文章编号:1000-5404(2012)10-0917-04

论著

L-4F 对 oxLDL 刺激下脂肪细胞表达单核细胞趋化蛋白-1 的影响

谢湘竹[1],赵水平[2],于碧莲[2],钟巧青[2] (100853 北京,解放军总医院南楼心血管一科[1];410011 长沙,中南大学湘雅二医院心内科[2])

[摘要] **目的** 观察载脂蛋白 A-I 模拟肽 L-4F 对氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)刺激下 3T3-L1 脂肪细胞分泌表达单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 3T3-L1 脂肪细胞促分化成熟后,oxLDL(50 μg/ml)刺激脂肪细胞,给予 L-4F(1-50 μg/ml),H-89(10 μmol/L)及 H-89 + L-4F(50 μg/ml)干预,收集细胞,测定脂肪细胞 MCP-1 上清液中的浓度和 mRNA 表达水平,以及脂肪细胞核因子 C/EBPα、β 的蛋白质水平;改良 Boyden 小室法检测不同干预组上清液对人外周血单核细胞趋化活性的影响。**结果** OxLDL(50 μg/ml)刺激使分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞表达及分泌 MCP-1 明显增加,并使得诱导的单核细胞移动距离明显增加。L-4F 以浓度依赖的方式减少脂肪细胞 MCP-1 的表达和分泌,降低单核细胞趋化活性;50 μg/ml L-4F 使 MCP-1 mRNA 的表达降低(91 ± 6)%($P < 0.01$)。PKA 抑制剂 H-89(10 μmol/L)干预 oxLDL 刺激的脂肪细胞后 MCP-1 m RNA 的表达也显著减少($P < 0.01$),但是,在 50 μg/ml L-4F 作用的基础上,H-89(10 μmol/L)的孵育并未使得 MCP-1 mRNA 的表达进一步降低($P > 0.05$)。50 μg/ml oxLDL 刺激对脂肪细胞 C/EBPα 的含量无明显影响,但增加 C/EBPβ 蛋白量,且该作用呈时间依赖性;L-4F 和 H-89 干预均降低 C/EBPβ 的蛋白质含量。**结论** OxLDL 时间依赖性地诱导脂肪细胞 C/EBPβ 的蛋白合成,并增强脂肪细胞 MCP-1 的表达分泌,L-4F 以浓度依赖的方式对抗 oxLDL 的致炎作用,cAMP/PKA-C/EBPβ 信号通道可能是 L-4F 的作用途径之一。

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白(oxLDL);L-4F;脂肪细胞;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1);蛋白激酶 A;CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBPs)

[中图法分类号] R329.2; R392-33;R392.13 [文献标志码] A

Effect of L-4F on monocyte chemoattractant protein-1 expression in 3T3-L1 adipocytes induced by oxidized low-density lipoprotein

Xie Xiangzhu[1], Zhao Shuiping[2], Yu Bilian[2], Zhong Qiaoqing[2] ([1]First Department of Cardiology in South Building, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [2]Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan Province, 410011, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effect of apolipoprotein A-I mimetic peptide L-4F on the secretion and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in 3T3-L1 adipocytes induced by oxidized low-density lipoprotein (oxLDL). **Methods** Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were preincubated in the medium containing different concentrations of L-4F (0, 1, 10, and 50 μg/ml), H-89 (10 μmol/L) and H-89 (10 μmol/L) combined with L-4F (50 μg/ml), respectively. Then the adipocytes were treated by oxLDL (50 μg/ml). The concentration of MCP-1, the mRNA expression of MCP-1, and the protein levels of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)α and C/EBPβ in cell supernatant were evaluated. The effect of the supernatant on the chemotactic activity of human peripheral blood monocytes was detected by micropore filter method using a modified Boyden chamber. **Results** OxLDL (50 μg/ml) treatment induced a significant increase of MCP-1 expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes, and the mean of migration distance of human peripheral blood monocytes induced by the cell supernatant was significantly longer than that of the random migration group. MCP-1 secretion and expression as well as the chemotactic activity of human peripheral blood monocyte were decreased by the L-4F pre-incubation in a dose-dependent manner. MCP-1 expression in the adipocytes pretreated with L-4F (50 μg/ml) decreased by (91 ± 6)% ($P < 0.01$). PKA inhibitor H-89 (10 μmol/L) significantly reduced the oxLDL-induced MCP-1 expression ($P < 0.01$), but no further decrease was observed

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30470705)

[通信作者] 赵水平,E-mail: zhaosp@medmail.com.cn

when H-89 (10 μmol/L) was used in combination with L-4F (50 μg/ml) ($P>0.05$). OxLDL (50 μg/ml) treatment showed no significant effect on C/EBPα content, but increased C/EBPβ content in a time-dependent manner. H-89 and L-4F both attenuated C/EBPβ protein content in oxLDL-treated 3T3-L1 adipocytes. **Conclusion** OxLDL induces C/EBPβ protein synthesis and enhances MCP-1 secretion and expression in 3T3-L1 adipocytes in a time-dependent manner. L-4F dose-dependently counterbalances the proinflammatory effect of oxLDL, which may involve cAMP/PKA-C/EBPβ signaling pathway.

[**Key words**] oxidized low density lipoprotein; L-4F; adipocytes; monocyte chemoattractant protein-1; protein kinase A; CCAAT/enhancer binding proteins

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30470705). Corresponding author: Zhao Shuiping. E-mail: zhaosp@medmail.com.cn

动脉粥样硬化"损伤反应学说"认为,动脉内膜损伤后,单核细胞迁移进入内皮下是动脉粥样硬化斑块形成和炎症产生的起始步骤,巨噬细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化病变中最早出现的细胞,研究单核细胞或巨噬细胞的迁移,是阐明动脉粥样硬化斑块形成机制的关键问题之一。脂肪细胞和脂肪组织不仅参与脂质和能量代谢,而且还参与了炎症反应,在动脉粥样硬化形成过程中的地位不容低估。脂肪细胞可分泌单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),MCP-1是单核细胞和T淋巴细胞的主要趋化因子。研究显示,MCP-1是动脉粥样硬化炎症反应的促发信号[1-2],且MCP-1与各种肥胖相关性疾病存在明显相关,因此,MCP-1可能成为肥胖相关性疾病十分有用的治疗靶点[3-4]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)在局部慢性炎症反应中起一定的作用,而高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)被认为具有抗动脉粥样硬化及心血管保护作用,但其作用机制尚不十分清楚。本研究观察载脂蛋白A-I模拟肽L-4F对oxLDL诱导下3T3-L1脂肪细胞表达分泌MCP-1的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

3T3-L1细胞株(中国科学院上海生命科学研究院),HDL(Sigma公司),H-89(Calbiochem公司),oxLDL(协和生化所),L-4F由深圳市翰宇生物工程有限公司合成。小鼠MCP-1 ELISA试剂盒由大连泛邦化工技术开发有限公司进口分装。Anti-C/EBPα、β及anti-β-actin抗体购自Santa Cruz公司。分离人外周血单核细胞及制备活化血清所需的静脉血标本来自中南大学湘雅二医院研究生院的健康志愿者。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1前脂肪细胞培养、诱导分化与鉴定 按照文献[5]的方法进行。

1.2.2 药物干预 脂肪细胞分化成熟后,用含0.2% BSA的无血清培养液饥饿疗法24 h后,分别用不同浓度L-4F(0、1、10、50 μg/ml)干预细胞18 h,或以PKA抑制剂H-89(10 μmol/L)预孵育细胞1 h后加入L-4F(50 μg/ml)干预18 h,弃去培养基,以PBS洗涤细胞2次,再加入50 μg/ml oxLDL共同孵育(1、6、12 h)。收取培养上清液及细胞-70 ℃冻存备用。

1.2.3 MCP-1浓度和mRNA表达的测定 使用小鼠MCP-1 ELISA试剂盒测定脂肪细胞上清液中MCP-1的浓度。RT-PCR法检测细胞mRNA表达,MCP-1引物:上游5′-ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCTC-3′,下游5′-TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC-3′,产物274 bp。内参GAPDH引物:上游5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物439 bp。PCR扩增条件为:94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,60 ℃(MCP-1)、58 ℃(GAPDH)退火30 s,72 ℃延伸50 s,循环36次。产物经1%琼脂糖凝胶电泳成像,以MCP-1与GAPDH扩增产物灰度值的比值代表MCP-1 mRNA的表达量。

1.2.4 Western blot检测C/EBPα、β 使用细胞核蛋白和细胞质蛋白抽提试剂盒提取核蛋白,BCA法定量。12% SDS-PAGE凝胶电泳,电泳后将蛋白转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭4 ℃过夜,加入兔抗小鼠多克隆C/EBPα、β抗体室温下作用2 h,然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔-IgG抗体室温作用1 h,BCIP/NBT显色液显色,5 min后蒸馏水终止反应。以小鼠β-actin作为内对照。

1.2.5 人外周血单核细胞趋化活性检测 分离并培养人外周血单核细胞。制备活化血清。采用改良的Boyden小室法检测单核细胞趋化活性。趋化试验分3组:①随机移动组,上室加入用DMEM制成的单核细胞悬液,下室加满与上室相同的培养基;②趋化运动组,上室加入单核细胞悬液,下室分别加入oxLDL刺激12 h后、不同浓度L-4F(1、10、50 μg/ml)干预后的脂肪细胞培养上清液;③阳性对照组,上室加入单核细胞悬液,下室加满活化血清。检测各组单核细胞移动距离。

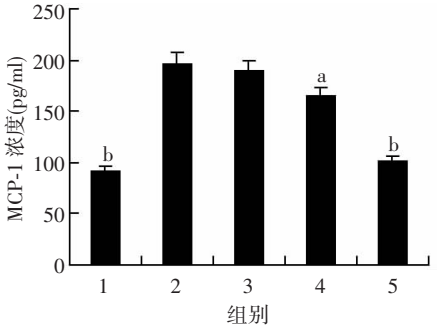
1.3 统计学方法

应用SPSS 11.5统计软件包进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多个样本间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 3T3-L1脂肪细胞上清液中MCP-1的浓度

50 μg/ml oxLDL刺激12 h使脂肪细胞上清液中MCP-1的浓度增加至2.13倍。1、10、50 μg/ml L-4F分别使MCP-1浓度降低8%、29%和91%(图1),提示L-4F对脂肪细胞分泌MCP-1的影响呈剂量依赖性。

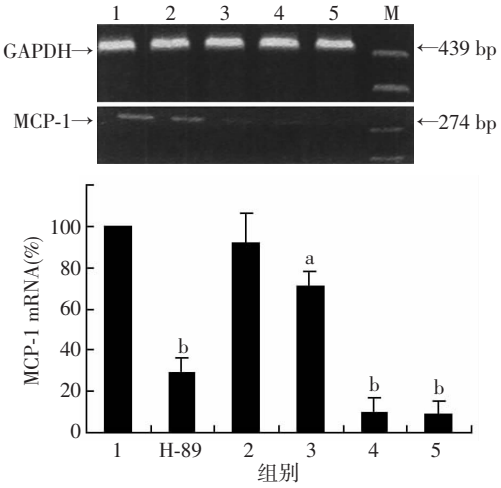


1:对照组;2:oxLDL 组;3:oxLDL + 1 μg/ml L-4F 组;4:oxLDL + 10 μg/ml L-4F 组;5:oxLDL + 50 μg/ml L-4F 组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 oxLDL 组比较

图 1　L-4F 对脂肪细胞上清液中 MCP-1 浓度的影响

2.2　L-4F 抑制 oxLDL 诱导的 MCP-1 mRNA 表达

在 oxLDL 作用 12 h 的 3T3-L1 脂肪细胞,1-4F 以浓度依赖的方式减少其 MCP-1 mRNA 的表达。其中10 μg/ml 和 50 μg/ml L-4F 干预使脂肪细胞 MCP-1 mRNA 表达减少(29 ± 8)% 和(91 ± 6)%($P<0.05$)(图 2)。在 oxLDL 刺激的脂肪细胞中仅加入 PKA 抑制剂 H-89 后,MCP-1 mRNA 的表达也显著减少(71 ± 7)%($P<0.01$),但在 50 μg/ml L-4F 作用的基础上,H-89 的孵育并未使得 MCP-1 mRNA 的表达进一步降低($P>0.05$)。



1:oxLDL 刺激组;2:oxLDL 刺激 + 1 μg/ml L-4F 干预组;3:oxLDL 刺激 + 10 μg/ml L-4F 干预组;4:oxLDL 刺激 + 50 μg/ml L-4F + H-89 干预组;5:oxLDL 刺激 + 50 μg/ml L-4F 干预组;M:标准;H-89:H-89孵育组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 oxLDL 刺激组比较

图 2　L-4F 对 oxLDL 诱导的 MCP-1 mRNA 表达的影响

2.3　L-4F 干预后的脂肪细胞上清液对单核细胞趋化活性的影响

阳性对照组的单核细胞移动距离明显大于随机移动组($P<0.01$);oxLDL 刺激 12 h 后的细胞上清液能明显增加单核细胞趋化活性,即使与阳性对照组比较差异亦有显著性($P<0.05$)。不同浓度 L-4F 干预 oxLDL 刺激的脂肪细胞后,单核细胞趋化活性呈浓度依赖性降低,与 oxLDL 刺激组比较,10 μg/ml L-4F 和50 μg/ml L-4F 干预组均具有显著性差异(表1)。

2.4　L-4F 对 C/EBPα、β 的影响

50 μg/ml oxLDL 刺激使得脂肪细胞 C/EBPβ 蛋白量增加,随着刺激时间的延长,C/EBPβ 蛋白量逐渐增加,提示 oxLDL 对 C/EBPβ 的影响呈时间依赖性,但是 C/EBPα 蛋白量在 oxLDL 刺激 1 ~ 12 h 内均无明显变化。在 oxLDL 刺激 1、6、12 h 时,使用 50 μg/ml L-4F 干预脂肪细胞后,C/EBPβ 蛋白量均较干预前降低,提示 L-4F 对 C/EBPβ 起抑制作用;而在 oxLDL 刺激 12 h 的脂肪细胞中,加入 10 μmol/ L H-89 干预组与加入 50 μg/ml L-4F 干预组比较,后者 C/EBPβ 蛋白量稍有减少(图 3)。

表 1　L-4F 干预对单核细胞趋化活性的影响(μm, $n=30$, $\bar{x}\pm s$)

组别	单核细胞移动距离
随机移动组	69.88 ± 8.19
oxLDL 刺激组	136.75 ± 8.03[a]
1 μg/ml L-4F 组	125.67 ± 6.25
10 μg/ml L-4F 组	109.03 ± 7.88[b]
50 μg/ml L-4F 组	85.37 ± 10.44[c]
阳性对照组	108.33 ± 5.04[ab]

a: $P<0.01$,与随机移动组比较;b: $P<0.05$, $P<0.01$,与 oxLDL 刺激组比较

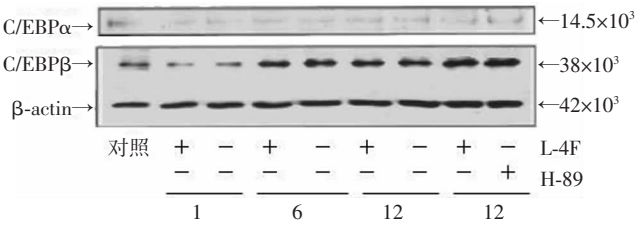


图 3　oxLDL 刺激不同时间及 L-4F ± H-89 干预对 C/EBPα、β 的影响

3　讨论

目前已知,多种细胞均可被诱导分泌 MCP-1,其中包括成熟的脂肪细胞[6]。本研究也发现,分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞能分泌一定量的 MCP-1,经 oxLDL 刺激后,其分泌水平较基础水平明显增高。由于 MCP-1 对单核细胞或巨噬细胞具有很强的趋化性,本研究检测了 oxLDL 刺激后 3T3-L1 脂肪细胞上清液对健康人外周血单核细胞趋化活性的影响,结果发现,oxLDL 刺激组单核细胞趋化活性明显强于阴性对照组。提示 oxLDL 也是 MCP-1 的有力诱导物之一。

高密度脂蛋白(HDL)具有确切的抗动脉粥样硬化的作用,该效应部分与其抗炎作用有关[7-8],且主要是通过载脂蛋白 A-I 来实现的[9-11]。本研究发现,载脂蛋白 A-I 模拟肽 L-4F,呈浓度依赖性地抑制 oxLDL 诱导脂肪细胞 MCP-1 的表达与分泌,并明显减弱单核细胞趋化活性。这与已经发现的 HDL 能对抗 oxLDL 的致炎症作用[12-13]是一致的。但 L-4F 抑制 oxLDL 诱导脂肪细胞分泌 MCP-1 的具体分子机制尚不清楚。Zoico 等[14]发现,在脂多糖刺激的 3T3-L1 脂肪细胞,脂联素能通过抑制 IκB-α 及 IKK 的表达,增加 PPARγ 的表达,使 NF-κB 活性减弱,从而减少 MCP-1 的表达。本实验室的前述研究发现,HDL 可能通过活化 cAMP-PKA 信号通路,减少 IκB 降解,抑制 NF-κB 活化,从而对抗 oxLDL 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞的炎症反应,减少 TNFα 的表达分泌。但是,HDL 的这种抗炎效应只是

部分地与PKA-IκB-NF-κB信号通路有关,因此推测还有其他未知的信号通道参与其中。

CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBPs)是NF-κB以外的另一类重要的细胞核转录调控因子。研究发现,在高胰岛素血症鼠的主动脉内,C/EBPβ及C/EBPδ的表达与MCP-1的表达明显相关[15];TNF-α通过上调C/EBPβ的表达,能增加脂肪细胞MCP-1的表达及分泌[16];C/EBPα能调节脂多糖刺激下衰老的脂肪细胞MCP-1的表达[17]。因此,我们提出假想,oxLDL诱导脂肪细胞MCP-1的表达是否也有C/EBPs家族的参与和调控,且L-4F的抗炎作用机制中是否有C/EBPs家族的参与。

本研究发现,oxLDL刺激12 h内3T3-L1脂肪细胞C/EBPα的蛋白量一直未见明显变化,而C/EBPβ的蛋白量则随着oxLDL刺激时间的延长逐渐增加。L-4F干预脂肪细胞后能降低oxLDL诱导的C/EBPβ的蛋白量,推测L-4F可能通过抑制C/EBPβ启动子的活化进而抑制C/EBPβ的转录水平,或者直接抑制C/EBPβ的转录,最终导致C/EBPβ蛋白合成减少。

Vogel等[18]发现,C/EBPβ启动子的活化是通过位于C/EBPβ基因TATA盒附近的不完全性cAMP-应答元件结合蛋白(CREB)位点实现的。C/EBPβ启动子的活性能被蛋白激酶A(PKA)抑制剂H-89完全阻断;CREB和PKA表达质粒的共转染实验更进一步证实了C/EBPβ的转录是通过PKA依赖的CREB的活化来实现的[18]。本研究也发现,H-89干预脂肪细胞后,C/EBPβ的蛋白量减少,提示oxLDL诱导的3T3-L1脂肪细胞表达C/EBPβ也存在PKA依赖性。观察L-4F和(或)H-89对oxLDL诱导的MCP-1 mRNA表达的影响发现,L-4F和H-89都降低脂肪细胞MCP-1的表达;在降低MCP-1表达的程度上,L-4F强于H-89,且L-4F和H-89共干预后并未使脂肪细胞MCP-1表达水平在单用L-4F的基础上再明显降低。由此我们可以推论,L-4F抑制oxLDL诱导的脂肪细胞表达分泌MCP-1可能主要通过PKA-C/EBPβ信号途径,即L-4F阻断PKA的活性,从而抑制C/EBPβ启动子的激活,进而减少C/EBPβ的转录和合成,最终使MCP-1的表达和分泌减少,起到对抗oxLDL诱导的脂肪细胞炎症反应的作用。

参考文献:

[1] Boring L, Gosling J, Cleary M, *et al*. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis[J]. Nature, 1998, 394(6696): 894-897.

[2] Ohman M K, Eitzman D T. Targeting MCP-1 to reduce vascular complications of obesity[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2009, 4(3): 164-176.

[3] Yu R, Kim C S, Kwon B S, *et al*. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice[J]. Obesity (Silver Spring), 2006, 14(8): 1353-1362.

[4] Zhang H, Cui J, Zhang C. Emerging role of adipokines as mediators in atherosclerosis[J]. World J Cardiol, 2010, 2(11): 370-376.

[5] 谢湘竹, 赵水平, 于碧莲, 等. HDL和ApoA-Ⅰ模拟肽对3T3-L1脂肪细胞脂联素表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1034-1038.

[6] Woo H M, Kang J H, Kawada T, *et al*. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes[J]. Life Sci, 2007, 80(10): 926-931.

[7] Barter P J, Nicholls S, Rye K A, *et al*. Antiinflammatory properties of HDL[J]. Circ Res, 2004, 95(8): 764-772.

[8] Feig J E, Rong J X, Shamir R, *et al*. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(17): 7166-7171.

[9] Navab M, Anantharamaiah G M, Reddy S T, *et al*. Apolipoprotein A-I mimetic peptides[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(7): 1325-1331.

[10] Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, *et al*. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(11): 1104-1109.

[11] Getz G S, Reardon C A. Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis[J]. J Inflamm Res, 2011, 4: 83-92.

[12] Robbesyn F, Garcia V, Auge N, *et al*. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells[J]. FASEB J, 2003, 17(6): 743-745.

[13] Robbesyn F, Auge N, Vindis C, *et al*. High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(6): 1206-1212.

[14] Zoico E, Garbin U, Olioso D, *et al*. The effects of adiponectin on interleukin-6 and MCP-1 secretion in lipopolysaccharide-treated 3T3-L1 adipocytes: role of the NF-kappaB pathway[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(6): 847-851.

[15] Sato Y, Nishio Y, Sekine O, *et al*. Increased expression of CCAAT/enhancer binding protein-beta and -delta and monocyte chemoattractant protein-1 genes in aortas from hyperinsulinaemic rats[J]. Diabetologia, 2007, 50(2): 481-489.

[16] Ito Y, Daitoku H, Fukamizu A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBP beta in TNF-alpha-treated adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(2): 290-295.

[17] Zoico E, Di-Francesco V, Olioso D, *et al*. *In vitro* aging of 3T3-L1 mouse adipocytes leads to altered metabolism and response to inflammation[J]. Biogerontology, 2010, 11(1): 111-122.

[18] Vogel C F, Sciullo E, Park S, *et al*. Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8886-8894.

(收稿:2012-03-16;修回:2012-04-06)

(编辑 汪勤俭)