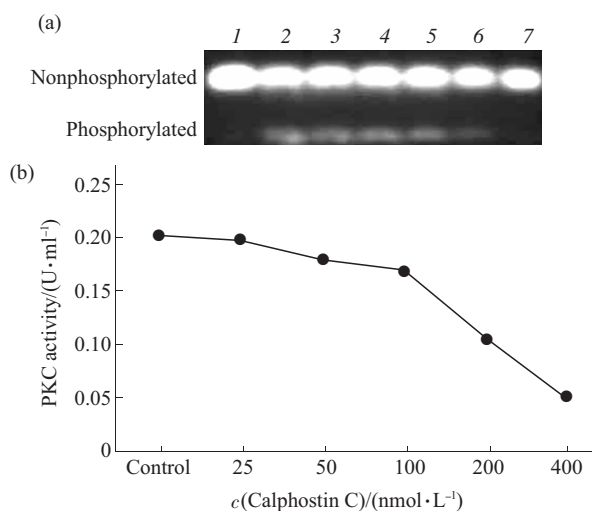


Fig. 2 Dose-dependent effect of CalphostinC on the cytomembrane PKC activities in oxLDL-loaded THP-1 macrophage

(a) Qualitative PepTag® Assay on Agarose Gel Electrophoresis. The phosphorylated versions reflect the PKC activities. 1: Negative control; 2: 50 mg/L oxLDL +10 μ l DMSO; 3: 50 mg/L oxLDL+25 nmol/L Calphostin C; 4: 50 mg/L oxLDL+50 nmol/L Calphostin C; 5: 50 mg/L oxLDL+100 nmol/L Calphostin C; 6: 50 mg/L oxLDL+200 nmol/L Calphostin C; 7: 50 mg/L oxLDL+400 nmol/L Calphostin C. (b) Quantitative PepTag® Assay by Spectrophotometry According to the 570 nm absorbance, PKC activity can be calculated by using Beer's Law.

2.2 PMA和Calphostin C对THP-1巨噬细胞脂质蓄积的影响

2.2.1 油红O染色观察细胞内脂滴的蓄积情况. 细胞内脂质的蓄积在泡沫细胞形成和动脉粥样硬化的发生发展中起到了关键作用, 那么, PKC活性的改变对THP-1巨噬细胞内脂滴的蓄积有何影响? 油红O染色结果显示(图3), 50 mg/L oxLDL共孵育巨噬细胞

16 h后, 细胞内脂滴的数量增加, 部分脂滴融合, 在此基础上再给予100 nmol/L PMA处理则可见细胞内脂滴的数量与融合得到了明显增强, 蓝染的胞核周围蓄积了大团的脂滴. 而50 mg/L oxLDL+300 nmol/L Calphostin C处理16 h后细胞内脂滴的数

量相对于oxLDL处理组, 有所降低, 但相对于溶媒处理组仍然处于较高水平. 这提示PKC活性的增加促进了荷脂THP-1巨噬细胞胞浆内脂滴的蓄积, 而其活性的降低则减少了脂滴的蓄积.

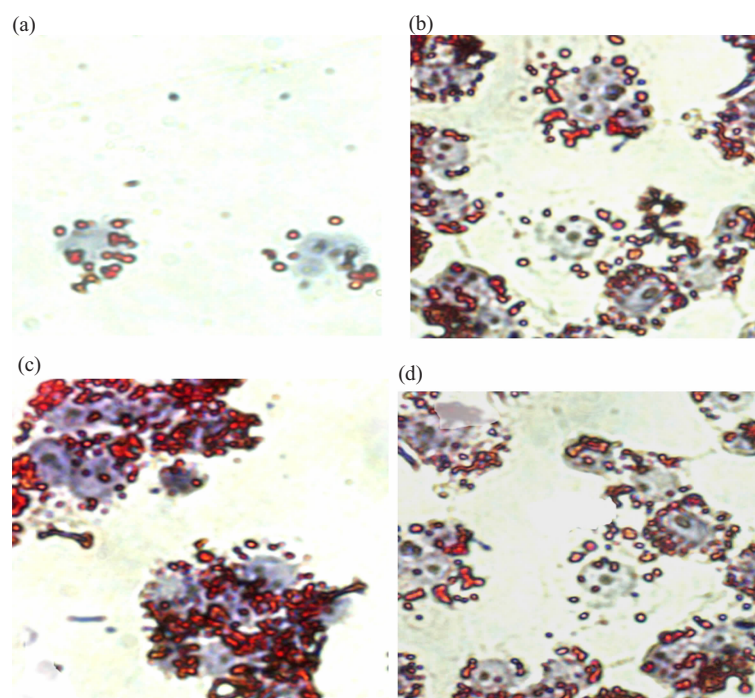


Fig. 3 Effects of PMA and Calphostin C on lipid-accumulation in oxLDL-loaded THP-1 macrophages by oil red O staining
(a)10 μ l DMSO(solvent control). (b) 10 μ l DMSO (solvent)+50 mg/L oxLDL. (c) 50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA. (d) 50 mg/L oxLDL+300 nmol/L Calphostin C ($\times 400$, $n = 5$).

2.2.2 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇酯的蓄积情况. 既然PKC活性的改变影响了细胞内脂滴的蓄积情况, 那么作为动脉粥样硬化泡沫细胞形成最直接的危险因素细胞内胆固醇构成情况如何? 高效液相色谱法的检测显示(图4): DMSO溶媒对照组, 50 mg/L oxLDL +10 μ l DMSO 组, 50 mg/L oxLDL +100 nmol/L PMA 组, 50 mg/L oxLDL +300 nmol/L Calphostin C组巨噬细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值依次为(25.4 $\pm$ 8.4)%, (57.3 $\pm$ 3.5)%, (69.8 $\pm$ 9.5)%, (40.1 $\pm$ 9.1)%. 从检测结果可以看到: PMA与oxLDL协同增强细胞内胆固醇酯所占的比例, 50 mg/L oxLDL+100 nmol/L PMA的处理使细胞已经完全转变为泡沫细胞(细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值达到50%以上); 300 nmol/L Calphostin C可以部分逆转oxLDL造成的胆固醇酯蓄积. 综合油红O和HPLC的检测结果, 可以认为PKC活性的变化影响了THP-1巨噬细胞内的脂质蓄积与构成情况.

2.3 PMA和Calphostin C对荷脂THP-1巨噬细胞adipophilin表达的影响

为了进一步探讨PKC活性影响细胞内脂质蓄积的机制, 又用RT-PCR和蛋白质印迹在分子水平对脂质蓄积的标记物脂滴相关蛋白adipophilin作了检测. 结果显示: 与溶媒对照组相比, 50 mg/L oxLDL可以上调adipophilin表达, PMA显著协同地增强了这种上调效应. 与基因变化稍有不同的是300 nmol/L Calphostin C可逆转由oxLDL引起的上调效应, 使其与溶媒对照组产生了显著的统计学差异, 亦即300 nmol/L Calphostin C对巨噬细胞的处理可以使adipophilin蛋白的表达下降至基础水平以下(图5). Calphostin C浓度梯度处理荷脂巨噬细胞可以浓度依赖性地下调adipophilin的表达(图6). 上述结果提示, PMA和Calphostin C可能是改变了巨噬细胞adipophilin的表达进而影响了细胞内脂质蓄积情况.

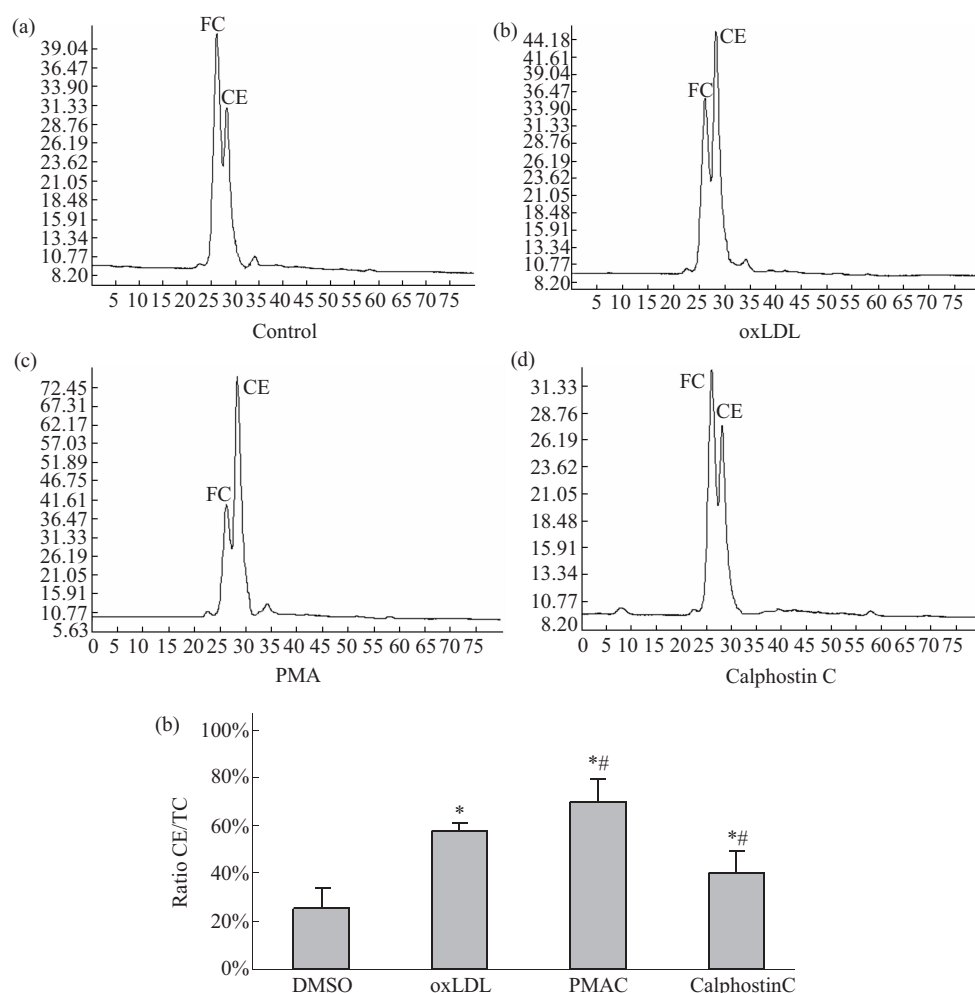


Fig. 4 Changes of intracellular cholesterol-accumulation in oxLDL-loaded macrophages by high performance liquid chromatography

(a) The chromatography picture of CE and FC. (b) The ratios of CE/TC calculated according to peak area (CE: Cholesterol ester; FC: Free cholesterol; TC: Total cholesterol). * $P < 0.05$, compared with DMSO solvent control group; # $P < 0.05$, compared with oxLDL group (10 μ l DMSO + 50 mg/L oxLDL).

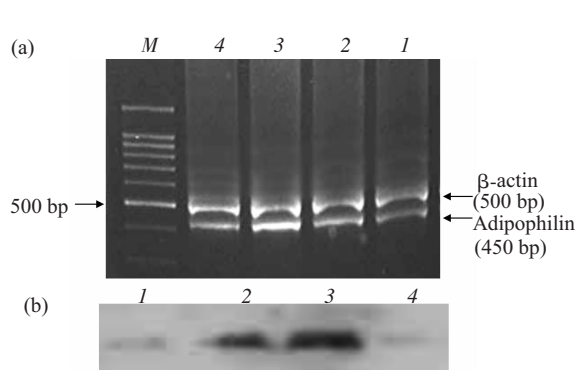


Fig. 5 Effects of PMA and Calphostin C on adipophilin expression in THP-1 macrophage

(a) RT-PCR analysis of adipophilin gene expression. (b) Western blot analysis for adipophilin. 1: 10 μ l DMSO (solvent control); 2: 10 μ l DMSO (solvent) + 50 mg/L oxLDL; 3: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L PMA; 4: 50 mg/L oxLDL + 300 nmol/L Calphostin C. M: 100 bp DNA ladder.

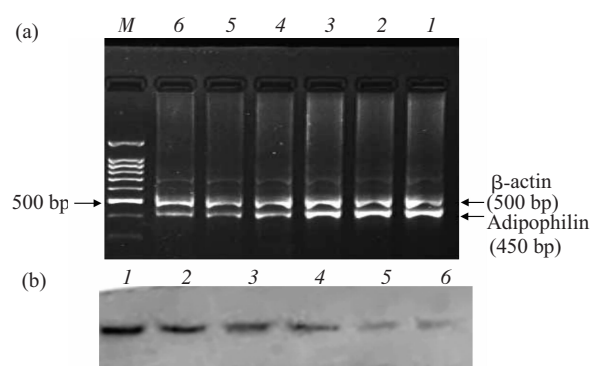


Fig. 6 Dose-dependent effect of Calphostin C on adipophilin expression in oxLDL-loaded THP-1 macrophage

(a) RT-PCR analysis of adipophilin gene expression. (b) Western blot analysis for adipophilin. 1: 50 mg/L oxLDL + 10 μ l DMSO; 2: 50 mg/L oxLDL + 25 nmol/L Calphostin C; 3: 50 mg/L oxLDL + 50 nmol/L Calphostin C; 4: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L Calphostin C; 5: 50 mg/L oxLDL + 200 nmol/L Calphostin C; 6: 50 mg/L oxLDL + 400 nmol/L Calphostin C. M: 100 bp DNA ladder.

2.4 PMA和Calphostin C对荷脂THP-1巨噬细胞PPAR γ 表达的影响

在转录起始阶段, adipophilin PPRE是功能性PPAR的结合位点, 能够被PPAR γ_1 、PPAR γ_2 结合并调控人adipophilin基因的表达. 那么, PKC活性变化对adipophilin介导脂质蓄积的影响机制中是否也有核转录因子PPAR γ “这座桥梁”的参与? 对荷脂THP-1巨噬细胞给予PMA和Calphostin C处理后, RT-PCR和蛋白质印迹的结果均显示(图7): PMA与oxLDL协同增强对PPAR γ 的上调效应, 而300 nmol/L Calphostin C则可以逆转oxLDL对PPAR γ 的上调效应. 而且Calphostin C对PPAR γ 的下调效应呈浓度依赖性的方式(图8). 这种变化趋势与PKC活性对adipophilin的作用趋势相一致. 结果显示, 巨噬细胞PPAR γ 表达的高低可能不仅仅是一种伴随现象, 而很有可能是PKC活性的变化调控了PPAR γ 的表达, 亦即PMA或Calphostin C改变了PKC活性, 而PKC活性的变化又调控了核转录因子PPAR γ 对其靶基因adipophilin表达.

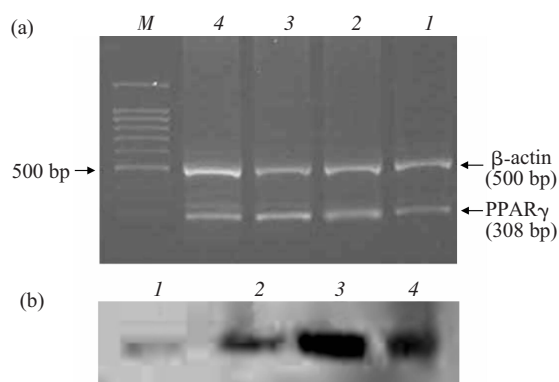


Fig. 7 Effects of PMA and Calphostin C on PPAR γ expression in THP-1 macrophage

(a) RT-PCR analysis of PPAR γ gene expression. (b) Western blot analysis for PPAR γ . 1: 10 μ l DMSO (solvent control); 2: 10 μ l DMSO (solvent) + 50 mg/L oxLDL; 3: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L PMA; 4: 50 mg/L oxLDL + 300 nmol/L Calphostin C. M: 100 bp DNA ladder.

2.5 PMA和Calphostin C对荷脂THP-1巨噬细胞PKC α 表达的影响

PKC活性的变化影响了adipophilin介导的脂质蓄积, 但PMA和Calphostin C在这一作用通路中究竟是影响了PKC的哪一个亚型进而影响下游的脂质调控机制呢? 对胞膜蛋白的蛋白质印迹分析显示(图9): 50 mg/L oxLDL可以上调THP-1巨噬细胞胞膜PKC α 蛋白表达, PMA则显著协同地增强了这种上调蛋白的效应. 300 nmol/L Calphostin C可逆转

oxLDL对PKC α 的上调效应, 与溶媒对照组产生了显著的统计学差异, 亦即300 nmol/L Calphostin C对巨噬细胞的处理可以使PKC α 的表达下降至基础水平以下. 给予荷脂巨噬细胞以Calphostin C浓度梯度处理, 可以呈浓度依赖性地下调PKC α 蛋白的表达, 这一变化趋势同Calphostin C对PPAR γ 和adipophilin的影响相一致. 这提示PKC的激动剂PMA和抑制剂Calphostin C可以有效地影响 α 亚型PKC从胞浆到胞膜的转位, 进而开启下游脂质调控的级联反应.

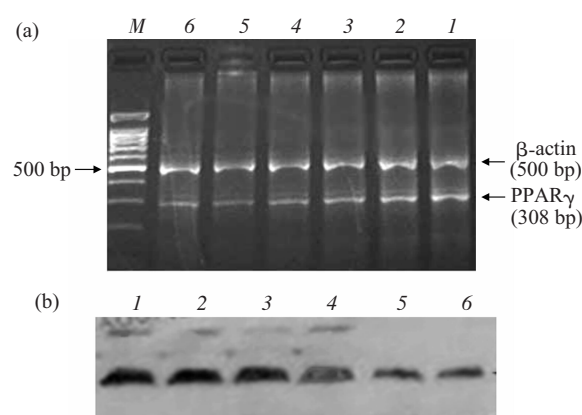


Fig. 8 Dose-dependent effect of Calphostin C on PPAR γ expression in oxLDL-loaded THP-1 macrophage

(a) RT-PCR analysis of PPAR γ gene expression. (b) Western blot analysis for PPAR γ . 1: 50 mg/L oxLDL + 10 μ l DMSO; 2: 50 mg/L oxLDL + 25 nmol/L Calphostin C; 3: 50 mg/L oxLDL + 50 nmol/L Calphostin C; 4: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L Calphostin C; 5: 50 mg/L oxLDL + 200 nmol/L Calphostin C; 6: 50 mg/L oxLDL + 400 nmol/L Calphostin C. M: 100 bp DNA ladder.

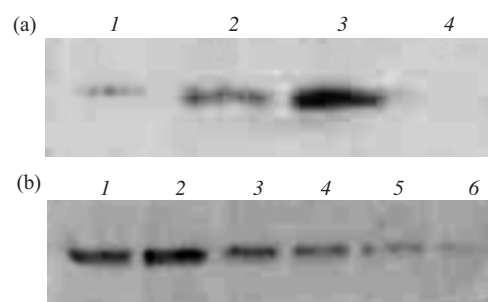


Fig. 9 Effects of PMA and Calphostin C on PKC α expression in THP-1 macrophage measured by Western blot

(a) 1: 10 μ l DMSO (solvent control); 2: 10 μ l DMSO (solvent) + 50 mg/L oxLDL; 3: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L PMA; 4: 50 mg/L oxLDL + 300 nmol/L Calphostin C. (b) 1: 50 mg/L oxLDL + 10 μ l DMSO; 2: 50 mg/L oxLDL + 25 nmol/L Calphostin C; 3: 50 mg/L oxLDL + 50 nmol/L Calphostin C; 4: 50 mg/L oxLDL + 100 nmol/L Calphostin C; 5: 50 mg/L oxLDL + 200 nmol/L Calphostin C; 6: 50 mg/L oxLDL + 400 nmol/L Calphostin C.

3 讨 论

蛋白激酶C (protein kinase C, 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递质. 根据同工酶的结构、酶的特性、激活剂的不同等将其分为4大类13个亚型^[9]. 其中, PKC_α属钙依赖的经典PKC, 激活时需依赖于Ca²⁺, 甘油二酯(diglyceride, DAG)和磷脂酰丝氨酸的存在, 在动脉粥样硬化内膜增厚部位表达上调. 外源性化合物佛波酯(PMA)可以模拟DAG的这种效应. 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. 作为一种上游激酶, PKC可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, 已有的研究显示, 对PKC活性的影响可改变细胞胆固醇的内流和外排, 这可能是近来PKC在动脉粥样硬化研究领域倍受关注的一个重要原因. 本研究显示, PKC的激动剂PMA对PKC活性的影响促进了细胞内脂质的蓄积, 提升了细胞内胆固醇酯和胆固醇(CE/TC)的比值, 而抑制剂Calphostin C (Calphostin C是从*Cladosporium chadosporioides*分离出来的具多醌结构的化合物, 作用部位是PKC调节区的佛波酯结合位点, 抑制作用不受磷脂酰丝氨酸和Ca²⁺浓度的影响. 已于2005年5月应用于乳腺癌等多药耐药性的临床治疗) 则减少细胞内脂质的蓄积, 降低细胞内CE/TC的比值, 逆转泡沫细胞的形成. 那么PKC活性对细胞内脂质蓄积的调控机制如何呢?

在真核细胞脂质的蓄积主要以脂滴的形式存在于胞浆, adipophilin就是脂滴外周单分子磷脂层上镶嵌的一种不完全包被蛋白, 又称脂肪分化相关蛋白(adipose differentiation-related protein, ADRP, ADFP), 属脂滴周围蛋白PAT(perilipin, adipophilin and TIP47)家族中的一员^[10]. 多项研究均显示: adipophilin促进细胞中脂质的蓄积(主要是胆固醇酯和胆固醇), 抑制胆固醇的外流^[4,11,12], 可作为动脉粥样硬化等脂质蓄积性疾病的一个敏感标记物^[12,13], 下调或封闭adipophilin基因的表达有可能为动脉粥样硬化性疾病的防治带来新的契机^[14,15]. 那么PKC活性的变化与adipophilin的表达有没有调控与被调控的关系, 由于PKC活性变化所影响的那部分细胞内脂质蓄积是否就是adipophilin所介导的? 现有的资料尚无法做出满意的回答. 为此, 本研究采用了PMA和Calphostin C处理荷载50 mg/L oxLDL的

巨噬细胞, RT-PCR和蛋白质印迹检测的结果显示, 100 nmol/L PMA可以协同增强oxLDL对adipophilin表达的上调效应, 而300 nmol/L Calphostin C可逆转由oxLDL引起的上调效应. 为进一步探索adipophilin介导脂质蓄积的调控机制并为筛选有效低毒可逆转泡沫细胞的药物奠定相关基础, 又设置了Calphostin C的梯度处理, 观察adipophilin基因和蛋白的表达, 实验结果显示, Calphostin C呈浓度依赖性的方式下调adipophilin的表达, 这一变化趋势与PKC活性对细胞内脂质蓄积的影响趋势相一致. 因此可以认为PMA与Calphostin C所引起的THP-1巨噬细胞脂质蓄积就是由adipophilin所介导的.

已有研究显示, adipophilin基因的功能性PPRE位于该基因的5'侧区-2 361到-2 345 bp处^[9]. 在转录起始阶段adipophilin PPRE是功能性过氧化物酶体增殖物激活受体PPAR的结合位点, 能够被核受体PPAR_{γ1}、PPAR_{γ2}结合并调控人adipophilin基因的表达^[9]. PPAR与RXR形成异源二聚体后还需要结合转录共激活物(peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein, PBP)才能发挥转录活性^[9]. 联合应用体内外检测及PBP磷酸化位点突变检测技术, 共鉴定出了PBP的3个PKC磷酸化位点^[9]. 配体化核受体通过与靶基因启动子区的特异性DNA序列相互作用、募集多余的转录共激活物, 从而以细胞和基因特异性的方式来调控基因的表达模式, 参与一些关键的脂质代谢调控过程. 本课题的研究结果基本印证了这一理论, PKC活性的变化可能先影响了核转录因子PPAR_γ, 而PPAR_γ又调控了其靶基因adipophilin所介导的巨噬细胞脂质蓄积. 但这与Chen等^[16]的研究结果相矛盾. Chen等的研究显示, 300 nmol/L Calphostin C可使荷脂RAW264.7巨噬细胞adipophilin的表达增加, 细胞内脂滴增大增多. 产生这种矛盾的具体分子机制尚不甚清楚, 有可能是Calphostin C在鼠源性的RAW264.7巨噬细胞和人源性的THP-1巨噬细胞的作用机制不尽一致造成的, 即种属不同造成了作用性质的不同; 而且就已有的分子生物学研究成果来说, 本课题的研究能更好地说明PKC信号转导途径可能是通过PBP上的磷酸化位点或者直接通过对核受体超家族PPAR的磷酸化修饰, 达到调控adipophilin转录和翻译的目的. 已有的PPAR_γ和adipophilin相关性研究也显示PPAR_γ的活化, 能够显著增强adipophilin启动子区转录活性并上调adipophilin在相关细胞的表达^[17,18], 因此, 可

以认为PMA和Calphostin C对PKC活性的调节首先作用于核内的转录因子PPAR γ , PPAR γ 被磷酸化激活后进一步再在转录水平上调adipophilin的表达及其所介导的脂质蓄积。

已有的其他研究还显示, oxLDL通过胞膜CD36和SRA等清道夫受体被细胞摄取, 经过溶酶体、高尔基体和内质网等细胞内代谢过程后, 超出细胞利用能力之外的那部分胆固醇酯则被adipophilin所包裹, 形成细胞内的脂质池——脂滴。随着细胞内脂滴的融合和蓄积, 当胆固醇酯/总胆固醇比值超过50%这一临界值即成为泡沫细胞。综合本课题相关结果, 总结为如图10所示THP-1巨噬细胞PKC活性改变影响adipophilin介导脂质蓄积的示意图。

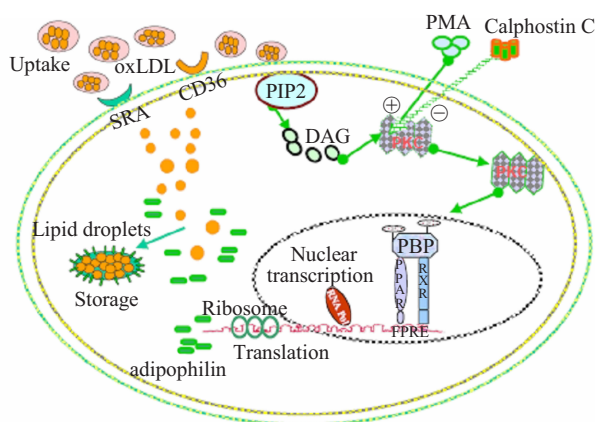


Fig. 10 Schematic diagram of oxLDL-PKC-PPAR-adipophilin-lipid accumulation pathway in THP-1 macrophage

本工作比较系统地研究了PKC活性变化对adipophilin介导脂质蓄积的影响机制, 检测到了PPAR γ 在PKC与adipophilin介导脂质蓄积之间的“桥梁”性调控作用, 实验结果表明, oxLDL-PKC-PPAR γ -adipophilin通路可能是adipophilin介导脂质蓄积的一个调控途径。在进一步的研究中, 如果能够针对 oxLDL $\rightarrow$ PKC α $\rightarrow$ PPAR γ $\rightarrow$ adipophilin $\rightarrow$ lipid accumulation这一调控通路上的相应靶标, 设计一些小分子的简单化合物如进一步修饰Calphostin C的化学结构, 使之能够特异性地作用于PKC的某一亚型的某一磷酸化位点, 有可能会为逆转泡沫细胞的形成和防治动脉粥样硬化的发生带来新契机。

参 考 文 献

1 杨永宗, 阮长耿, 唐朝枢, 等. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临

床. 北京: 科学出版社, 2004. 51~52

Yang Y Z, Ruan C G, Tang C S, *et al.* Atherosclerotic cardiovascular diseases-basic and clinic. Beijing: Science Press, 2004. 51~52

2 Liu P S, Ying Y S, Zhao Y M, *et al.* Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem*, 2004, **279** (5): 3787~3792

3 Kumi T S, Shintaro O, Toshiaki H, *et al.* The surface of lipid droplets is a phospholipids monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem*, 2002, **277** (46): 44507~44512

4 Larigauderie G, Furman C, Jaye M, *et al.* Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 504~510

5 Tachibana K, Kobayashi Y, Tanaka T, *et al.* Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms. *Nucl Recept*, 2005, **3** (3): 1~17

6 Misra P, Owuor E D, Li W, *et al.* Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002, **277** (50): 48745~48754

7 Yuan Z H, Yang Y Z, Yin W D, *et al.* Adipophilin antisense oligonucleotides decreased ACAT activity. *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (10): 930~935

8 王佐, 李全忠, 杨向东, 等. 高效液相色谱分析氧化型低密度脂蛋白处理的U937细胞内胆固醇及胆固醇酯. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 317~320

Wang Z, Li Q Z, Yang X D, *et al.* *Chin J Arterioscler*, 1998, **6** (4): 317~320

9 Parker P J, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*, 2004, **117** (2): 131~132

10 Robenek H, Robenek M J, Troyer D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res*, 2005, **46**: 1331~1338

11 Yuan Z H, Yang Y Z, Yin W D, *et al.* Induced expression of adipophilin with high cholesterol diet in rabbit atherosclerotic lesions and reduced lipid accumulation with adipophilin antisense in mouse macrophages. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 549~554

袁中华, 杨永宗, 尹卫东, 等. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30** (4): 549~554

12 Wang X K, Reape T J, Li X, *et al.* Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Lett*, 1999, **462** (1~2): 145~150

13 Buechler C, Ritter M, Duong C Q, *et al.* Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1532** (1~2): 97~104

14 Dobie K W. New antisense oligonucleotide compounds, useful for diagnosing, preventing and/or treating diseases or conditions

- associated with aberrant expression or activity of adipophilin, such as atherosclerosis. US patent, US2004110291-A1, 2004-06-10
- 15 Larigauderie G. Selection of compounds that modulate efflux of cholesterol, useful for treating e.g. atherosclerosis, from their ability to modulate activity of adipophilin. France patent, FR2847266-A1, 2004-05-21
 - 16 Chen J S, Greenberg A S, Tseng Y Z, *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 Cell Biochem*, 2001, **83** (2): 187~199
 - 17 Bildirici I, Schaiff W T, Roh C-R, *et al.* The lipid-associated protein adipophilin is expressed in primary human trophoblasts, and regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor- γ /retinoid X receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**: 6056~6062
 - 18 Emmelie J, Alexandra A, Gediminas G, *et al.* The Wnt/ β -catenin signaling pathway targets PPAR γ activity in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (5): 1460~1465

Effects of PKC Activity on Lipid-accumulation Mediated by Adipophilin in THP-1 Macrophage*

WANG Zhong-Qun^{1,2)}, YANG Yong-Zong¹⁾, WANG Zuo¹⁾, REN Zhong¹⁾, TANG Chao-Ke¹⁾,
LIU Lu-Shan¹⁾, YI Guang-Hui¹⁾, YUAN Zhong-Hua^{1)**}

¹⁾*Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China;*

²⁾*Department of Pathology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)*

Abstract Several methods, including PepTag[®] Assay, RT-PCR, Western blot, oil red staining and HPLC, were used to explore the role of PKC in lipid-accumulation mediated by adipophilin in THP-1 macrophage treated with PKC activator PMA and inhibitor Calphostin C. 100 nmol/L PMA activated cytomembrane PKC activity ((0.2514 $\pm$ 0.0154) U/ml), also synergistically enhanced the expressions of PKC α , PPAR γ and adipophilin and the lipid-accumulation in the presence of oxLDL. Together with oxLDL, PMA stimulated the ratio of intracellular CE/TC to (69.8 $\pm$ 9.5) %. 300 nmol/L Calphostin C inhibited cytomembrane PKC activity((0.0927 $\pm$ 0.0056) U/ml) of lipid-loaded THP-1 macrophage, reduced intracellular lipid droplets and the ratio of intracellular CE/TC ((40.1 $\pm$ 9.1) %). Calphostin C downregulated the PKC activity and the expressions of PKC α , PPAR γ and adipophilin in a dose-dependent manner. 400 nmol/L Calphostin C ultimately reverse the effect induced by 50 mg/L oxLDL. In conclusion, the changes of PKC activity can have effects on the lipid-accumulation mediated by adipophilin, PPAR γ may play an important role in the regulation mechanism.

Key words oxidized low density lipoprotein, PKC activity, PPAR γ , adipophilin, lipid-droplet, atherosclerosis

*This work was supported by grants from The Nature Science Foundation of Hunan Province (05JJ40039) and The Healthy Office Foundation of Hunan Province (B20042082).

** Corresponding author. Tel: 86-734-8281311, Fax: 86-734-8282232, E-mail: yzh5555 @163. com

Received: January 29, 2007 Accepted: March 7, 2007