

脂多糖通过核因子- κ B 途径下调 泡沫细胞 ATP 结合盒转运体 A1 的表达*

曹冬黎^{1, 2)**} 尹凯^{1)**} 莫中成¹⁾ 郝新瑞¹⁾ 胡炎伟¹⁾ 李晓旭¹⁾ 唐雅玲¹⁾ 唐朝克^{1)***}

¹⁾南华大学心血管病研究所, 动脉硬化湖南省重点实验室, 生命科学研究中心, 衡阳 421001

²⁾安徽理工大学医学院生理学与病理学教研室, 淮南 232001

摘要 脂多糖(LPS)介导的免疫炎症反应与动脉粥样硬化(As)的发生密切相关, ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1)促进细胞内胆固醇流出, 具有抗 As 作用. 观察了 LPS 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响, 并探讨 TLR4/NF- κ B 信号途径和 LXR α 在此过程中的作用. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS 处理或者用 LPS 作用不同时间, 以 LPS 单独或用 NF- κ B 抑制剂对甲苯磺酰-L-苯丙氨酸氯甲基甲酮(TPCK)预处理细胞后再加入 LPS 处理. RT-PCR 检测 ABCA1、TLR4 和 LXR α mRNA 的表达, Western blot 检测 ABCA1、LXR α 及核内 NF- κ B p65 蛋白的表达, 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. 结果表明, LPS 呈浓度和时间依赖性抑制 ABCA1 的表达, 而增加 TLR4 mRNA 和核内 NF- κ B p65 蛋白的表达, LPS 使泡沫细胞内胆固醇流出减少, 细胞总胆固醇、游离胆固醇与胆固醇酯增加, TPCK 预处理后, LPS 的这种作用被部分抑制, LXR α 的表达不受 LPS 和 TPCK 的影响. 这一结果提示, 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, 而 LPS 对 ABCA1 表达的调控不通过 LXR α 途径.

关键词 ATP 结合盒转运体 A1, 脂多糖, NF- κ B, 肝 X 受体, 胆固醇流出

学科分类号 R363, R5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00738

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 可以作用于炎症和免疫细胞, 如巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞等^[1]. 研究表明, LPS 可介导细胞内胆固醇蓄积和泡沫细胞形成^[2-3], 从而促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的发生, 但其诱导胆固醇蓄积的机制不明. Toll 样受体(TLRs)与天然免疫应答和细胞对侵袭性病原体的反应相关, Toll 样受体 4(TLR4)是对 LPS 敏感的 TLRs 家族成员之一, 研究表明 As 斑块中 TLR4 的表达明显上调^[4-5]. 静息状态下, 核因子- κ B(nucleus factor- κ B, NF- κ B)在胞质中与其天然阻遏蛋白 I- κ B 结合, 处于无活性状态, LPS 与 TLR4 结合后可引起一系列连锁酶促反应, 激活 NF- κ B. NF- κ B 被激活后进入核内调节多种基因, 如多种细胞因子、某些黏附分子以及诱导性 NO 合酶等的表达, 参与炎症反应、免疫应答和氧化应激等, 与 As 的发生发展密切相关^[6]. 然而, LPS 通过 TLR4/NF- κ B 途径促 As 的作用是否与影响病变区胆固醇代谢有关, 目前并

不十分明确. ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)以 ATP 为能量, 促进细胞内脂质流出, 与 HDL 的形成和胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)密切相关^[7]. ABCA1 的表达和功能受到多种因素的调控, 实验组前期发现, 干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)通过 JAK/STAT 信号途径抑制肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α), 从而下调 ABCA1 表达和细胞内胆固醇流出^[8]. LXR α 是 ABCA1 的上游基因, 实验组前期发现, 激活 LXR α 可以上调 ABCA1 的表达, 从而减轻 apoE 基因敲除小鼠 As 的病变程度^[9]. LPS 是否通过 LXR α 影响 ABCA1

* 国家自然科学基金资助项目(30470720).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281853, E-mail: tchaoke@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-11, 接受日期: 2010-01-18

及其介导的细胞内胆固醇流出目前并不明确. 因此, 本研究观察 LPS 对 THP 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达的影响, 并探讨 TLR4/NF- κ B 信号途径和 LXR α 在此过程中的作用, 为进一步阐明 LPS 促 As 和胆固醇蓄积的作用提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心; 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; LPS 购自美国 Sigma 公司; TPCK 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 兔抗人一抗购自 Novus 公司; NF- κ B p65 兔抗人一抗购自美国 Santa Cruze 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; β -Actin 鼠抗人一抗购自武汉博士德公司; Western blot 荧光检测试剂盒购自北京中杉金桥公司; PVDF、硝酸纤维素膜(NC)购自 Millipore 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 胆固醇流出实验. 胆固醇流出检测参照文献[10]的方法进行, 用 PBS 液洗涤细胞, 置含脂蛋白的无血清 RPMI-1640 培养液中培养 24 h. PBS 液洗涤细胞, 闪烁液裂解细胞后, 用液体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.

1.2.2 高效液相色谱分析. 参照文献[11]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 μ l, 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 μ l 上清液, 加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μ l, 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 三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100 μ l 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 $^{\circ}$ 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.

1.2.3 逆转录聚合酶链反应. 参照试剂盒说明进

行. ABCA1 引物序列: 上游 5' GATTGGCTTC-AGGAT GTCCATGTTGGAA 3', 下游 5' GTAT-TTTTGCAAGGCTACCAGTTACATTTGACAA 3', PCR 扩增产物长度为 177 bp. 人 LXR α 引物序列: 上游 5' AGCGTCCACTCAGAGCA AGT 3', 下游 5' GGGGACAGAACAGTCATTTCG 3', PCR 扩增产物长度为 107 bp. 人 β -actin 的引物序列: 上游 5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG 3', 下游 5' TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG 3', PCR 扩增产物长度为 539 bp. 人 TLR4 的引物序列: 上游 5' TGG-ATACGTTT CCTATAAG 3', 下游 5' GAAATGG-AGGCACCCCTTC 3', PCR 扩增产物长度 507 bp; GAPDH 引物序列: 上游 5' TGATGACATCAA-GAAGGTGGTGAAG 3', 下游 5' TCCT TGGA-GGCCATGTGGGCCAT 3', PCR 扩增产物长度为 240 bp.

1.2.4 Western blot. 取提取的蛋白质样品加入适量 5 \times SDS 上样缓冲液和 10% β -巯基乙醇, 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 10% SDS-PAGE 后电转移至 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 ABCA1 一抗、1:500 LXR α 一抗、1:200 NF- κ B p65 一抗或者 1:2000 β -Actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 4~8 h, TBST 洗涤 30 min, 每 10 min 换液 1 次. 加入 1:1000 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 Western blot 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.

1.2.5 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 $P < 0.05$ 判定差异的显著性.

2 结 果

2.1 LPS 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的作用

2.1.1 不同浓度 LPS 对泡沫细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS (0, 0.2, 2, 20, 200 μ g/L) 处理, 用 RT-PCR 检测 ABCA1 mRNA 的表达. 如图 1 所示, LPS 剂量依赖性减少 ABCA1 mRNA 的表达, LPS 浓度为 0.2 μ g/L 时, ABCA1 mRNA 的表达开始减少.

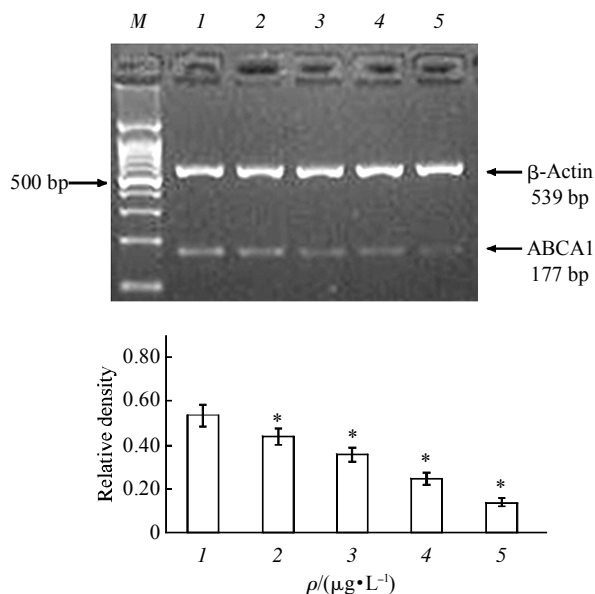


Fig. 1 The mRNA expression of ABCA1 in foam cells treated with different concentrations of LPS

M: Marker; 1: 0 $\mu\text{g/L}$; 2: 0.2 $\mu\text{g/L}$; 3: 2 $\mu\text{g/L}$; 4: 20 $\mu\text{g/L}$; 5: 200 $\mu\text{g/L}$. * $P < 0.05$, compared with 0 $\mu\text{g/L}$ group, $n=3$.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS (0, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/L}$) 处理后, Western blot 法检测 ABCA1 蛋白质表达. 如图 2 所示, LPS 剂量依赖性减少 ABCA1 蛋白的表达, LPS 浓度为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 时就减少 ABCA1 蛋白的表达.

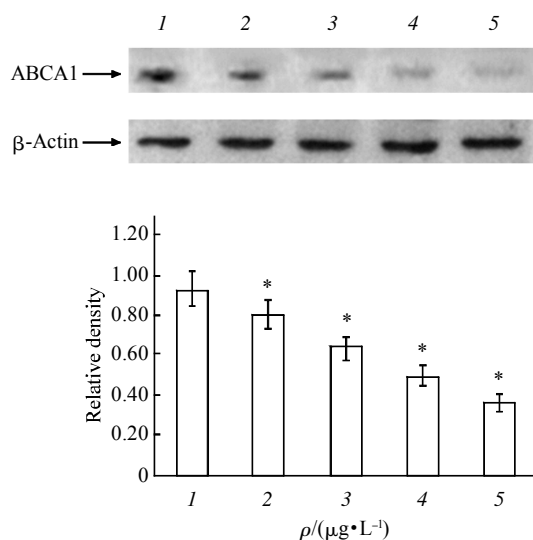


Fig. 2 The protein expression of ABCA1 in foam cells treated with different concentrations of LPS

1: 0 $\mu\text{g/L}$; 2: 0.2 $\mu\text{g/L}$; 3: 2 $\mu\text{g/L}$; 4: 20 $\mu\text{g/L}$; 5: 200 $\mu\text{g/L}$. * $P < 0.05$, compared with 0 $\mu\text{g/L}$ group, $n=3$.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS (0, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/L}$) 处理后, 用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出. 如图 3 所示, 细胞内胆固醇流出随 LPS 浓度增加逐渐降低, LPS 浓度为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 时就导致细胞内胆固醇流出减少.

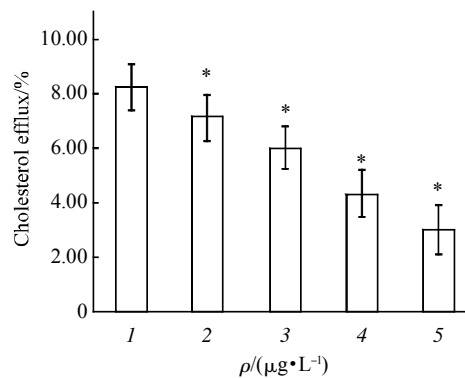


Fig. 3 Cholesterol efflux of foam cells treated with different concentrations of LPS

1: 0 $\mu\text{g/L}$; 2: 0.2 $\mu\text{g/L}$; 3: 2 $\mu\text{g/L}$; 4: 20 $\mu\text{g/L}$; 5: 200 $\mu\text{g/L}$. * $P < 0.05$, compared with 0 $\mu\text{g/L}$ group, $n=3$.

2.1.2 LPS 处理不同时间对泡沫细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 20 $\mu\text{g/L}$ LPS 处理不同时间(0, 6, 12, 24 h)和用 20 $\mu\text{g/L}$ BSA 处理 24 h 后, RT-PCR 检测 ABCA1 mRNA 的表达情况. 如图 4 所示, LPS 时间依赖性减少 ABCA1 mRNA

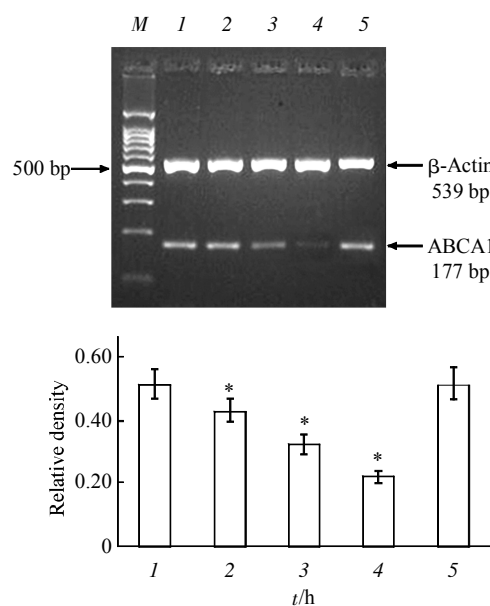


Fig. 4 The mRNA expression of ABCA1 in foam cells treated with 20 $\mu\text{g/L}$ LPS for different times

M: Marker; 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: BSA. * $P < 0.05$, compared with 0 h group, $n=3$.

的表达, 在 LPS 作用 6 h 就观察到 ABCA1 mRNA 的表达减少。

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 20 μ g/L LPS 处理不同时间(0, 6, 12, 24 h)和用 20 μ g/L BSA 处理 24 h 后, 提取细胞总蛋白, 采用 Western blot 检测 ABCA1 蛋白的表达情况。如图 5 所示, LPS 时间依赖性减少 ABCA1 蛋白的表达, 在 LPS 作用 6 h 就观察到 ABCA1 蛋白表达减少。

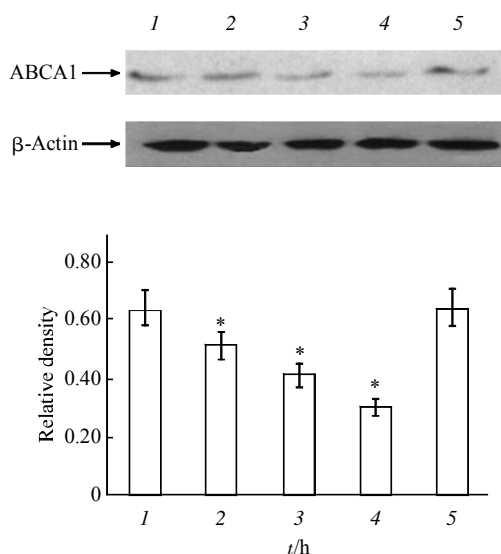


Fig. 5 The protein expression of ABCA1 in foam cells treated with 20 μ g/L LPS for different times

1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: BSA. * $P < 0.05$, compared with 0 h group, $n=3$.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 20 μ g/L LPS 处理不同时间(0, 6, 12, 24 h)和用 20 μ g/L BSA 处理 24 h 后, 用液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出。如图 6 所示, 细胞内胆固醇流出随 LPS 作用时间的增加逐渐降低。在 LPS 作用 6 h 就观察到细胞内胆固醇流出降低。

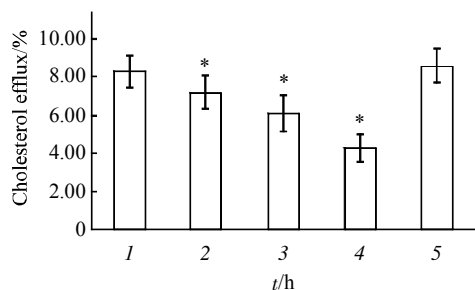


Fig. 6 Cholesterol efflux of foam cells treated with 20 μ g/L LPS for different times

1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: BSA. * $P < 0.05$, compared with 0 h group, $n=3$.

2.2 LPS 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 TLR4 mRNA 表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS (0, 0.2, 2, 20, 200 μ g/L)处理后, 提取细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达情况。如图 7 所示, LPS 诱导 TLR4 mRNA 表达增加, 呈剂量依赖性。

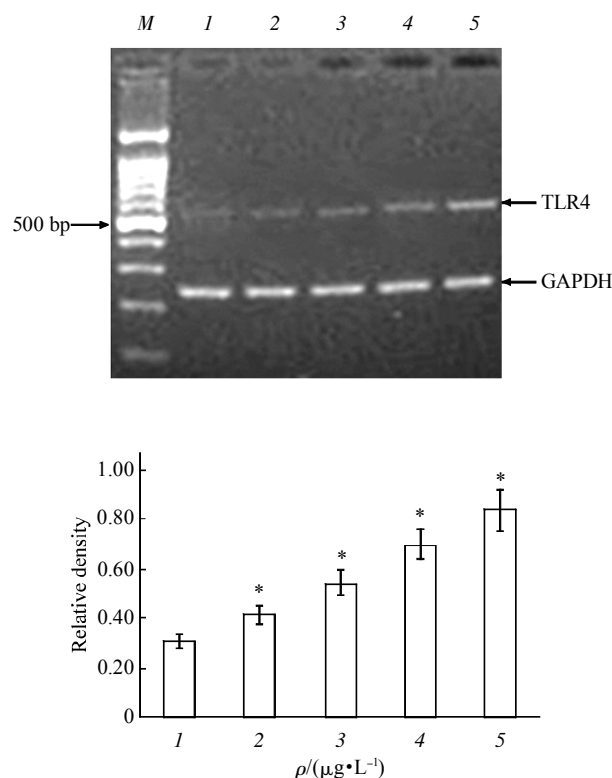


Fig. 7 The mRNA expression of TLR4 in foam cells treated with different concentrations of LPS

M: Marker; 1: 0 μ g/L; 2: 0.2 μ g/L; 3: 2 μ g/L; 4: 20 μ g/L; 5: 200 μ g/L. * $P < 0.05$, compared with 0 μ g/L group, $n=3$.

2.3 LPS 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞核内 NF- κ B p65 蛋白含量的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经不同浓度 LPS(0, 0.2, 2, 20, 200 μ g/L)处理后, 提取细胞核内总蛋白, 采用 Western blot 检测细胞核内 NF- κ B p65 蛋白的表达情况。如图 8 所示, LPS 诱导细胞核内 NF- κ B p65 蛋白表达增加, 呈剂量依赖性。

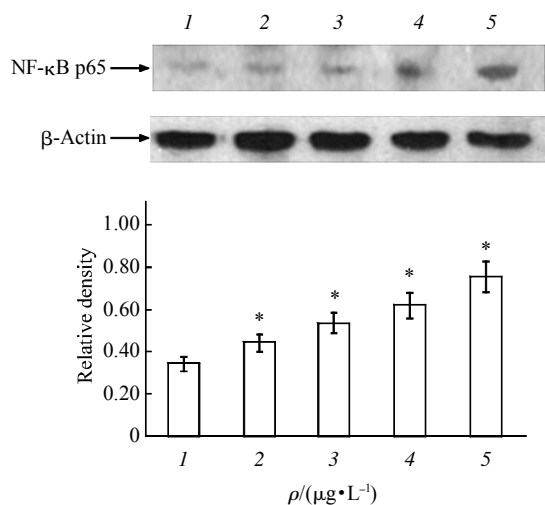


Fig. 8 The protein expression of NF-κB p65 in foam cells treated with different concentrations of LPS

1: 0 μg/L; 2: 0.2 μg/L; 3: 2 μg/L; 4: 20 μg/L; 5: 200 μg/L. **P* < 0.05, compared with 0 μg/L group, *n*=3.

2.4 NF-κB 途径介导 LPS 下调 ABCA1 的表达

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 LPS 和 NF-κB 途径抑制剂 TPCK 处理后, 提取细胞核内总蛋白, 采用 Western blot 检测细胞核内 NF-κB p65 蛋白含量. 如图 9 所示, 相对于对照组, LPS 明显增加核内 NF-κB p65 的蛋白质表达, TPCK 组和 TPCK 预处理后加入 LPS, 核内 NF-κB p65 蛋白含量与对照组相近.

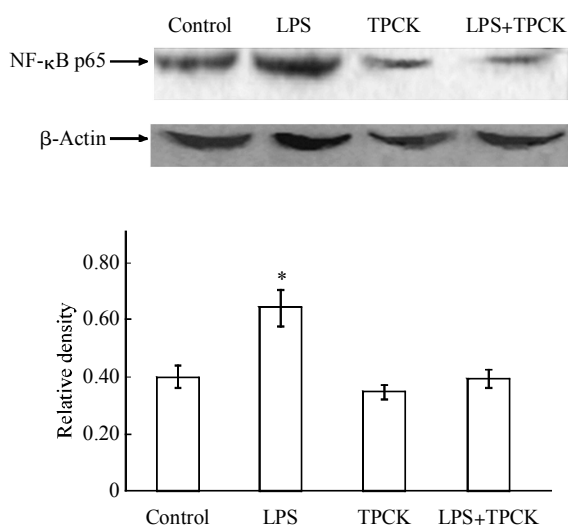


Fig. 9 Western-blot analysis of the protein of NF-κB p65 in foam cells treated with LPS and TPCK

**P* < 0.05, compared with control group, *n*=3.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 LPS 和 TPCK 处理后, 提取细胞总蛋白, Western blot 检测细胞 ABCA1 蛋白含量. 如图 10 所示, 相对于对照组, LPS 明显减少 ABCA1 蛋白的表达, TPCK 对 ABCA1 蛋白表达无明显影响, TPCK 预处理后加入 LPS, ABCA1 蛋白表达低于对照组但是高于 LPS 处理组.

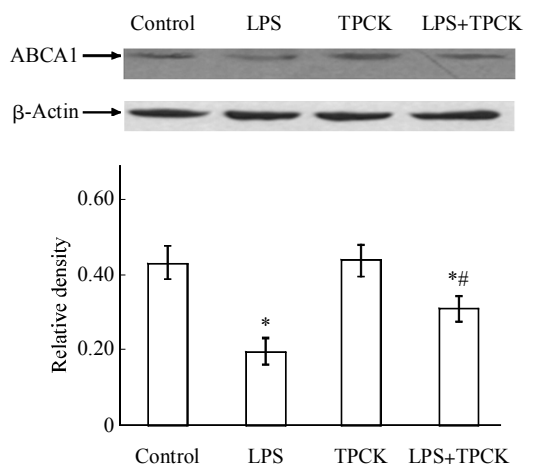


Fig. 10 Western-blot analysis of the protein of ABCA1 in foam cells treated with LPS and TPCK

**P* < 0.05, compared with control group; #*P* < 0.05, compared with LPS group.

按照实验分组处理 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞, 液体闪烁计数器检测细胞内胆固醇流出. 仅用 LPS 处理细胞, 细胞内胆固醇流出比对照组细胞明显减少; 用 TPCK 处理细胞, 细胞内胆固醇的流出无显著变化; TPCK 预处理细胞 2 h 再加入 LPS, 细胞内胆固醇流出低于对照组而高于 LPS 处理组. 结果提示 NF-κB 抑制剂可以部分减轻 LPS 对细胞内胆固醇流出的抑制作用, 如图 11 所示.

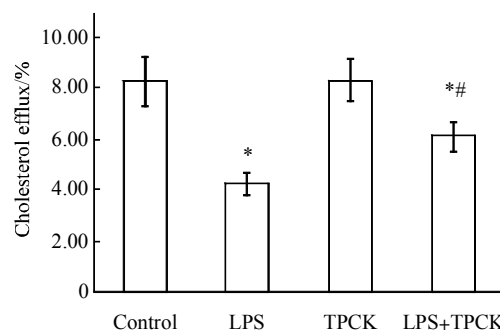


Fig. 11 Cholesterol efflux analysis of foam cells treated with LPS and TPCK

**P* < 0.05, compared with control group; #*P* < 0.05, compared with LPS group.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 LPS 和 TPCK 处理后, 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. 仅用 LPS 处理细胞, 细胞内胆固醇及胆固醇酯含量比对照组细胞明显增加; 用 TPCK 处理, 细胞内胆固醇及胆固醇酯的含量相对于对照组无显著变化; TPCK 预处理细胞 2 h 再加入 LPS, 使细胞内胆固醇及胆固醇酯含量低于对照组而高于 LPS 处理组. 结果提示, NF- κ B 抑制剂可以部分减轻 LPS 导致的细胞内胆固醇及胆固醇酯的蓄积, 如图 12 和表 1 所示.

Table 1 The effect of LPS and TPCK on the cholesterol and cholesterol ester concentration in foam cells

Index	Control	LPS	TPCK	TPCK+LPS
(TC)/(mg·g ⁻¹)	503 ± 51	612 ± 53*	506 ± 54	558 ± 52*#
(FC)/(mg·g ⁻¹)	208 ± 26	233 ± 30*	208 ± 27	220 ± 27*#
(CE)/(mg·g ⁻¹)	295 ± 29	379 ± 35*	298 ± 31	338 ± 34*#
(CE/TC)/%	58.65	61.93*	58.89	60.57*#

TC: Total cholesterol, FC: Free cholesterol, CE: Cholesterol ester.
* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with LPS group; $n=3$.

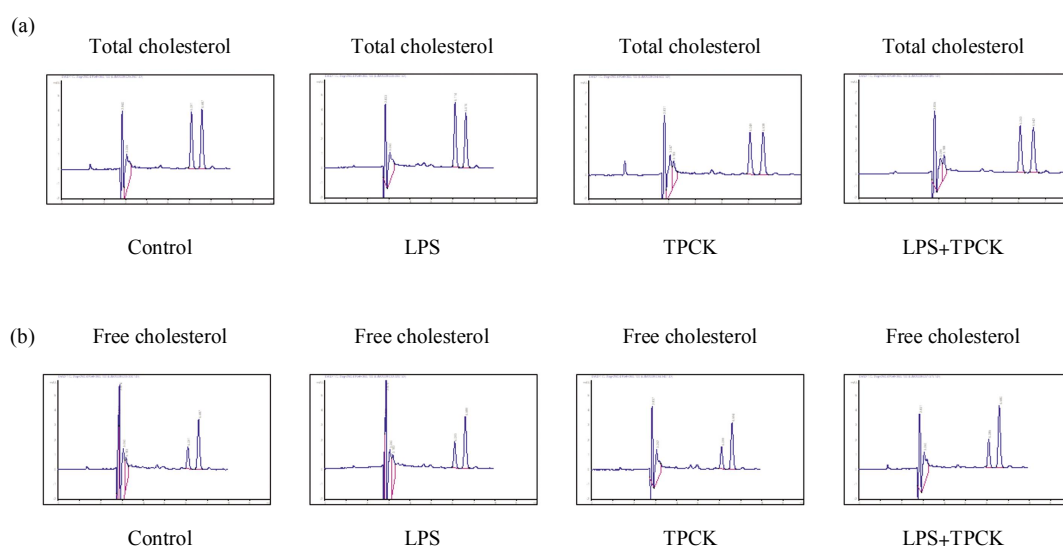


Fig. 12 High performance liquid chromatography analysis of lipid accumulation in foam cells treated with LPS and TPCK

(a) Total cholesterol; (b) Free cholesterol. $n=3$.

2.5 LPS、TPCK 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 LXR α 表达的影响

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 LPS 和 TPCK 处理后, 提取细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 方法检

测 LXR α mRNA 的表达. 如图 13 所示, 相对于对照组, LPS 和 TPCK 对 LXR α mRNA 无明显作用. 结果提示 LPS 抑制 ABCA1 的表达不依赖于 LXR α 途径.

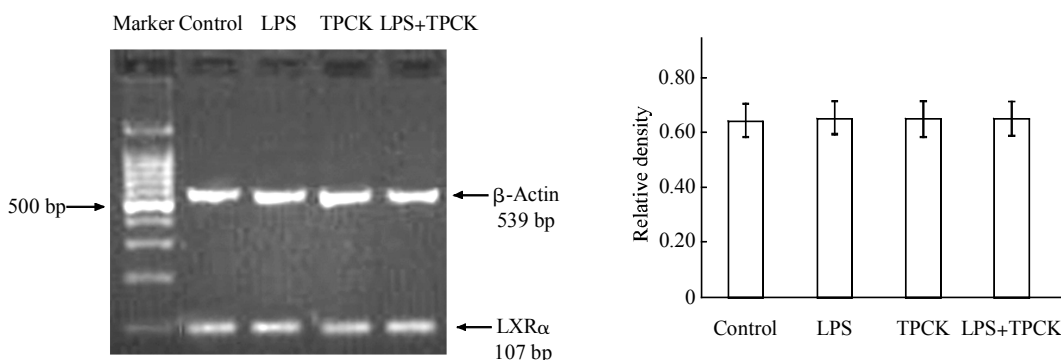


Fig. 13 The mRNA expression of LXR α in foam cells treated with LPS and TPCK

$n=3$.

THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞经 LPS 和 TPCK 处理后, 提取细胞总蛋白, 采用 Western blot 检测细胞 LXR α 蛋白含量. 如图 14 所示, 相对于对照组, LPS 和 TPCK 对 LXR α 蛋白无明显作用. 结果提示 LPS 抑制 ABCA1 的表达不依赖于 LXR α 途径.

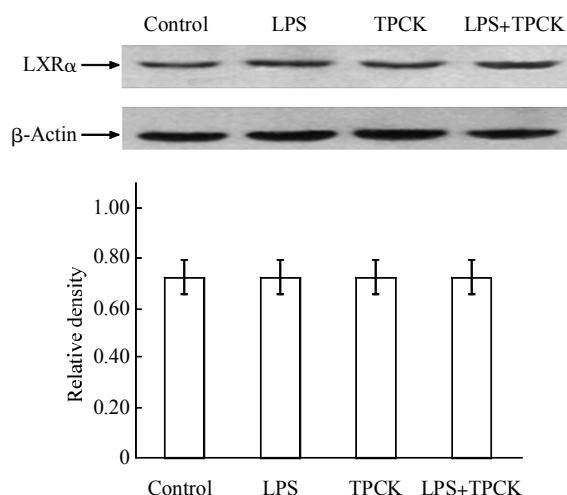


Fig. 14 The protein expression of LXR α in foam cells treated with LPS and TPCK

$n=3$.

3 讨 论

研究发现, 革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分 LPS 可以加速 As 斑块的形成, 其作用可能与促进血管壁泡沫细胞的形成有关^[12]. LPS 的主要有效成分是脂质 A, 本实验使用来源于大肠埃希菌的 LPS, 其 6- 酰基化脂质 A 可最大程度激活 Toll 样受体 4(TLR4)^[13], 而 TLR4 受体被认为是与人类 As 关系最为密切的 Toll 样受体之一^[14]. LPS 识别细胞膜上 TLR4 受体, 二者结合后通过经典途径、旁路途径和非典型途径激活 NF- κ B, NF- κ B 激活后迅速发生核转位, 引起多种炎症相关基因表达的变化. 而且, LPS/TLR4 信号途径通过增加单核巨噬细胞的募集和抑制细胞内脂质的流出对 As 的进展也起着重要作用^[14-15]. ABCA1 是介导细胞内游离胆固醇和磷脂流出至贫脂载脂蛋白接受体 apoA1 的关键转运蛋白, 对减少细胞内胆固醇蓄积起着关键的作用^[16-17]. 本实验选择 ABCA1 作为观察指标, 探讨 LPS 对 THP 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响及其分子机制, 对明确免疫炎症反应→RCT→As 三者之间的关系具有重要的意义. 实验

结果显示, LPS 在较低的剂量即可抑制 ABCA1 基因和蛋白质的表达, 并且这种抑制作用呈浓度和时间依赖性. 由于 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, 使得细胞内脂质大量蓄积, 从而加剧细胞的泡沫化程度, 这为 LPS 加速 As 的形成提供了一定的理论依据. ABCA1 的调节主要集中在转录水平和转录后水平, 涉及多种因素, 主要有核受体超家族、cAMP 和细胞因子 3 类. 核受体超家族包括 LXR、维甲酸 X 受体(RXR)、过氧化酶体增生物激活受体(PPAR)、孕烷 X 受体(PXR)和甲状腺激素受体(TR)等, 其中 LXR 的靶基因存在于整个脂质代谢途径的关键步骤中, 与 RXR 形成 LXR/RXR 异二聚体, 氧化固醇和反式维甲酸都可以单独活化此二聚体^[18]. LXR α /RXR 通过对众多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)、固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP1c)和胆固醇 7 α 羟化酶等^[19], 进而控制胆固醇代谢, 包括分解、储存、吸收、转运等多个环节, 在脂质代谢中发挥着关键的作用^[20]. 在本实验中, 细胞经 LPS 处理后, LXR α mRNA 表达无明显变化, 说明 LPS 对 LXR α 转录无抑制作用; 在加入 TPCK 后, LXR α mRNA 表达与对照组相似, 提示 NF- κ B 途径对细胞 LXR α 的表达无明显影响. 因此, 推测 LPS 对 ABCA1 表达的影响不依赖 LXR α 调控, 而与其他通过 TLR4/NF- κ B 信号途径下调 ABCA1 表达的机制有关, 或者 ABCA1 启动子上有 NF- κ B 特异性结合位点, 从而抑制 ABCA1 的基因转录. 有研究报道, 锌指蛋白 202 可与 ABCA1 基因启动子区域的 GC 盒结合, 通过失活启动子而抑制 ABCA1 基因的表达^[21]. LPS 作用细胞后, 激活的 NF- κ B 进入核内是否会引起锌指蛋白 202 或者其他抑制蛋白的过量表达, 进而抑制 ABCA1 的转录还有待进一步的研究.

本研究还发现, LPS 呈浓度和时间依赖性增加 TLR4 mRNA 和蛋白质的表达, 并使核内 NF- κ B p65 蛋白的含量增加, 提示 LPS 抑制泡沫细胞胆固醇流出及 ABCA1 的表达与 TLR4/NF- κ B 信号途径有关. 有研究报道, 用 LPS 处理细胞可上调 ABCA1 的表达, 其中 LPS 被细胞膜内吞后激活 P38MAPK 信号途径起着重要作用^[22]. Majdalawieh 等^[23]最近报道, LPS 通过脂肪细胞增强子结合蛋白 (adipocyte enhancer-binding protein, AEBP1)抑制巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出, 我们的实验结

果与 Majdalawieh 等的结果相一致, LPS 使 ABCA1 表达下调. 至于不同实验室的结果不同或相反, 其原因还有待于进一步探讨. 本实验结果还显示, 用 TPCK 预处理后再加入 LPS 处理细胞, 相对于仅加 LPS 组, ABCA1 mRNA 和蛋白质水平有所增加, 核内 NF- κ B p65 蛋白表达减少, 胆固醇流出增加, 但相对于对照组的 ABCA1 表达和胆固醇流出水平仍有降低, 提示 LPS 对 ABCA1 和 NF- κ B 的作用可被 TPCK 预处理抑制, 但不能被完全抑制. 因此, LPS 除了通过 TLR4/NF- κ B 信号途径外, 还存在其他的途径促进细胞内脂质的蓄积.

总之, 本研究进一步阐明了 LPS 在 As 形成与发展中的部分作用机理, 以及对泡沫细胞胆固醇蓄积的影响, 对于更深入地了解 As 的炎症免疫机制有着重要意义, 通过抑制 LPS/TLR4/NF- κ B 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 的防治提高了新的调控靶点.

参 考 文 献

- [1] Clarisse C P, Ludivine B, Eric B, *et al.* Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF- κ B inhibitor Acetyl-11-Keto- β -boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**(2): 272-277
- [2] Castrillo A, Joseph S B, Vaidya S A, *et al.* Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell*, 2003, **12**(4): 805-816
- [3] Hartvigsen K, Chou M Y, Hansen L F, *et al.* The role of innate immunity in atherogenesis. *J Lipid Res*, 2009, **50**(Suppl): S388-S393
- [4] Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2007, **11**(1): 88-95
- [5] Li H, He Y, Zhang J, *et al.* Lipopolysaccharide regulates toll-like receptor 4 expression in human aortic smooth muscle cells. *Cell Biol Int*, 2007, **31**(8): 831-835
- [6] Valentinis B, Bianchi A, Zhou D, *et al.* Direct effects of polymyxin B on human dendritic cells maturation: The role of IkappaB-alpha/NF-kappaB and ERK1/2 pathways and adhesion. *J Biol Chem*, 2005, **280**(14): 14264-14271
- [7] 唐朝克, 易光辉, 阮长耿, 等. ABC 转运体超家族对胆固醇吸收和血浆植物甾醇水平的调节作用. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31**(5): 398-401
Tang C K, Yi G H, Ruan C G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31**(5): 398-401
- [8] Hao X R, Cao D L, Hu Y W, *et al.* IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRA in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*, 2009, **203**(2): 417-428
- [9] Dai X Y, Ou X, Hao X R, *et al.* The Effect of T0901317 on ATP-binding cassette transporter A1 and Niemann-Pick Type C1 in ApoE^{-/-} Mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008, **51**(5): 467-475
- [10] 杨峻浩, 代小艳, 欧翔, 等. 载脂蛋白 A- I 通过 PKA 信号途径影响 ABCA1 的表达与功能. *生物化学与生物物理学进展*, 2007, **34**(6): 611-619
Yang J H, Dai X Y, OU X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(6): 611-619
- [11] 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
- [12] Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, *et al.* Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med*, 1992, **93**(5): 513-519
- [13] Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, *et al.* Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infection and Immunity*, 2002, **70**(6): 2995-3003
- [14] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, **117**(5): 87979-87988
- [15] Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor- κ B. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5**(6): 435-445
- [16] Oram J F, Vaughan A M. ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2006, **99**(10): 1031-1043
- [17] Yvan-Charvet L, Wang N, Tall A R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, **30**(2): 139-143
- [18] Chow Edward K H, Razani B, Cheng G H. Innate immune system regulation of nuclear hormone receptors in metabolic diseases. *J Leukoc Biol*, 2007, **82**(2): 187-195
- [19] Luo Y, Liang C P, Tall A R. The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J Biol Chem*, 2001, **276**(27): 24767-24773
- [20] Hu Y W, Ma X, Li X X, *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. *Atherosclerosis*, 2009, **204**(2): e35-43
- [21] Langmann T, Schumacher C, Morham S G, *et al.* ZNF202 is inversely regulated with its target genes ABCA1 and apoE during macrophage differentiation and foam cell formation. *J Lipid Res*, 2003, **44**(5): 968-977
- [22] Kaplan R, Gan X, Menke J G, *et al.* Bacterial Lip polysaccharide induces expression of ABCA1 but not ABCG1 via an LXR-independent pathway. *J Lipid Res*, 2002, **43**(6): 953-959
- [23] Majdalawieh A, Ro H S. LPS-induced suppression of macrophage cholesterol efflux is mediated by adipocyte enhancer-binding protein 1. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, **41**(7): 1518-1525

Lipopolysaccharide Down-regulates ABCA1 Expression in Foam Cells in a Nucleus Factor- κ B Pathway-dependent Manner*

CAO Dong-Li^{1,2)*}, YIN Kai^{1)**}, MO Zhong-Cheng¹⁾, HAO Xin-Rui¹⁾, HU Yan-Wei¹⁾,
LI Xiao-Xu¹⁾, TANG Ya-Ling¹⁾, TANG Chao-Ke^{1)***}

¹⁾ Institute of Cardiovascular Research, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, Life Science Research Center, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Physiology and Pathophysiology, College of Medical, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

Abstract The immune-inflammatory response mediated by LPS is firmly related to the development of atherosclerosis. ABCA1 has been identified to play a key role in the cellular cholesterol efflux which is regarded to anti-atherosclerosis. To investigate the changes of cholesterol efflux, ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA and protein expression in THP-1 macrophage derived foam cells treated with LPS, and to discover the role of TLR4/NF- κ B pathway and LXRs in this process. The foam cells were exposed to different concentration of LPS for 24 h or exposed to LPS for different times, and more, the cells were treated with LPS along or together with N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) for 24 h. The mRNA levels of ABCA1, TLR4 and LXR α were measured by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, and the protein levels of ABCA1, LXR α and intranuclear NF- κ B p65 were measured by Western blotting. Cellular lipid accumulation was determined by high performance liquid chromatography analysis. Cholesterol efflux was determined by FJ-2107P type liquid scintillator. The results show that the expression of ABCA1 were decreased in a dose- and time-dependent manner after treated with LPS, while TLR4 expression and the intranuclear NF- κ B p65 protein level were increased by LPS, and these changes can be reversed partly by pretreatment with TPCK. LPS and TPCK can not effect LXR α expression. The results also show that cellular lipid accumulation was increased, while the cellular cholesterol efflux was decreased in THP-1 macrophage derived foam cells after exposed to LPS for 24 h. It was concluded that LPS can down-regulate the expression of ABCA1, promote the accumulation of lipid and decrease cellular cholesterol efflux in THP-1 macrophage derived foam cells, which may be related to the TLR4/NF- κ B dependent and LXR α -independent pathway.

Key words ATP-binding cassette transporter A1, lipopolysaccharide, nucleus factor- κ B, cholesterol efflux

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00738

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China(30470720).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-734-8281853, E-mail: tchaoke@yahoo.com.cn

Received: December 11, 2009 Accepted: January 18, 2010