

• 基础研究 •

移行上皮反应基因1蛋白调控巨噬细胞胆固醇代谢作用研究

王勇 张瑞岩

【摘要】 目的:探讨移行上皮反应基因 1 (TERE1) 蛋白对巨噬细胞胆固醇代谢的影响及潜在的机制。**方法:**以氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理巨噬细胞 RAW264.7, 观察 TERE1 的蛋白和 mRNA 表达水平变化。以 TERE1 过表达慢病毒和 TERE1 siRNA 分别建立高或低表达 TERE1 的巨噬细胞模型, 分别测定 ox-LDL 孵育后细胞内胆固醇含量变化。同时, 利用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测胆固醇转运因子的变化。**结果:**ox-LDL 使巨噬细胞 TERE1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增加 (P 均 <0.05)。RT-PCR 检测发现, 与对照组比较, TERE1 过表达慢病毒转染巨噬细胞组 TERE1 mRNA 表达显著增加; 而 TERE1 siRNA 转染巨噬细胞组 TERE1 表达显著减少 (P 均 <0.05)。在 ox-LDL 作用下, 与空白对照组和空病毒组相比, TERE1 过表达组巨噬细胞内胆固醇含量减少 ($P < 0.05$); TERE1 低表达组巨噬细胞内则胆固醇含量增多 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测显示, 与空白对照组和空病毒组相比, 过表达 TERE1 的巨噬细胞其胆固醇流出相关基因 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 和 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCG1) 表达增加 (P 均 <0.05); TERE1 低表达巨噬细胞组则 ABCA1 和 ABCG1 表达减少 (P 均 <0.05), 两种细胞的胆固醇流入相关基因白细胞分化抗原 36 (CD36) 和清道夫受体 A (SR-A) 则无明显改变 ($P > 0.05$)。**结论:**激活 TERE1 蛋白可以使巨噬细胞内胆固醇含量降低; TERE1 蛋白可能通过激活巨噬细胞内胆固醇流出相关基因, 增加胆固醇流出。

【关键词】 胆固醇; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化; 移行上皮反应基因 1

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.04.009

Effect of TERE1 protein on macrophage cholesterol metabolism WANG Yong, ZHANG Ruiyan Department of Cardiovascular Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200072, China

【Abstract】 Objectives: To assess the effect of TERE1 on macrophage cholesterol metabolism and its possible mechanism. **Methods:** RAW264.7 macrophage cells were treated with ox-LDL, and protein expression levels of TERE1 in macrophages was assessed. Lentivirus and TERE1 siRNA were used in macrophages to establish TERE1 overexpression and knockdown models, respectively. Intracellular cholesterol levels in macrophages were evaluated when these TERE1 overexpression and knockdown models were incubated with ox-LDL. Meanwhile, RT-PCR was used to detect the expression level of cholesterol transporters. **Results:** The mRNA and protein expression levels of TERE1 were increased when macrophages were incubated with ox-LDL (both $P < 0.05$). Expression level of TERE1 mRNA in TERE1 overexpression group was significantly increased, while in TERE1 knockdown group, expression level of TERE1 mRNA was significantly decreased (all $P < 0.05$). Under the incubation of ox-LDL, compared with the control group and the negative virus group, the cholesterol levels in macrophages of the TERE1 overexpression group were decreased, but were increased in the TERE1 knockdown group (all $P < 0.05$). And the results of RT-PCR revealed that expression levels of cholesterol efflux-related

genes ABCA1 and ABCG1 were increased in macrophages of the TERE1 overexpression group, but were decreased in the TERE1 knockdown group (all $P < 0.05$). There were no significantly changes in cholesterol influx-related genes CD36 and SR-A ($P > 0.05$). **Conclusions:** Activation of TERE1 protein may decrease cholesterol level in macrophages, and TERE1 protein may increase cholesterol efflux by activating cholesterol efflux-related genes in macrophages.

【Keywords】 Cholesterol; Macrophages; Atherosclerosis; Transitional epithelial response gene 1

动脉粥样硬化是心血管事件发生的重要病理生理基础,对动脉粥样硬化发病机制的研究具有重要价值。以往的研究表明,巨噬细胞大量吞噬胆固醇后变为泡沫细胞,参与粥样硬化斑块形成^[1-3]。移行上皮反应基因 1 (TERE1) 蛋白定位于内质网、线粒体和细胞膜等,广泛表达于各种细胞和组织中,例如外周血白细胞、心脏、血管、肝脏、眼等^[4-6],具有多种生物学功能^[7-11]。然而,目前尚不清楚 TERE1 蛋白是否影响巨噬细胞内胆固醇代谢。本研究利用巨噬细胞 RAW264.7,探讨 TERE1 蛋白对巨噬细胞胆固醇代谢的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和实验分组及方案

应用 RAW264.7 小鼠巨噬细胞 (中科院上海细胞库),培养传代后用于实验。

实验一: RAW264.7 细胞以氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 50 $\mu\text{g/mL}$ 孵育 24 h (另设对照组),研究 ox-LDL 对 TERE1 表达的影响。

实验二: RAW264.7 细胞以慢病毒过表达 TERE1 (另设空病毒转染组和空白对照组 1),观察其对细胞内胆固醇含量和相关因子的作用。

实验三: RAW264.7 细胞以 siRNA 敲低 TERE1 (另设空 siRNA 转染组和空白对照组 2),观察其对细胞内胆固醇含量和相关因子的影响。

1.2 免疫印迹法 (Western blot) 检测 TERE1 蛋白表达

提取细胞总蛋白并定量分析。聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭。一抗 (TERE1, 1 : 1 000; β -actin, 1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入二抗 (1 : 3 000) 1 h。利用凝胶成像仪显现蛋白条带。以 β -actin 为内参,半定量分析。

1.3 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 mRNA 表达

提取细胞总 RNA 并测定其纯度,采用逆转录酶合成 cDNA,普通 PCR 反应并条件优化,

RT-PCR 检测细胞中目的基因 mRNA 表达。以 GAPDH 为内参,RT-PCR 操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.4 过表达 TERE1 慢病毒转染 RAW264.7 细胞

用过表达 TERE1 慢病毒液 (上海吉玛基因公司提供) 和空白病毒液转染细胞 24 h,换液 48 h 后加入含嘌呤霉素培养基。筛选细胞,荧光显微镜下观察转染情况,形成慢病毒转染的细胞稳定株,检测 TERE1 表达以确认转染效果。

1.5 TERE1 siRNA 转染 RAW264.7 细胞

在无血清培养基中加入 TERE1-siRNA (吉玛基因公司提供),空 siRNA 为对照,再加入 LipofectamineTM RNAiMAX,静置 20 min 后加入到细胞培养皿中。转染 24 h,荧光显微镜下观察转染情况。检测 TERE1 表达以确认转染效果。

1.6 吞噬脂质的 RAW264.7 细胞油红 O 染色和细胞内胆固醇含量测定

过表达和敲低 TERE1 的 RAW264.7 细胞,以 50 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 孵育 24 h。将一部分细胞固定后以油红 O 染色,封片后显微镜下观察;将另一部分细胞破碎后制备匀浆液,使用试剂盒检测胆固醇含量。测定蛋白含量用于校正,细胞胆固醇含量以 (mmol/mg 蛋白) 表示。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,变量以均数 \pm 标准差表示。符合正态分布的两组间均数比较采用独立样本 t 检验,不符合正态分布的两组间比较采用秩和检验。多组间比较采用单因素方差分析,并进行两两比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质吞噬状态下巨噬细胞 TERE1 的表达

RT-PCR 和 Western blot 检测显示,与对照组相比,在 ox-LDL 作用下,巨噬细胞 TERE1 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加 (0.52 ± 0.01 对

0.24±0.03, 0.63±0.06 对 0.24±0.03, P 均<0.05, $n=5$)。

2.2 *TERE1*过表达和低表达对巨噬细胞胆固醇含量和胆固醇转运因子的影响

荧光显微镜下观察, 过表达慢病毒液和低表达 *TERE1* siRNA 转染 RAW264.7 细胞, 其转染情况

均较好 (见图 1 和图 2)。RT-PCR 检测发现, 与空白对照组 1 和空病毒组比较, *TERE1* 过表达慢病毒转染巨噬细胞组 *TERE1* 的 mRNA 表达水平显著增加; 与空白对照组 2 和空 siRNA 组比较, *TERE1* siRNA 转染巨噬细胞组 *TERE1* 的 mRNA 表达水平显著减少 (见表 1, $P<0.05$, $n=5$)。

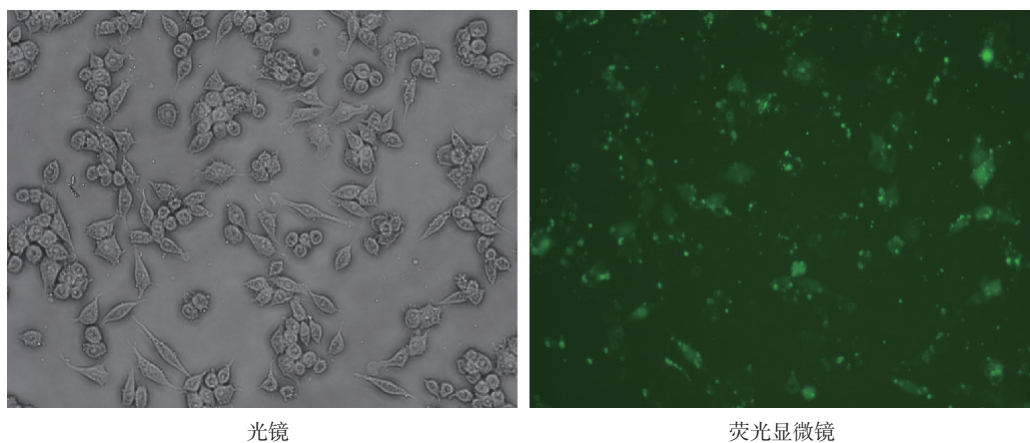


图1 *TERE1*过表达慢病毒转染巨噬细胞效率 (×200)

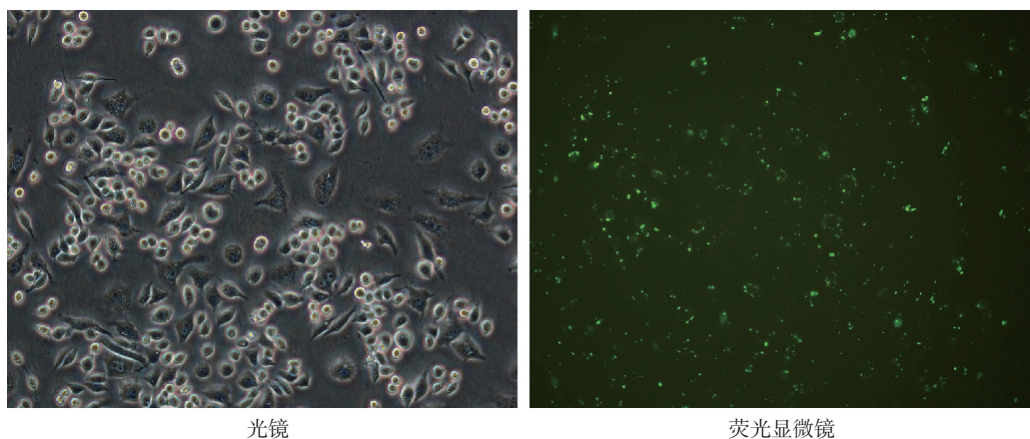


图2 *TERE1* siRNA转染巨噬细胞效率 (×200)

表1 各组巨噬细胞 *TERE1* mRNA 表达水平

| 分组 | <i>TERE1</i> mRNA/GAPDH mRNA |
|---------------------|------------------------------|
| 空白对照组1 | 0.99±0.05 |
| 空病毒组 | 1.00±0.06 |
| <i>TERE1</i> 过表达组 | 8.37±0.50 ⁽¹⁾ |
| 空白对照组2 | 1.00±0.06 |
| 空siRNA组 | 0.98±0.03 |
| <i>TERE1</i> siRNA组 | 0.20±0.02 ⁽²⁾ |

注: 与空白对照组1和空病毒组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 与空白对照组2和空siRNA组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$

以 ox-LDL 孵育巨噬细胞 24 h 后, 油红 O 染色和总胆固醇试剂盒测定显示, 与空白对照组 1 和空病毒组比较, 过表达 *TERE1* 组细胞内脂滴和总胆固醇量明显减少 (图 3 和表 2, $P<0.05$, $n=5$); 与空白对照组 2 和空 siRNA 组比较, *TERE1* siRNA 敲低组细胞内脂滴和总胆固醇量显著增多 (见图 4 和表 2, $P<0.05$, $n=5$)。

RT-PCR 检测有关基因表达结果显示, 与空白对照组 1 和空病毒组比较, 过表达 *TERE1* 的细胞其胆固醇流出相关基因 ATP 结合盒转运体 A1 (*ABCA1*) 和 ATP 结合盒转运体 A1 (*ABCG1*) 的

mRNA 表达水平增加;与空白对照组 2 和空 siRNA 组比较, *TERE1* siRNA 敲低细胞胆固醇流出相关基因 *ABCA1* 和 *ABCG1* 的 mRNA 表达水平减少(见表 3, $P<0.05$, $n=5$)。2 种细胞的胆固醇流入相关基因白细胞分化抗原 36 (*CD36*) 和清道夫受体 A (*SR-A*) 的表达无明显改变。

3 讨论

血循环中的单核细胞黏附于动脉内皮细胞,并迁移至内皮下间隙分化为巨噬细胞。后者促使 ox-LDL 形成,与巨噬细胞的清道夫受体结合,转变为泡沫细胞。对巨噬细胞在胆固醇转运和代谢中的作用研究,将对动脉粥样硬化的病理生理机制和防治提供重要理论依据。

表2 各组巨噬细胞内总胆固醇含量/ $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白

| 分组 | 总胆固醇含量 |
|---------------------|-----------------------|
| 空白对照组1 | 0.28 ± 0.03 |
| 空病毒组 | 0.29 ± 0.03 |
| <i>TERE1</i> 过表达组 | $0.16 \pm 0.02^{(1)}$ |
| 空白对照组2 | 0.27 ± 0.03 |
| 空siRNA组 | 0.27 ± 0.03 |
| <i>TERE1</i> siRNA组 | $0.49 \pm 0.05^{(2)}$ |

注:与空白对照组1和空病毒组比较, $^{(1)}P<0.05$;与空白对照组2和空siRNA组比较, $^{(2)}P<0.05$

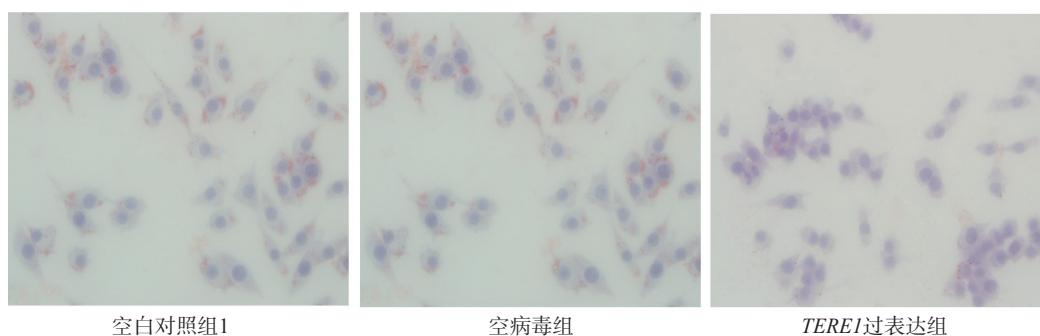


图3 *TERE1*过表达对巨噬细胞胆固醇含量的影响 ($\times 200$)

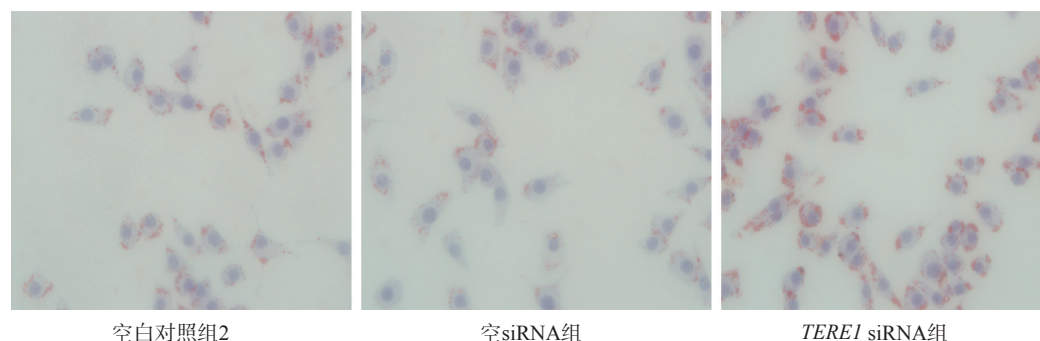


图4 *TERE1*敲低对巨噬细胞胆固醇含量的影响 ($\times 200$)

表3 *TERE1*过表达和敲低对巨噬细胞胆固醇转运因子mRNA表达的影响

| 分组 | <i>ABCA1</i> 的mRNA表达水平 | <i>ABCG1</i> 的mRNA表达水平 | <i>CD36</i> 的mRNA表达水平 | <i>SR-A</i> 的mRNA表达水平 |
|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 空白对照组1 | 0.24 ± 0.02 | 0.27 ± 0.02 | 0.25 ± 0.02 | 0.36 ± 0.04 |
| 空病毒组 | 0.24 ± 0.02 | 0.26 ± 0.02 | 0.24 ± 0.02 | 0.37 ± 0.04 |
| <i>TERE1</i> 过表达组 | $0.39 \pm 0.03^{(1)}$ | $0.40 \pm 0.04^{(1)}$ | 0.25 ± 0.02 | 0.39 ± 0.05 |
| 空白对照组2 | 0.39 ± 0.04 | 0.40 ± 0.04 | 0.24 ± 0.02 | 0.41 ± 0.04 |
| 空siRNA组 | 0.40 ± 0.04 | 0.39 ± 0.04 | 0.25 ± 0.02 | 0.38 ± 0.04 |
| <i>TERE1</i> siRNA组 | $0.26 \pm 0.02^{(2)}$ | $0.25 \pm 0.02^{(2)}$ | 0.25 ± 0.02 | 0.39 ± 0.05 |

注:与空白对照组1和空病毒组比较, $^{(1)}P<0.05$;与空白对照组2和空siRNA组比较, $^{(2)}P<0.05$

本研究发现,巨噬细胞以 ox-LDL 孵育处理后,TERE1 蛋白表达水平显著增加,提示其可能在胆固醇转运和代谢中发挥一定的作用。为了研究 TERE1 蛋白对巨噬细胞胆固醇代谢的作用,本研究通过过表达和敲低 *TERE1* 在巨噬细胞内的表达量,观察其对巨噬细胞内胆固醇含量的影响。研究结果显示,过表达 *TERE1* 使巨噬细胞内胆固醇含量减少,而敲低 *TERE1* 则使胆固醇含量增加。既往的研究表明,TERE1 蛋白对其他细胞系的胆固醇代谢也有相似的作用。*TERE1* 基因缺陷、功能减弱时,角膜细胞内胆固醇合成和代谢因子(HMGCR)等受到影响,导致胆固醇合成增多,胆固醇在眼角膜不断积累^[10]。*TERE1* 在膀胱肿瘤细胞表达减少,通过影响载脂蛋白 E(ApoE)的作用,导致膀胱肿瘤细胞内胆固醇含量增加,促进肿瘤细胞生长^[11]。含钙培养液孵育血管平滑肌细胞,可使 TERE1 蛋白表达增加,细胞内胆固醇含量减少,加速血管钙化进程^[12]。

胆固醇流入和流出环节在巨噬细胞源性泡沫细胞形成中的作用尤为重要。SR-A 和 CD36 是较重要的清道夫受体,对巨噬细胞摄入胆固醇和泡沫化极重要,可促进动脉粥样硬化的形成和进展。而胆固醇逆向转运是外周细胞胆固醇通过高密度脂蛋白、载脂蛋白 A-I 等转运至肝脏分解代谢的重要生理过程^[1-3]。细胞胆固醇的外流是胆固醇逆向转运的首要步骤,对减少细胞内胆固醇蓄积和动脉粥样硬化发生具有重要意义。胆固醇外流可以由 ABCA1、ABCG1 以及 Apo E 等介导。本研究发现,过表达 *TERE1* 使巨噬细胞胆固醇流出相关基因 *ABCA1* 和 *ABCG1* 表达增加,而胆固醇流入相关基因 *CD36* 和 *SR-A* 则无明显改变;敲低 *TERE1* 则使巨噬细胞 *ABCA1* 和 *ABCG1* 表达减少。这表明,TERE1 蛋白主要通过影响巨噬细胞流出环节影响胆固醇代谢和转运。既往文献也显示,以过表达 *TERE1* 的腺病毒转染前列腺肿瘤细胞,可以使细胞的胆固醇流出相关基因 *ABCA1* 和 *ABCG1* 表达增加,与本研究相一致^[8]。

总之,TERE1 蛋白可以调控巨噬细胞内胆固醇代谢,激活 *TERE1* 可以使巨噬细胞内胆固醇含量降低。TERE1 蛋白可能主要通过激活巨噬细胞内胆固醇流出相关基因,进而增加胆固醇流出。加强

TERE1 的作用,可能有利于胆固醇逆向转运过程,进而延缓动脉粥样硬化的发生和发展。这些研究有望为动脉粥样硬化的防治提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Chistiakov D, Melnichenko AA, Myasoedova VA, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11):1153-1165.
- [2] Uehara Y, Saku K. High-density lipoprotein and atherosclerosis: roles of lipid transporters[J]. World J Cardiol, 2014, 6(10):1049-1059.
- [3] Nyandwi JB, Ko YS, Jin H, et al. Rosmarinic acid increases macrophage cholesterol efflux through regulation of ABCA1 and ABCG1 in different mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16):8791.
- [4] Nakagawa K, Hirota Y, Sawada N, et al. Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme[J]. Nature, 2010, 468(7320):117-121.
- [5] Hegarty JM, Yang H, Chi NC. UBIAD1-mediated vitamin K2 synthesis is required for vascular endothelial cell survival and development[J]. Development, 2013, 140(8):1713-1719.
- [6] Fredericks WJ, Yin H, Lal P, et al. Ectopic expression of the *TERE1* (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: altered metabolic phenotype associated with reactive Oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism[J]. Int J Oncol, 2013, 43(2):638-652.
- [7] Yan B, Wang J. UBIAD1 expression is associated with cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(1):651-659.
- [8] Fredericks WJ, Sepulveda J, Lai P, et al. The tumor suppressor *TERE1* (UBIAD1) prenyltransferase regulates the elevated cholesterol phenotype in castration prostate cancer by controlling a program of ligand dependent SXR target genes[J]. Oncotarget, 2013, 4(7):1075-1092.
- [9] Xie J, Li L. Functional study of SCCD pathogenic gene UBIAD1 (Review)[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(4):706.
- [10] Nickerson ML, Bosley AD, Weiss JS, et al. The UBIAD1 prenyltransferase links menaquinone-4 synthesis to cholesterol metabolic enzymes[J]. Hum Mutat, 2013, 34(2): 317-329.
- [11] Fredericks WJ, Mcgarvey T, Wang H, et al. The bladder tumor suppressor protein *TERE1* (UBIAD1) modulates cell cholesterol: implications for tumor progression[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(11):851-864.
- [12] Liu S, Guo W, Han X, et al. Role of UBIAD1 in intracellular cholesterol metabolism and vascular cell calcification[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0149639.

(收稿:2022-02-15 修回:2022-05-25)

(本文编辑:丁媛媛)