

• 基础研究 •

Mfn2 基因对 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞形成及 ABCA1 表达的影响*

刘纯¹ 张羿¹ 糜涛² 郭小梅¹

[摘要] 目的:观察 Mfn2 基因对 ox-LDL 刺激下 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及其机制。方法:通过细胞内胆固醇浓度检测,分析过表达或者干扰 Mfn2 基因表达对 RAW264.7 细胞在 ox-LDL 刺激下泡沫细胞内胆固醇含量和胆固醇酯/总胆固醇比例的影响;通过实时定量 PCR 和 Western blot 检测 Mfn2 基因对细胞胆固醇外排蛋白 ABCA1 mRNA 和蛋白水平的影响。结果:RAW264.7 细胞过表达 Mfn2 基因,分别降低细胞内 16.3%总胆固醇含量和 19.8%胆固醇酯/总胆固醇比例;而干扰 RAW264.7 细胞 Mfn2 基因表达,分别增加细胞内 45.9%总胆固醇含量和 26.7%的胆固醇酯/总胆固醇比例。40 pfu 和 60 pfu adv-Mfn2 感染均促进 RAW264.7 细胞 ABCA1 的 mRNA 表达(分别增加 26.5%和 60.5%),而仅 60 pfu adv-Mfn2 感染促进 RAW264.7 细胞 ABCA1 的蛋白表达(增加 40.6%)。结论:Mfn2 可能通过促进 ABCA1 的表达,减少细胞内胆固醇的沉积。

[关键词] RAW264.7 细胞;胆固醇转运;ATP 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1;Mfn2

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.06.018

[中图分类号] R34 **[文献标志码]** A

The effect of Mfn2 on expression of ABCA1 and RAW264.7 macrophage derived foam cell formation

LIU Chun¹ ZHANG Yi¹ MITao² GUO Xiaomei¹

(¹Department of Cardiology, ²Comprehensive Department, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author: GUO Xiaomei, E-mail: xmguo@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the effect of Mfn2 gene on ox-LDL induced RAW264.7 macrophage derived foam cell formation. **Method:** Intracellular cholesterol concentration and intracellular cholesterol ester / total cholesterol ratio was detected by the cellular cholesterol assay kit, confirm the effect of Mfn2 on intracellular lipid deposition in RAW264.7 cells under oxLDL stimulation. In further, the effect of Mfn2 gene on mRNA and protein expression of cholesterol transporter ABCA1 was detected by real-time quantitative PCR and western blot separately. **Result:** Overexpression or silence of Mfn2 gene expression reduces or increases cholesterol accumulation and cholesterol ester / free cholesterol ratio in RAW264.7 derived foam cells. ABCA1 mRNA was increased by 40 pfu or 60 pfu Adv-Mfn2 infection, but the protein of ABCA1 was only increased by 60 pfu Adv-Mfn2 infection. **Conclusion:** Overexpression of Mfn2 reduces intracellular cholesterol deposition by promoting the expression of ABCA1.

Key words RAW264.7; cholesterol transport; ATP cassette transporter A1; Mfn2

动脉粥样硬化性疾病尤其是冠状动脉(冠脉)粥样硬化性心脏病(冠心病)是目前全球普遍流行的疾病,其致死率亦位居前列,对人类健康危害巨大。血管内皮下巨噬细胞内胆固醇代谢平衡是动脉粥样硬化形成和进展的关键,过量的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的沉积而没有及时排出,导致泡

沫细胞的形成和动脉粥样硬化的进展。巨噬细胞胆固醇外排蛋白如 ATP 结合盒转运蛋白(ATP binding cassette transporter1, ABCA1),通过促进细胞内游离胆固醇转运至细胞外与载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, apo AI)结合,继而组成 HDL 经血液循环转运到肝脏进行代谢,维持细胞内胆固醇正常水平。大量研究显示,ABCA1 基因的缺失或者功能失调会导致细胞或者组织的胆固醇水平升高, Tangier 疾病(表现为血清 HDL 和 apoA-I 水平极低,巨噬细胞和组织胆固醇酯的沉积,高发动脉粥样硬化性心脏病)和动脉粥样硬化形成^[1]。一

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:30971244);湖北省科技计划项目(No:2010CHB00601)

¹ 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科(武汉, 430030)

² 华中科技大学同济医学院附属同济医院综合科

通信作者:郭小梅, E-mail: xmguo@tjh.tjmu.edu.cn

些药物如 ABC 转运子抑制剂格列本脲(GLYB)和布雷菲(尔)德菌素 A(Brefeldin A)抑制细胞 ABCA1 的表达将导致排出至培养基中的细胞胆固醇和磷脂急剧减少;而用 cAMP 类似物 8-Br-cAMP 和 LXR 激动剂 GW3965 作用于脂肪细胞和巨噬细胞,使其过表达 ABCA1 则促进 apoA-I 介导的胆固醇排出^[2]。ABCA1 已经成为调节脂质代谢和预防心血管疾病的治疗靶点。线粒体融合蛋白 2 基因(mitofusin 2, Mfn2)是维持线粒体形态和功能代谢的重要基因。我们之前的研究显示,Mfn2 通过结合并抑制 Ras,减少(extracellular signal regulated protein kinase, ERK1/2)活化,从而抑制动脉粥样硬化的形成和血管成形术后狭窄的发生。而且,除介导线粒体融合外,Mfn2 基因的功能紊乱与一系列疾病有关,如高血压、肥胖、糖耐量异常和 2 型糖尿病、动脉粥样硬化等^[3]。但 Mfn2 基因参与到动脉粥样硬化形成的具体机制尚不明确。因此,我们的研究将观察线粒体融合蛋白 2 基因(mitofusin 2, Mfn2)对 RAW264. 7 源性泡沫细胞形成的影响,并探讨其可能存在的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RAW264. 7 细胞(ATCC);DMEM 高糖培养基及血清(GIBCO);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、总胆固醇/游离胆固醇检测试剂盒、TCL 发光试剂盒购自北京普利莱公司;油红 O(sigma);RNA 提取试剂 TRIzol Reagent(Invitrogen)、逆转录试剂盒(Fermentas)、SYBR green 聚合酶链式反应试剂盒(TOYOBO);ABCA1 及 GAPDH 抗体(abcam),兔抗鼠二抗(santa cruz)。

1.2 LDL 的分离、氧化修饰及鉴定

收集健康志愿者血清,如前所述用密度梯度离心法分离人 LDL(1.019~1.063 g/ml)^[4]。在含 0.15 mol/L NaCl 和 300 μ mol/L EDTA 的磷酸缓冲液(PBS)透析 36 h 后,测定蛋白浓度。用含 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 氧化后,在 0.01% EDTA 的 PBS 中终止氧化。TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)试剂盒检测氧化程度。制备好的 ox-LDL 过滤除菌后储存于-80℃冰箱中,1 个月内使用。

1.3 细胞培养及干预

细胞培养于 6 孔板,细胞密度为 1×10^6 /ml,用 10% FBS(fetal bovine serum)的 DMEM 培养基 37℃ 培养,接种 24 h 后更换为无血清培养基,分别用不同滴度病毒或 PBS 干预,24 h 后加入 ox-LDL,共培养 24 或 48 h 后收集细胞提取 RNA 或蛋白。如前所述,携带 Mfn2 基因的重组腺病毒(adv-Mfn2)和携带 Mfn2-siRNA 的重组腺病毒(adv-siRNA)均为实验室原构建,培养

293A 细胞扩增重组腺病毒,氯化铯密度梯度离心纯化后测定病毒滴度^[5]。

1.4 细胞内胆固醇测定

根据胆固醇酯/游离胆固醇检测试剂盒说明书检测细胞内胆固醇浓度,分别与蛋白浓度做出比值后,比较各组间的相对胆固醇浓度。

1.5 实时定量逆转录聚合酶链反应

贴壁细胞用 PBS 洗 3 遍后,用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,运用分光光度法测定 RNA 浓度后,依照逆转录试剂盒说明书方法转录为 cDNA。引物均根据 NCBI Primer-BLAST 软件设计,由华大基因公司合成(ABCA1 引物序列:上游引物, TCTCACCACCTTCGGTCTCCAT, 下游引物 ACAGCCACCTTCATCCCATC T; GAPDH 引物序列:上游引物 GGTCGGAGTCAACGGATTTC, 下游引物 GGA AGATGGTGATGGGATTTC)。根据 SYBR 试剂盒说明书加入聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系后,实时定量 PCR(real time PCR)于 LightCycler 480 II (Roche)上进行,反应条件(42℃ 5 min, 95℃ 10 s, 58℃ 30 s, 40 个循环)。实验重复 8 次,ABCA1 mRNA 与 GAPDH mRNA 比值代表 ABCA1 mRNA 表达水平。

1.6 Western blot 检测蛋白表达水平

培养于 6 孔板中的 RAW264. 7 细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次后, RIPA 裂解液冰上裂解 30 min 后收集,高速离心(4℃, 12 000 $\times g$) 30 min 后取上清, BCA 法测定蛋白浓度。每组取等量蛋白(100 μ g)进行后续的 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完成后,冰浴中将 SDS-PAGE 胶上蛋白转至硝酸纤维素膜(PVDF),在含 3% BSA 的 TBS-T 液中室温封闭 1 h 后,孵育相应一抗过夜(4℃)。辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 2 h 后,于 ECL 显色后曝光于 X 线胶片上。Quantity one 软件分析目的蛋白条带与内参灰度比值,比较各组差异。

1.7 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 Graphpad 5.0 软件进行统计学分析,分别采用方差分析及 *t* 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mfn2 降低 RAW264. 7 源性泡沫细胞内脂质含量

除空白对照组与 PBS 共培养 48 h 外,其余组细胞均与 ox-LDL 共培养并形成泡沫细胞,且细胞内总胆固醇与游离胆固醇含量均多于空白对照组。胆固醇酯为总胆固醇与游离胆固醇差值所得,胆固醇酯占总胆固醇比例为胆固醇酯与总胆固醇比值。与空病毒载体(adv-lacZ)对照组相比,adv-Mfn2 腺病毒干预组细胞内总胆固醇含量降低($P < 0.05$),

胆固醇酯/总胆固醇比例降低($P<0.05$)。而未加入 ox-LDL 的组内, RAW264. 7 细胞内脂质含量少, 且 adv-Mfn2 干预与 adv-lacZ 组相比细胞内脂质含量无明显差异($P>0.05$)。见图 1。

2.2 adv-siRNA 感染增加 RAW264. 7 细胞内胆固醇沉积

分别用 40 pfu /60 pfu adv-siRNA 和 60 pfu adv-lacZ 预感染 RAW264. 7 细胞后, 加入 80 mg/L ox-LDL 或等量 PBS(con 组)共培养 48 h, 细胞胆固醇检测试剂盒检测各组细胞内脂质含量。如图 2 所示, adv-siRNA 与 adv-lacZ 干预组相比, 加入 ox-LDL 共培养形成泡沫细胞的 RAW264. 7 细胞内脂质含量明显增多($P<0.05$)。见图 2。

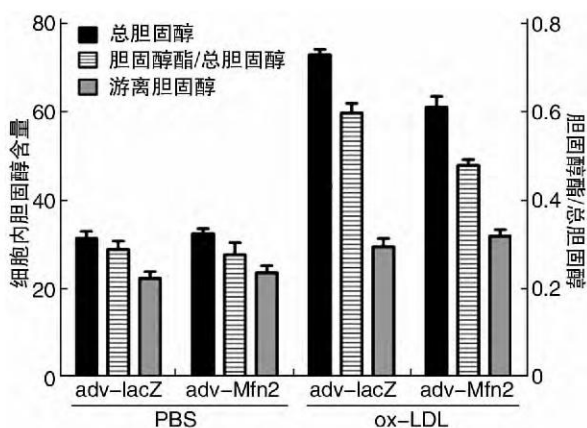


图 1 adv-Mfn2 感染对 RAW264. 7 源性泡沫细胞内脂质蓄积的影响

Figure 1 Effect of adv-Mfn2 infection on lipid accumulation of RAW264. 7 derived foam cells

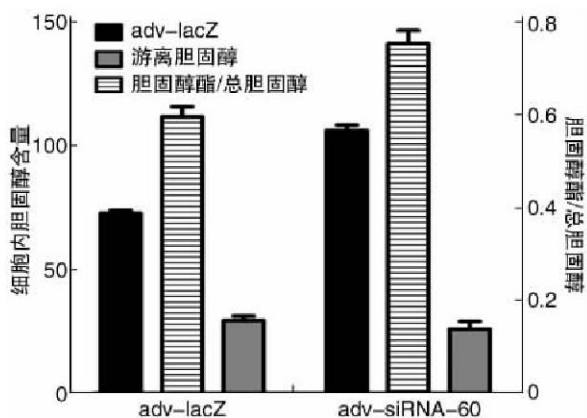


图 2 adv-siRNA 对 RAW264. 7 源性泡沫细胞内胆固醇含量影响

Figure 2 Effect of adv-siRNA on cholesterol content of RAW264. 7 derived foam cells

2.3 不同滴度 adv-Mfn2 对 RAW264. 7 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 水平的影响

不同滴度 adv-Mfn2 和 adv-lacZ 感染 RAW264. 7

巨噬细胞 24 h 后加入 PBS(con)或 ox-LDL 共培养, 分别提取各组细胞总 mRNA 检测。与空白对照组(con)相比, ox-LDL 共培养明显增加 ABCA1 mRNA 的表达, 而病毒载体对照 adv-lacZ 不影响 ABCA1 mRNA 的水平($P<0.05$)。与 adv-lacZ 泡沫细胞组相比, 40 pfu 和 60 pfu adv-Mfn2 感染分别使 ABCA1 mRNA 的表达增加 26. 5%和 60. 5% ($P<0.05$)。见图 3。

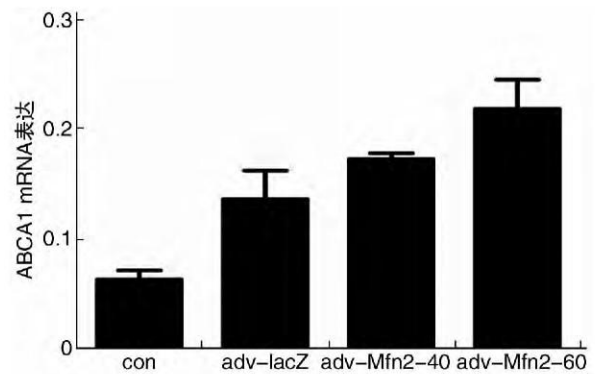


图 3 adv-Mfn2 感染对 RAW264. 7 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 水平的影响

Figure 3 Effect of adv-Mfn2 infection on macrophage RAW264. 7 ABCA1 mRNA level

2.4 不同滴度 adv-Mfn2 对 RAW264. 7 巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达水平的影响

与 ox-LDL 对照组相比, adv-lacZ 感染也不影响 ABCA1 蛋白表达水平($P>0.05$)。与空白对照组相比, ox-LDL 共培养明显增加 ABCA1 蛋白表达。与 adv-lacZ 泡沫细胞组相比, 仅 60 pfu adv-Mfn2 感染明显增加 RAW 264. 7 巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达水平, 两者之间差异显著($P<0.01$)。见图 4。

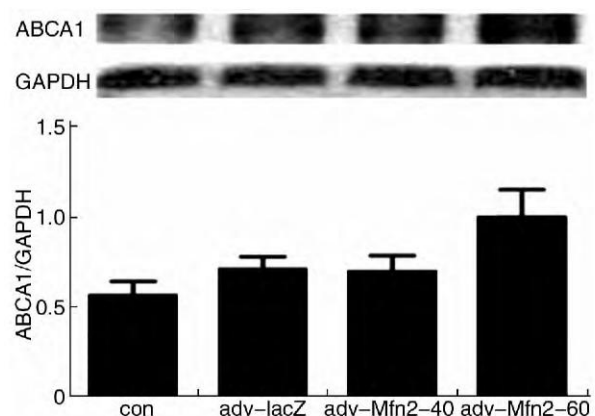


图 4 adv-Mfn2 感染对 RAW264. 7 巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effect of adv-Mfn2 infection on macrophage RAW264. 7 ABCA1 protein level

3 讨论

动脉粥样硬化是一个由多基因和多种环境因素相互作用产生的病理生理过程。近年来,大量研究显示,线粒体作为活性氧(ROS)的重要来源和靶细胞器参与动脉粥样硬化形成及进展整个病理生理过程。线粒体功能紊乱时产生过量的 ROS 和活性氮(RNS)导致血管内皮损伤,血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖,VSMCs 和巨噬细胞的凋亡,导致动脉粥样硬化进展和斑块破裂^[6]。

循环血液中的 ox-LDL 导致内皮细胞功能紊乱,启动动脉粥样硬化的形成。损伤的内皮细胞释放大量的黏附分子和炎症因子,促进平滑肌细胞的迁移和增殖,单核细胞迁移至内皮下分化为巨噬细胞,吞噬大量的脂质形成泡沫细胞。泡沫细胞产生的炎症因子和生长因子,促进 VSMCs 增殖并迁移至中膜。同时 ox-LDL 也刺激成纤维细胞胶原蛋白产生,进一步形成脂纹的纤维帽。最后,ox-LDL 还促进金属蛋白酶(MMPs)的产生、释放和激活,导致血小板粘附、聚集和形成白色血栓甚至斑块破裂^[7]。因此在动脉粥样硬化斑块形成和进展过程中,ox-LDL 起决定性作用。研究 ox-LDL 在巨噬细胞内的代谢调节,是治疗动脉粥样硬化的关键靶点,具有重要意义。

前期动物研究显示,过表达 Mfn2 通过抑制脂质沉积和 VSMCs 增殖,减少高脂诱导的家兔颈动脉斑块的面积,抑制血管壁中膜增厚^[8]。我们的研究进一步阐释,过表达 Mfn2 参与斑块内巨噬细胞的脂质代谢中的具体机制。通过细胞内胆固醇含量测定,我们证实 adv-Mfn2 感染抑制 ox-LDL 诱导的 RAW264. 7 细胞内脂质的沉积,减少胆固醇酯/总胆固醇比例,从而抑制泡沫细胞的形成;另一方面,adv-siRNA 感染作用相反。

细胞胆固醇外排蛋白的调节是维持细胞内胆固醇稳态的关键。ABCA1 是细胞胆固醇排出形成 HDL 的最主要的转运蛋白,将小鼠 ABCA1 基因敲除将会导致其组织和巨噬细胞内大量的胆固醇沉积^[9-10]。同时,ABCA1 也调节肠道胆固醇的吸收和分泌,从而调节血清胆固醇水平甚至在 HDL 低水平^[11]。另一方面,免疫和炎症递质也调节胆固醇代谢和动脉粥样硬化的进展,目前证实其机制可能为影响 ABCA1 的表达有关。如 IFN- γ 抑制鼠腹腔巨噬细胞 ABCA1 的表达,从而抑制胆固醇的排出^[12]。而 ABCA1 也可以调节细胞炎症因子的分泌,调节细胞内和细胞膜的脂质含量。因此,我们的研究发现,adv-Mfn2 促进细胞胆固醇转运蛋白 ABCA1 的转录和表达,不仅是对细胞内胆固醇稳态维持机制的阐明,也是对 ABCA1 参与动脉粥样硬化机制的探索。

综上所述,本研究是对 Mfn2 基因参与动脉粥

样硬化泡沫细胞形成机制的探索,发现其通过促进 ABCA1 蛋白的表达发挥作用,但其是否是 Mfn2 基因的唯一作用靶点仍无法确定,有待进一步研究阐明。

参考文献

- [1] VOLOSHYNA I, REISS A B. The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis [J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50: 213-224.
- [2] HOWARD A D, VERGHESE P B, ARRESE E L, et al. Characterization of apoA-I-dependent lipid efflux from adipocytes and role of ABCA1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 343: 115-124.
- [3] CHEN K H, DASGUPTA A, DING J, et al. Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation [J]. *FASEB J*, 2014, 28:382-394.
- [4] HE C, CHEN Y, LIU C, et al. Mitofusin2 decreases intracellular cholesterol of oxidized LDL-induced foam cells from rat vascular smooth muscle cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2013, 33: 212-218.
- [5] ZHOU W, CHEN K H, CAO W, et al. Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2 [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211: 216-223.
- [6] BALLINGER S W. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38: 1278-1295.
- [7] MITRA S, DESHMUKH A, SACHDEVA R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy [J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342: 135-142.
- [8] GUO Y H, CHEN K, GAO W, et al. Overexpression of Mitofusin 2 inhibited oxidized low-density lipoprotein induced vascular smooth muscle cell proliferation and reduced atherosclerotic lesion formation in rabbit [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363: 411-417.
- [9] HUANG C X, ZHANG Y L, WANG J F, et al. MCP-1 impacts RCT by repressing ABCA1, ABCG1, and SR-BI through PI3K/Akt posttranslational regulation in HepG2 cells [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54: 1231-1240.
- [10] WESTERTEP M, MURPHY A J, WANG M, et al. Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice [J]. *Circ Res*, 2013, 112: 1456-1465.
- [11] YANG C M, LU Y L, CHEN H Y, et al. Lycopene and the LXRalpha agonist T0901317 synergistically inhibit the proliferation of androgen-independent prostate cancer cells via the PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23: 1155-1162.
- [12] LUU W, SHARPE L J, GELISSEN I C, et al. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis [J]. *IUBMB Life*, 2013, 65: 675-684.

(收稿日期:2014-04-11)