

载脂蛋白 A- I 通过 PKA 信号途径影响 ABCA1 的表达与功能*

杨峻浩^{1)**} 代小艳^{1)**} 欧翔¹⁾ 郝新瑞¹⁾ 曹冬黎¹⁾ 姜志胜¹⁾
刘录山¹⁾ 王佐¹⁾ 易光辉¹⁾ 危当恒¹⁾ 王贵学^{2)***} 唐朝克^{1,2)***}

(¹⁾南华大学心血管病研究所, 衡阳 421001; (²⁾重庆大学生物工程学院, 重庆 400444)

摘要 以 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞为研究对象, 观察载脂蛋白 A- I 与三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)的相互作用, 并探讨它们相互作用的机制, 以便了解载脂蛋白 A- I 和 ABCA1 在动脉粥样硬化发生发展中的作用. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经各种因素处理后, 采用油红“O”染色, 观察细胞内的脂滴, 运用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出, 高效液相色谱分析细胞内总胆固醇、游离胆固醇和胆固醇酯含量, 用逆转录-聚合酶链反应和蛋白质印迹分析法分别检测 ABCA1 mRNA 与 ABCA1 蛋白质的水平. 实验结果显示, 载脂蛋白 A- I 和腺苷酸环化酶激动剂 Forskolin(FRK)引起 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯减少, 而腺苷酸环化酶抑制剂 SQ-22536 引起 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯增加. 载脂蛋白 A- I 引起 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质水平和细胞内胆固醇流出增加. FRK 引起 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质水平和细胞内胆固醇流出呈时间和浓度依赖性增加. SQ-22536 引起 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质水平和细胞内胆固醇流出减少. 结果提示, 载脂蛋白 A- I 可提高 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质水平, 增加细胞内胆固醇流出, 降低细胞内胆固醇聚积. 其机制可能是通过 PKA 信号途径使细胞 ABCA1 蛋白质水平增加.

关键词 载脂蛋白 A- I, 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1), PKA 途径, 动脉粥样硬化, 逆向胆固醇转运
学科分类号 R363

三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)可以促进细胞内胆固醇和磷脂流出, 这一过程对高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的生成起关键作用^[1]. ABCA1 基因突变可引起丹吉尔病(Tangier disease, TD)和家族性 HDL 缺乏症, 患者细胞内胆固醇和磷脂不能被转运到细胞外, 导致贫脂新生 HDL 含量极低, 因此, ABCA1 在胆固醇逆向转运中起重要作用^[2]. ABCA1 和 HDL 通过参与胆固醇逆向转运, 起到防止动脉粥样硬化性血管疾病发生的作用^[3,4].

ABCA1 含量在转录水平和转录后水平受到高度调控. 环磷酸腺苷(cyclic AMP, cAMP)、胆固醇负荷、反式维甲酸、过氧化物酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) α 和 PPAR γ 激动剂可诱导 ABCA1 转录^[5,6]. 氧化固醇活化肝 X 受体(liver X receptor, LXR)后

也可诱导 ABCA1 转录, 而干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)抑制 ABCA1 转录^[7]. 特异性的蛋白酶, 不饱和脂肪酸, 胞内胆固醇的细胞毒作用可以降解 ABCA1 蛋白, 而载脂蛋白 A- I (apolipoprotein A- I, apoA- I)可以稳定 ABCA1 蛋白^[8,9].

在成纤维细胞中, cAMP 对 ABCA1 的磷酸化和 apo A- I 介导的细胞脂质流出起重要作用. 蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)调控 ABC 类转运蛋白、纤维囊性跨膜调节体、P-糖蛋白的磷酸化, 从而调节它们的功能. 许多激酶与细胞脂质流出有关, 包括促有丝分裂蛋白激酶和 PKC. PKC 抑制剂能明显减少载脂蛋白介导的胆固醇流出, 而蛋白激

*国家自然科学基金(30470720), 中国博士后科学基金(2005037157)和湖南省自然科学基金(06jj5058)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel: 0734-8281297, Fax: 0734-8282938

E-mail: tchaoke@yahoo.com.cn, wanggx@cqu.edu.cn

收稿日期: 2006-12-05, 接受日期: 2007-01-31

酶激动剂如 1,2- 二脂酰甘油和佛波酯增加细胞内胆固醇流出. ABCA1 介导细胞内胆固醇流出与 apoA- I 结合、吸收、再分泌相关联^[10]. 实验显示, ABCA1 磷酸化后被激活, 使 apoA- I 荷脂, 在这一过程中 PKC 信号途径起一定作用^[10].

但 PKA 信号途径在 apoA- I 与 ABCA1 相互作用中是否起重要作用尚未完全阐明. 我们假设

apoA- I 与 ABCA1 结合之后通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶(adenyl cyclase, AC)使 cAMP 增多, 继而激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA), 影响 ABCA1 表达和功能(图 1). 本文应用 AC 激动剂(forskolin, FRK)和抑制剂(SQ-22536)来探讨 apoA- I 是否通过 PKA 途径影响 ABCA1 表达和功能.

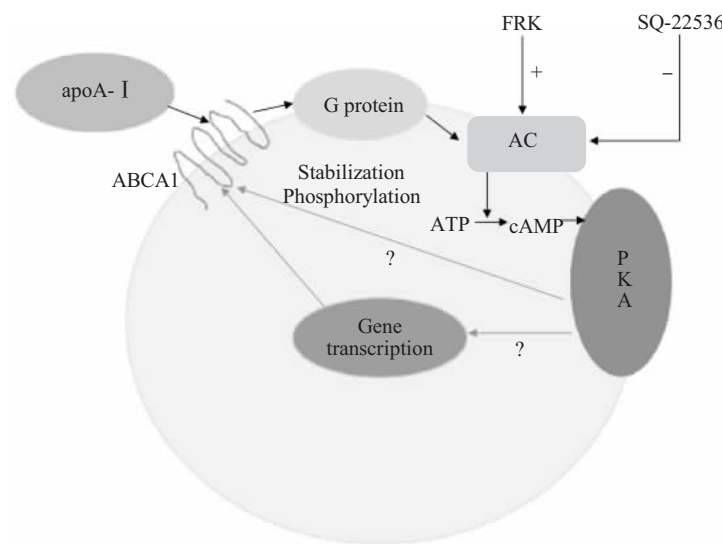


Fig. 1 Mechanism of interaction between apoA- I and ABCA1

1 材料与方方法

1.1 材料与试剂

200型高效液相色谱仪(PE 公司); CP100MX 超速离心机(Tokyo 公司); FJ-2107P 液体闪烁计数器(国营二六二厂); THP-1 细胞购于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞中心; HEPES 购自北京利科生化有限公司; 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、³H]胆固醇、FRK 和 SQ-22536 购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂盒购自美国 Gibco 公司; Reverse Transcription System 购自美国 Promega 公司; PCR 反应试剂盒购自 Fermentas 公司; 100 bp DNA Ladder 购自 Fermentas 公司; ABCA1 兔抗人一抗购自 Novus 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; 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; PVDF 膜购自 Gelman 公司; BCA 蛋白含量测定试剂购自 Hyclone-Pierce 公司; β -ACTIN 鼠抗人一抗购自武汉博士德公司; 蛋白质印迹荧光检测试剂盒购自北京中杉金桥公司; apoA- I 购自 Fluka Biochemika

公司. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

参照文献[11]的方法制备低密度脂蛋白, 新鲜人血浆购自衡阳市血站. 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, 首先 8℃, 42 000 r/min 离心 18 h, 用吸管小心吸出漂浮于离心管上层的乳白色液体及次层淡黄色液体. 收集离心管下层液体, 加入固体溴化钾使最终密度为 1.063 g/L, 再次超速离心, 于 8℃, 42 000 r/min 离心 20 h, 用吸管小心吸出离心管上层的橙黄色液体即低密度脂蛋白(LDL). 提纯的 LDL 在含 200 μ mol/L EDTA 的磷酸缓冲液(PBS)液中透析 48 h, 用 BCA 法进行蛋白质定量, 过滤除菌, 4℃保存.

在氧化前, 先将 LDL 置于无 EDTA 的 PBS 液中 4℃透析 24 h, 以除去 EDTA. 将 LDL 置于含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 溶液中, 于 37℃氧化 20 h. 氧化修饰后的 LDL(oxLDL)置于含 200 μ mol/L EDTA 的 PBS 中, 4℃透析 24 h, 每 8 h 更换一次 PBS, 以终止氧化. 过滤除菌, BCA 试剂蛋白质定量, 调蛋白质浓度至 1 g/L, 4℃保存备用.

1.3 细胞培养

THP-1 细胞生长于含有 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 37°C、5% CO₂ 培养箱中静置培养. 培养液中加 10 mmol/L HEPES、1.0 × 10⁵ U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素. 取对数生长期细胞进行实验, 在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞, 更换培养基后加 ox-LDL 和各项处理因素.

1.4 油红“O”染色

将细胞培养于放有消毒盖玻片的 6 孔培养板内, 细胞被处理后, 用 PBS 洗 3 次, 50% 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色液染色 10 min, 苏木素染色 5 min, 1% HCl 分色及返蓝后, 水性封片剂封片. 显微镜下观察, 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显微镜下摄像.

1.5 胆固醇流出实验

胆固醇流出检测时参照文献[12]的方法进行. THP-1 细胞在含有 7 400 Bq/ml [³H] 胆固醇和 50 mg/L ox-LDL 的 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液中孵育, 待细胞长至 85% 时, 用 PBS 液洗涤细胞, 在无血清 RPMI-1640 培养液中加入各项处理因素, 再用此培养液孵育细胞至实验结束, PBS 液洗涤细胞, 闪烁液裂解细胞后, 用闪烁计数法检测培养液和细胞中的 [³H] 胆固醇. 胆固醇流出率用培养液中 cpm 除以总 cpm (培养液 cpm + 细胞 cpm), 再乘以 100% 来表示.

1.6 高效液相色谱分析

参照文献[7]方法, 待细胞处理结束后, 弃培养基, PBS 洗 3 遍, 加入细胞裂解液 200 μl, 反复冻融 3 次裂解细胞, BCA 法定量蛋白质后, 7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白质, 800 g 离心 10 min, 取上清进行胆固醇检测, 以豆甾醇为内标. 取 100 μl 上清液, 加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μl, 水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇检测样品. 各样品分别与内标液混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100 μl 乙腈 - 异丙醇 (80 : 20) 溶解样品, 上样于高效液相色谱仪. 采用 C-18 柱, 柱温 4°C, 流速 1 ml/min, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以 mg/g 细胞蛋白为单位.

1.7 逆转录聚合酶链反应

收集各组细胞. 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA. 取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA,

再取逆转录产物 10 μl 进行 PCR 循环, 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 复性 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72°C 延伸 10 min. 人 ABCA1 引物序列: 上游 5' GATTGGCTTCAGGATGTCCATGTTGGAA 3', 下游 5' GTATTTTGTCAAGGCTACCAGTTACATTTGACAA 3', PCR 扩增产物长度为 177 bp. GAPDH 的引物序列: 上游 5' TCACCATCTTCCAGGAGC-GAG 3', 下游 5' TGTCGCTGTTG AAGTCAGAG 3', PCR 扩增产物长度为 697 bp. 反应结束后, 取反应产物 10 μl 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄图, 并分析各组扩增产物及 GAPDH 片段灰度值, 以二者的比值代表 ABCA1 mRNA 表达的变化.

1.8 蛋白质印迹

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 于悬浮缓冲液中裂解后, 4°C, 10 000 g 离心 10 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量. 取提取的蛋白质样品 (20 μg 总蛋白量 / 泳道) 加入适量 4× 上样缓冲液和 10% β- 巯基乙醇, 100°C 煮 10 min, 6% 或 10% SDS-PAGE (积层胶 80 V, 分离胶 120 V) 后用恒定电流转移 (100 mA 1 h 或 60 mA 2 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, 加入 1 : 500 ABCA1 一抗或者 1 : 400 β-ACTIN 一抗 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 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 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 用蛋白质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, 并分析各组 ABCA1 及 β-ACTIN 蛋白条带的灰度值, 以二者的比值代表 ABCA1 蛋白质表达的变化.

1.9 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析及 *t* 检验, 用 SPSS 12.0 统计软件进行分析, *P* < 0.05 为差异有显著性意义.

2 结 果

2.1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫化

用 50 mg/L ox-LDL 与 THP-1 巨噬细胞共同孵育 48 h 后, 经油红 O 染色, 显微镜下观察, 细胞浆内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特点 (图 2).

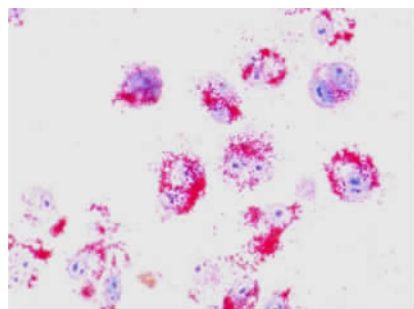


Fig. 2 Oil red O staining of THP-1 macrophage-derived foam cells (× 40)

2.2 ApoA- I、FRK、SQ-22536 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞内胆固醇及胆固醇酯含量的影响

10 mg/L apoA- I、40 μmol/L FRK、100 μmol/L SQ-22536 单独或联合处理 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 24 h 后, 采用高效液相色谱法检测细胞内胆固醇与胆固醇酯的含量. ApoA- I 或 FRK 处理细胞后, 细胞内胆固醇与胆固醇酯含量比对照组细胞明显减少; 两者同时应用, 减少胞内胆固醇与胆固醇酯含量更加明显; 与对照组相比较, 用 apoA- I 和 SQ-22536 联合处理细胞, 结果显示细胞内胆固醇与胆固醇酯含量明显增多, 如表 1 所示.

Table 1 Effect of apoA- I, FRK, and SQ-22536 on the levels of cholesterol and cholesterol ester in THP-1 macrophage-derived foam cells

Index	Control	ApoA- I	FRK	ApoA- I + FRK	ApoA- I + SQ-22536
TC (mg/g)	501 ± 50	412 ± 42 ¹⁾	408 ± 41 ¹⁾	350 ± 36 ^{1,2)}	601 ± 59 ¹⁾
FC (mg/g)	208 ± 23	177 ± 17 ¹⁾	175 ± 16 ¹⁾	151 ± 13 ^{1,2)}	237 ± 26 ¹⁾
CE (mg/g)	293 ± 29	235 ± 27 ¹⁾	233 ± 26 ¹⁾	199 ± 26 ^{1,2)}	364 ± 34 ¹⁾
CE/TC (%)	58.5	57.0	57.1	56.9	60.6

TC: Total cholesterol, FC: Free cholesterol, CE: Cholesterol ester. ¹⁾P < 0.05, vs control group, ²⁾P < 0.05, vs apoA- I group and FRK group respectively.

2.3 ApoA- I、FRK、SQ-22536 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响

用 160 nmol/L 的 PMA 诱导 THP-1 细胞 24 h, 使其贴壁并转化为巨噬细胞, 然后更换培养基, 用含有 50 mg/L ox-LDL 和 7 400 Bq/ml [³H]胆固醇的培养基孵育细胞 48 h, 再次更换培养基并加入各种处理因素继续培养细胞至实验结束, 使用液体闪烁计数器检测胆固醇流出. 结果显示, 对照组、apoA- I 组、FRK 组、apoA- I + FRK 组和 apoA- I + SQ-22536 组的胆固醇流出分别是 (8.64 ± 0.83)%、

(9.8 ± 0.93)%、(10.15 ± 0.98)%、(11.72 ± 1.1)%、(6.77 ± 0.7)%、apoA- I 组、FRK 组、apoA- I + FRK 组胆固醇流出明显地高于对照组, 而 apoA- I + SQ-22536 组胆固醇流出明显地低于对照组, 如图 3 所示. 经 apoA- I 和 FRK 处理, 细胞内胆固醇流出呈浓度依赖性和时间依赖性增加, 如表 2 和图 4、5 所示. 经 SQ-22536 处理, 细胞内胆固醇流出呈浓度依赖性和时间依赖性减少, 如表 2 和图 6 所示.

Table 2 Effect of apoA- I, FRK, SQ-22536 on cholesterol efflux from THP-1 macrophage-derived foam cells in a time-dependent manner

	0 h	6 h	12 h	24 h	BSA(24h)
ApoA- I (%)	8.24 ± 0.98	8.31 ± 0.84	9.84 ± 1.21 ¹⁾	13.35 ± 1.48 ¹⁾	8.34 ± 0.92
FRK (%)	8.32 ± 0.96	8.35 ± 0.89	11.32 ± 1.26 ¹⁾	13.47 ± 1.51 ¹⁾	8.36 ± 1.07
SQ-22536 (%)	8.26 ± 0.85	8.12 ± 0.82	6.75 ± 0.74 ¹⁾	4.69 ± 0.43 ¹⁾	8.35 ± 0.88

Cells treated with 10 mg/L apoA- I or 40 μmol/L FRK or 100 μmol/L SQ-22536 for 0, 6, 12, or 24 h or BSA for 24 h. ¹⁾P < 0.05, vs 0 h group and BSA group.

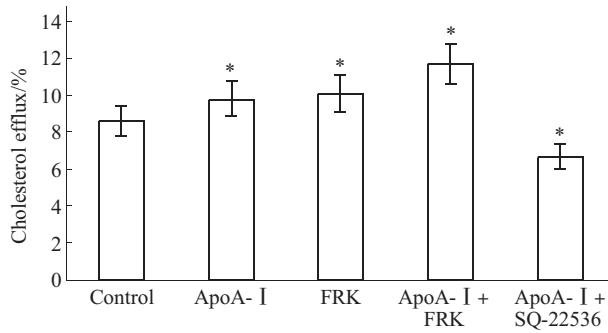


Fig. 3 Effect of apoA- I , FRK, SQ-22536 on cholesterol efflux from THP-1 macrophage-derived foam cells

Control: Cells under normal condition; ApoA- I : Cells treated with 10 mg/L apoA- I for 24 h; FRK: Cells treated with 40 μ mol/L FRK for 24 h; ApoA- I + FRK: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 40 μ mol/L FRK for 24 h; ApoA- I + SQ22536: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 100 μ mol/L SQ-22536 for 24 h. * $P < 0.05$, vs control group.

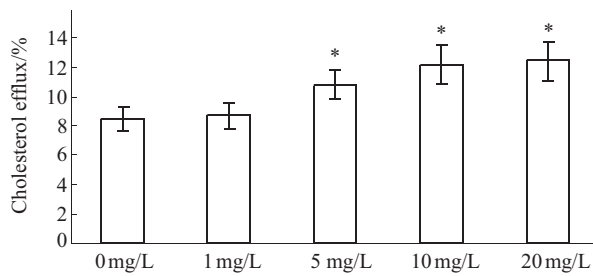


Fig. 4 Effect of apoA- I on cholesterol efflux from THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 0, 1, 5, 10, or 20 mg/L apoA- I for 24 h. * $P < 0.05$, vs 0 mg/L group.

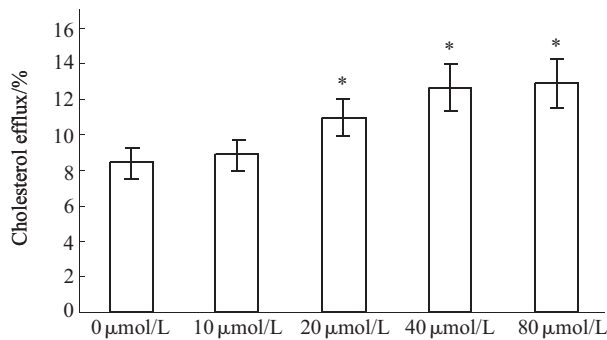


Fig. 5 Effect of FRK on cholesterol efflux from THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 0, 10, 20, 40, or 80 μ mol/L FRK for 24 h. * $P < 0.05$, vs 0 μ mol/L group.

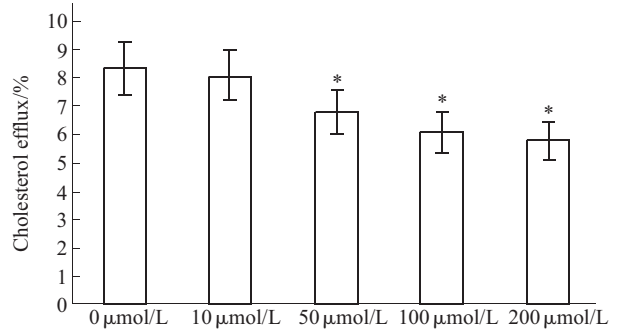


Fig. 6 Effect of SQ-22536 on cholesterol efflux from THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 0, 10, 50, 100, or 200 μ mol/L SQ-22536 for 24 h. * $P < 0.05$, vs 0 μ mol/L group.

2.4 ApoA- I 、FRK、SQ-22536 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 mRNA 表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 apoA- I 、FRK、SQ-22536 处理后, 提取细胞总 RNA, 采用逆转录聚合酶链反应检测 ABCA1 的 mRNA 表达. 结果显示, apoA- I 、FRK、SQ-22536 不论是单独还是联合作用于细胞, 都不影响 ABCA1 的 mRNA 的表达, 如图 7 所示. 用不同浓度 apoA- I 处理细胞 24 h, 或者用 apoA- I 与细胞孵育不同的时间, 也不影响 ABCA1 mRNA 的表达, 如图 8 和图 9 所示.

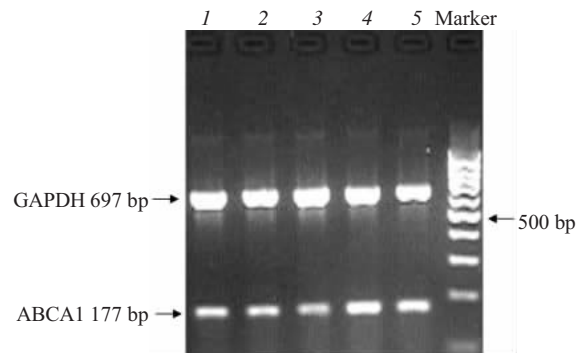


Fig. 7 Effect of apoA- I , FRK, SQ-22536 on ABCA1 mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

1: Control, 2: ApoA- I , 3: ApoA- I + FRK, 4: FRK, 5: ApoA- I + SQ-22536. Control: Cells under normal condition; apoA- I : Cells treated with 10 mg/L apoA- I for 24 h; apoA- I + FRK: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 40 μ mol/L FRK for 24 h; FRK: Cells treated with 40 μ mol/L FRK for 24 h; apoA- I + SQ22536: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 100 μ mol/L SQ-22536 for 24 h.

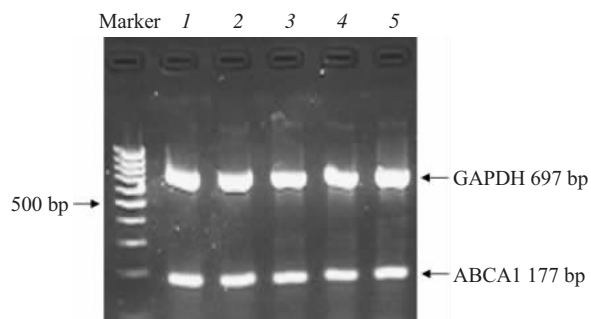


Fig. 8 Effect of FRK on ABCA1 mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 0, 10, 20, 40, or 80 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 24 h. 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$.

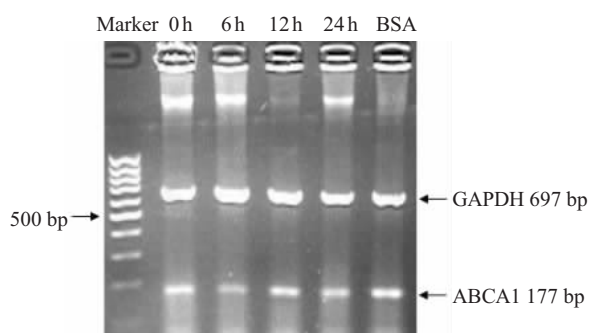


Fig. 9 Effect of FRK on ABCA1 mRNA expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 0, 6, 12, or 24 h or 40 $\mu\text{mol/L}$ BSA for 24 h.

2.5 ApoA- I、FRK、SQ-22536 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 apoA- I、FRK、SQ-22536 处理后, 提取细胞总蛋白质, 采用蛋白质印迹分析法检测细胞 ABCA1 蛋白质含量. 结果显示: 用 apoA- I 和 FRK 分别处理细胞 24 h 后, 处理组 ABCA1 的蛋白质量比对照组细胞分别增加了 26.7%和 33.3% ($P < 0.05$); apoA- I 和 FRK 共同孵育细胞 24 h 后, 细胞 ABCA1 的蛋白质增加 80% ($P < 0.05$), 而用 apoA- I 和 SQ-22536 共同孵育细胞 24 h 后, ABCA1 的蛋白质量比对照组细胞减少 26.7% ($P < 0.05$). 用不同浓度 FRK 处理细胞 24 h 后, 细胞 ABCA1 的蛋白质量随 FRK 浓度增高而增加, 用 FRK 与细胞孵育不同时间后, 细胞 ABCA1 的蛋白质量随孵育时间延长而增加, 结果如图 10~12 所示.

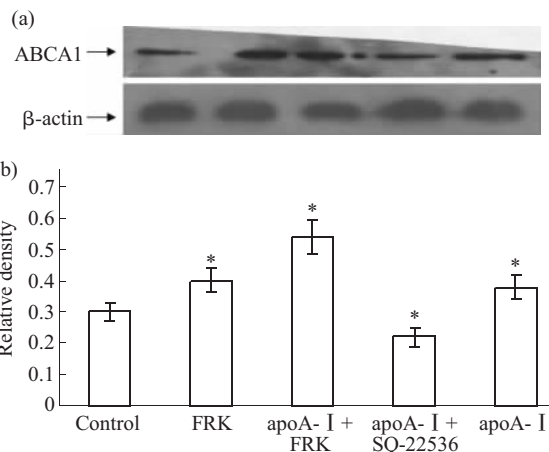


Fig. 10 Effect of apoA- I, FRK, SQ-22536 on ABCA1 protein expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

Control: Cells under normal condition; FRK: Cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 24 h; ApoA- I + FRK: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 40 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 24 h; ApoA- I + SQ22536: Cells treated with 10 mg/L apoA- I and 100 $\mu\text{mol/L}$ SQ-22536 for 24 h; ApoA- I: cells treated with 10 mg/L apoA- I for 24 h. The details of experiments are described in **Materials and methods**. All protein levels were assessed by densitometry with β -actin as a control. (a) ABCA1 protein was analyzed by Western blotting. (b) Statistical graph of ABCA1 protein levels. * $P < 0.05$, vs control group.

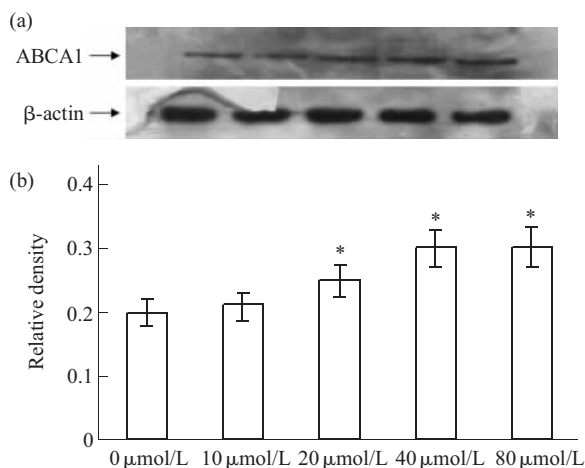


Fig. 11 Effect of FRK on ABCA1 protein expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 0, 10, 20, 40, or 80 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 24 h. The details of experiments are described in **Materials and methods**. All protein levels were assessed by densitometry with β -actin as a control. (a) ABCA1 protein was analyzed by Western blotting. (b) Statistical graph of ABCA1 protein levels. * $P < 0.05$, vs 0 $\mu\text{mol/L}$.

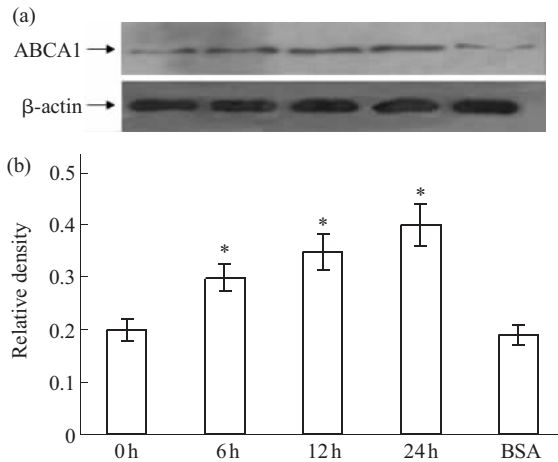


Fig. 12 Effect of FRK on ABCA1 protein expression in THP-1 macrophage-derived foam cells

Cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ FRK for 0, 6, 12, or 24 h or 40 $\mu\text{mol/L}$ BSA for 24 h. The details of experiments are described in **Materials and methods**. All protein levels were assessed by densitometry with β -actin as a control. (a) ABCA1 protein was analyzed by Western blotting. (b) Statistical graph of ABCA1 protein levels. * $P < 0.05$, vs 0 h group and BSA group.

3 讨 论

ABCA1在转录水平和转录后水平都受到调节,但目前普遍认为转录后水平调节占主导地位.在无 apoA- I 和 ABCA1 诱导剂情况下, ABCA1 mRNA 和蛋白质的半衰期只有 1~2 h^[13, 14]. ABCA1 的快速降解是由于它的第一个细胞内环上的 1 283~1 306 位氨基酸含大量脯-谷-丝-苏氨酸序列(PEST 序). T1286~T1305 中的这个模序被磷酸化后, ABCA1 被一种尚未确定的钙依赖性蛋白酶降解^[10]. ApoA- I 与成纤维细胞相互作用可以明显减少 ABCA1 降解^[15, 16].本研究在 THP-1 源性泡沫细胞上得出的实验结果与上述在成纤维细胞上得到的结果相一致.用 apoA- I 处理细胞后,采用蛋白质印迹分析法检测 ABCA1 蛋白质水平,结果显示用 apoA- I 处理的细胞, ABCA1 蛋白质水平明显高于对照组细胞.然而用 FRK 和 apoA- I 处理细胞,虽然 ABCA1 蛋白质水平增加,但是 ABCA1 mRNA 水平未见增加;用 apoA- I 与 SQ-22536 同时处理细胞, apoA- I 的影响被 SQ-22536 阻断, ABCA1 蛋白质水平甚至低于对照组细胞, ABCA1 mRNA 同样没有明显变化.

不仅稳定 ABCA1 蛋白质需要 apoA- I, 而且要使 ABCA1 途径保持较佳的功能状态,同样也需

要有充足的 apoA- I (脂质接受体)供应^[17].只有 apoA- I 结合于细胞上时, ABCA1 才能把胆固醇和磷脂传递给 apoA- I, 继而生成 HDL^[1].只有贫脂 apoA- I 才能与 ABCA1 结合,并相互作用,生成 HDL^[17].在 HDL 中的载脂蛋白主要是 apoA- I, 占 HDL 总蛋白质含量的 70%左右^[18].以前的大量细胞实验也证实, apoA- I 是 ABCA1 途径的主要脂质接受体. ApoA- I 与 ABCA1 的结合具有饱和性、高亲和性温度敏感性和可逆性等特点.本文用 apoA- I 处理 THP-1 源性泡沫细胞,结果显示用 apoA- I 处理过的细胞内脂质蓄积程度比对照组细胞明显减轻,胆固醇流出比对照组细胞明显增加.这些结果表明, apoA- I 与 ABCA1 相互作用可以增强细胞 ABCA1 的脂质流出功能.

ApoA- I 与细胞的相互作用可以引起跨膜信号转导,从而介导脂质通过 ABCA1 转运到细胞外,这一过程涉及多个信号转导通路,现在研究得比较多的是 cAMP/PKA 途径, JAK2 途径和 PKC 途径^[19]. Tall 等^[20]最近的研究证明,用 apoA- I 短时间(≥ 1 h)处理细胞后引起 ABCA1 的 PEST 序列去磷酸化,从而抑制钙蛋白酶对其降解,最终导致细胞表面 ABCA1 含量增高,活性增强.他们认为 apoA- I 可以使 ABCA1 向膜上的 PKA 位点靠近, PKA 使 ABCA1 上的某些位点氨基酸磷酸化,脂质外流活性增强,使 PEST 序列去磷酸化,稳定性增加.我们的实验用 apoA- I 处理 THP-1 源性巨噬细胞较长时间(24 h),结果表明,与对照组细胞相比, ABCA1 蛋白质水平明显增加,细胞内脂质的蓄积减轻,胆固醇及其酯的含量减少,胆固醇流出明显增加.用 FRK 处理细胞,得出了相似的实验结果,并呈时间和浓度依赖性.用 apoA- I 与 SQ-22536 联合处理细胞, ABCA1 蛋白质水平比对照组细胞减少,细胞内脂质的蓄积增多,胆固醇及其酯的含量增加,胆固醇流出明显减少.实验结果说明, FRK 间接激活 PKA 后,可以产生与 apoA- I 相同的效应; SQ-22536 间接抑制 PKA 后,可以阻断 apoA- I 对细胞的作用.因此我们认为 apoA- I 要与 ABCA1 产生相互作用, PKA 信号转导通路是其中一条重要的途径.

我们的结果提示,载脂蛋白 A- I 可提高 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 蛋白质水平,增加细胞内胆固醇流出,降低细胞内胆固醇聚积,但对 ABCA1 mRNA 几乎没有影响.其机制可能是激活了 PKA 信号途径.本文为寻找 ABCA1 途

径的最佳治疗靶点提供了一定的研究基础。

参 考 文 献

- 1 Denis M, Haidar B, Marcil M, *et al.* Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, 2004, **279** (40): 41529~41536
- 2 Singaraja R R, Fievat C, Castro G, *et al.* Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest*, 2002, **110** (1): 35~42
- 3 Oram J F. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*, 2002, **13** (4): 373~381
- 4 Brunham L R, Kruit J K, Iqbal J, *et al.* Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis *in vivo*. *J Clin Invest*, 2006, **116** (4): 1052~1062
- 5 Chawla A, Boisvert W A, Lee C H, *et al.* A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, 2001, **7** (1): 161~171
- 6 唐朝克, 席守民, 尹卫东, 等. 糖尿病小型猪三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达的变化. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(6): 543~549
Tang C K, Xi S M, Yin W D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (6): 543~549
- 7 唐朝克, 易光辉, 王佐, 等. 干扰素- γ 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出和 ABCA1 表达的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (2): 127~133
Tang C K, Yi G H, Wang Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (2): 127~133
- 8 Tang C K, Tang G H, Yi G H, *et al.* Effect of apolipoprotein A- I on ATP binding cassette transporter A1 degradation and cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, **36** (3): 218~226
- 9 Duong P T, Collins H L, Nickel M, *et al.* Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA- I. *J Lipid Res*, 2006, **47** (4): 832~843
- 10 Takahashi Y, Smith J D. Cholesterol efflux to apolipoprotein A I involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (20): 11358~11363
- 11 唐朝克, 杨峻浩, 易光辉, 等. 油酸对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 表达和胆固醇流出的影响. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35** (12): 1077~1082
Tang C K, Yang J H, Yi G H, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (12): 1077~1082
- 12 唐朝克, 贺修胜, 易光辉, 等. 肝 X 受体 α 在泡沫细胞胆固醇流出中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (6): 940~944
Tang C K, He X S, Yi G H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (6): 940~944
- 13 Wellington C L, Walker E K, Suarez A, *et al.* ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*, 2002, **82** (3): 273~283
- 14 Peng D Q, Wu Z, Brubaker G, *et al.* Tyrosine modification is not required for myeloperoxidase-induced loss of apolipoprotein A- I functional activities. *J Biol Chem*, 2005, **280** (40): 33775~33784
- 15 Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, *et al.* ApoA- I activates PKC α signaling to phosphorylate and stabilize ABCA1 for the HDL assembly. *J Biol Chem*, 2003, **278** (48): 47890~47897
- 16 Haidar B, Denis M, Marcil M, *et al.* Apolipoprotein A- I activates cellular cAMP signaling through the ABCA1 transporter. *J Biol Chem*, 2004, **279** (11): 9963~9969
- 17 Fitzgerald M L, Morris A L, Chroni A, *et al.* ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res*, 2004, **45** (2): 287~294
- 18 Matsuyama A, Sakai N, Hiraoka H, *et al.* Cell surface-expressed moesin-like HDL/apoA-I binding protein promotes cholesterol efflux from human macrophages. *J Lipid Res*, 2006, **47** (1): 78~86
- 19 Boadu E, Choi H Y, Lee D W, *et al.* Correction of apolipoprotein A-I-mediated lipid efflux and high density lipoprotein particle formation in human Niemann-Pick type C disease fibroblasts. *J Biol Chem*, 2006, **281** (48): 37081~37090
- 20 Chen W, Wang N, Tall A R, *et al.* A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes. *J Biol Chem*, 2005, **280** (32): 29277~29281

Effect of Apolipoprotein A- I on Expression and Function of ATP-binding Cassette Transporter A1 Through PKA Signaling*

YANG Jun-Hao^{1)**}, DAI Xiao-Yan^{1)**}, OU Xiang¹⁾, HAO Xin-Rui¹⁾, CAO Dong-Li¹⁾, JIANG Zhi-Sheng¹⁾,
LIU Lu-Shan¹⁾, WANG Zuo¹⁾, YI Guang-Hui¹⁾, WEI Dang-Heng¹⁾, WANG Gui-Xue^{2)***}, TANG Chao-Ke^{1,2)***}

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

²⁾College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) plays a crucial role in apoA- I binding activity and promotes cellular cholesterol efflux. In order to investigate the effect of interaction between apoA- I and ABCA1 on atherosclerosis, and to discover the mechanism of interaction between apoA- I and ABCA1, THP-1 cells were induced to become the macrophages by the phorbol. Then THP-1 macrophages were induced to the foam cells by ox-LDL. Treatment of THP-1 macrophage derived foam cells with apoA- I, forskolin (FRK, an adenylyl cyclase activator), and SQ-22536 (an adenylyl cyclase inhibitor) for long periods of time (24 h). In addition, THP-1 macrophage derived foam cells were treated with increasing amounts of FRK (0, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$) and treated with FRK for increasing time (0, 6, 12 and 24 h). Cholesterol efflux, ABCA1 mRNA and protein level were determined by FJ-2107P type liquid scintillator, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and Western blotting, respectively. Cellular lipid accumulation was determined by Oil Red O staining and high performance liquid chromatography analysis. The cholesterol efflux of control group, apoA- I group, FRK group, apoA- I + FRK group and apoA- I + SQ-22536 group was $(8.64 \pm 0.83)\%$, $(9.8 \pm 0.93)\%$, $(10.15 \pm 0.98)\%$, $(11.72 \pm 1.1)\%$, and $(6.77 \pm 0.7)\%$, respectively. ApoA- I resulted in a 26.7% increase in protein expression of ABCA1, and a 14.0% increase in cholesterol efflux from THP-1 macrophage derived foam cells ($P < 0.05$). The similar results have been observed in foam cells treated with FRK. ApoA- I, in combination with FRK, contributed to a much larger increase in protein expression of ABCA1 (80%, $P < 0.05$) and cholesterol efflux (36%, $P < 0.05$) from THP-1 macrophage derived foam cells. In converse, treatment THP-1 macrophage derived foam cells with apoA- I and SQ-22536 markedly down-regulated protein expression of ABCA1 (26.7%, $P < 0.05$) and decreased cholesterol efflux (22.1%, $P < 0.05$). However, apoA- I, FRK and SQ-22536 alone or combination did not influence mRNA expression of ABCA1. These findings suggest that apoA- I may stabilize ABCA1 protein, and then increase cellular cholesterol efflux through PKA signaling.

Key words apolipoprotein A- I (apoA- I), ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), PKA pathway, atherosclerosis, reverse cholesterol transport

*This work was supported by the grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30470720), Post-doctor Sciences Foundation of China (2005037157) and Hunan Provincial Natural Sciences Foundation of China (06jj5058).

**YANG Jun-Hao and DAI Xiao-Yan contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-734-8281297, Fax: 86-734-8282938, E-mail: tchaoko@yahoo.com.cn, wanggx@cqu.edu.cn

Received: December 1, 2006 Accepted: January 31, 2007