基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0488-05

高脂、炎症状态下 Api6 在巨噬细胞中的表达研究

刘 丹[1],张 勇[1],李 越[2],龚 雪[1],练雪梅[1]

(1. 重庆医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学脂质研究中心、感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:凋亡抑制因子 6(Apoptosis inhibitor 6,Api6)是清道夫受体富含半胱氨酸残基家族新成员,在免疫反应、肿瘤发生中发挥着重要的作用;但作为清道夫受体,Api6 在脂质代谢中的作用尚未得到深入研究。方法:本文采用脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)和氧化低密度脂蛋白(Oxidized low-density lipoprotein,oxLDL)刺激细胞建立炎症和高脂模型,定量 RT-PCR 检测初步探讨了 Api6 在体外培养的 2 种单核/巨噬细胞株:RAW264.7 细胞和 THP-1 细胞中的表达水平。结果:研究发现 200 ng/ml 的 LPS 和 100 μg/ml 的 oxLDL 处理可以导致体外培养的 2 种巨噬细胞出现异常的脂质蓄积,清道夫受体 SRA 在 RAW264.7 细胞和 THP-1 细胞中的表达分别上调了 6 倍、2.5 倍和 6 倍、44 倍。但同样处理条件下,Api6 在 RAW264.7 细胞的表达没有明显上调;而炎症和高脂同时存在时,Api6 在 THP-1 细胞中的表达却上调了 2.7 倍。结论:不同处理条件下,Api6 的表达水平与肝核受体(Nuclear receptor liver X receptor,LXR)受体 α 亚型的表达水平明显相关;由于缺乏 LXRα 受体,体外培养的小鼠巨噬细胞株 Raw264.7 细胞 Api6 基础表达量较低,因此可以作为载体细胞,用以建立过表达 Api6 的细胞模型深入研究 Api6 在脂质代谢中的作用。

【关键词】凋亡抑制因子 6;核受体 LXR;RAW264.7 细胞;THP-1 细胞

【中国图书分类法分类号】R364.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-04

In vitro study of Api6 expression in lipid loading and inflammatory macrophages

LIU Dan, et al

(*Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: Apoptosis inhibitor 6 (Api6), also known as AIM(Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophage) or SPα (Soluble Protein alpha), is a newly defined member of the group B scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily. Previous studies have suggested its important roles in immune system regulation, but the involvement of Api6 in lipid metabolism is seldomly studied. ***Methods***: The aim of this study was to define the expression pattern of Api6 in lipid loading and inflammatory macrophages. The human monocyte/macrophage lineage THP-1 cells and murine Raw264.7 macrophages were incubated in the presence of 100 μg/ml oxidized low-density lipoprotein(oxLDL) alone, LDL plus 200 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) and LPS alone. ***Results***: Foam cell formation after treatment was evidenced by oil red O staining. Real-time PCR results showed that after LPS or oxLDL treatment, the mRNA levels of Scavenger receptor SRA were increased 6-fold, 2.5-fold and 6-fold, 44-fold in Raw264.7 cells and THP-1 cellls respectively, but the expression of Api6 in Raw264.7 did not change. The mRNA levels of Api6 increased 2.7-fold after LPS and oxLDL treatment in THP-1 cells. ***Conclusion***: The expression levels of Api6 in these macrophages were highly related to the presence of nuclear receptor liver X receptor (LXR) isoform LXRα. This study revealed that due to the lack of LXRα isoform, the basic expression level of Api6 was low in Raw264.7 macrophages, that makes it an ideal cell line for further study related to pathophysiological function of Api6 in lipid metabolism.

【Key words】Apoptosis inhibitor 6; Liver X receptor; Raw264.7 cell; THP-1 cell

凋亡抑制因子 6(Apoptosis inhibitor 6,Api6)是清道夫受体富含半胱氨酸残基家族新成员,又常被称作 AIM(Apoptosis inhibitor expressed by Macrophage),或 SPα(Soluable protein alpha)[1]。早期研究发现 Api6 主要由淋巴组织的巨噬细胞表达,具有抑制 $CD4^+/CD8^+$ 胸腺细胞凋亡的作用,因此在胸腺选择中发挥重要的作用[2]。近年研究发现 Api6 也可以在组织巨噬细胞和上皮细胞中表达,其在细菌感染、炎症反应、肿瘤发生中的作用又得到了进一步的研究[3-5]。由于 Api6 是核受体:肝 X 受体(Liver X receptor, LXR)的靶基因[6],Api6 在动脉粥样硬化、脂质代谢中的作用开始受到人们的关注,本文重点探讨了高脂、炎症状态下,Api6 在体外实验常用细胞株:小鼠巨噬细

作者介绍:刘 丹(1983-),女,硕士,
研究方向:脂质代谢与营养相关性疾病。
通讯作者:练雪梅,女,副教授,E-mail: xuemeil@hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:NSFC30600660);教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留 2007-1108 号)。

胞株 RAW264.7 和人单核/巨噬细胞株 THP-1 中的表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人单核/巨噬细胞株 THP-1 购自中科院上海生命科学研究院生化与细胞所,小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 由重庆医科大学脂质研究中心存留。

主要试剂 RPMI1640 培养液,小牛血清,胎牛血清(Hyclone);PMA;lipopolysaccharide,LPS (Sigma);Trizol(Takara);T0901317(Cayman Chemical);逆转录试剂盒,SYBR Green PCR 试剂盒(ABI);Fugene HD 转染试剂(Roche)。

1.2 细胞培养、传代

RAW264.7 细胞常规培养于含 10 %新生小牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中。培养条件为 37℃,5 % CO_2,每隔 1 ~ 2 d 用 0.25 %胰蛋白酶液消化,1 × 10^5 个细胞数传代。THP-1 细胞规培养于含 10 %标准胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中。培养条件为 37℃,5 % CO_2,每隔 3 ~ 5 d 2 × 10^6 个细胞数传代。

THP-1 细胞 PMA 诱导分化:在细胞生长培养基中加入佛波酯 PMA 使其终浓度为 160 nmol/L, 诱导 72 h。Real time-PCR 鉴定 THP-1 细胞经 PMA 诱导后,巨噬细胞标志物:清道夫受体 A(Scavenger receptor A,SR-A)的表达,引物序列及反应条件见材料和方法 1.5 Real-time PCR。

LPS 和高脂处理的适宜浓度和作用时间由 MTT 法筛选建立。

1.3 人血浆 LDL 的纯化和氧化 oxLDL 的制备

LDL 纯化步骤 采用密度梯度超速离心法分离人血清 LDL(d=1.03 ~ 1.05)[7];新鲜人血浆中加入溴化钠调节血浆密度,62 000 r/min 4℃离心 14 h,吸出中间层,加入溴化钠后再次 62 000 r/min 4℃离心 14 h,吸出顶层即得 LDL;LDL 经桥联琼脂糖电泳显示为单一蛋白带。

oxLDL 氧化步骤 将 LDL 置于含 10 μmol/L $CuSO_4$ 的PBS 溶液(pH7.2)中,37℃氧化 24 h;然后加入含有 200 μmol/L EDTA 的 PBS 液透析 24 h 终止氧化,0.22 μm 过滤除菌,4℃存放。

1.4 油红 O 染色

THP-1 细胞接种于 6 孔板,PMA 处理 72 h 诱导分化为巨噬细胞;RAW264.7 接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,无血清培养 4 h,再加入 oxLDL、LPS 等处理因素 24 h 后油红 O 染色,苏木素复染,显微镜下观察并照相。

1.5 Real-time PCR

采用 Trizol 试剂抽提 RAW264.7 和 THP-1 各处理组细胞总 RNA,然后按 ABI 公司试剂盒建议实验方案进行逆转录和 PCR 反应。

Real time-PCR 引物用 Primer Premier 5 软件自行设计,由上海生工生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

Real time-PCR 检测 采用 ABI 公司 IQ5 荧光 PCR 仪。反应体系为 SYBR GREEN PCR 混合液 12.5 μl,上下游引物(25 μmol/L)各 0.25 μl,灭菌去离子水 10 μl,模板 2 μl 反应条件为 95℃ 10 min,然后 95℃ 15 s,60℃15 s,72℃ 15 s 收集荧光,40 个循环。

每次实验每个处理因素检测 3 个平行样,每个实验进行至少 3 次,本文中呈现的是其中具有代表性的 1 次实验数据。

1.6 瞬时转染 Api6/pcDNA3.1 质粒

将含有 Api6 cDNA 全长的 Api6/pcDNA3.1 质粒用 Fugene HD 试剂(Roche 公司)对 RAW264.7 细胞进行瞬时转染,转染试剂量(ml)与 DNA 量(μg)比例为 7:2。在含 10 %

表 1 Real time-PCR 引物序列

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
R*beta-actin	GGCACCACACCTTCTACAATGAG	GACCAGAGGCATACAGGGACAG
R* Api6	TGGCCATCTTGAGCATTTTTG	GCTGCACTTTGGTTGGAGACT
R* SR-A	GAGTCCGTGAATCTACAGCAAAGC	CTGAGGTCGTTGGTGATGTTGTTC
R* CD36	TGCGACATGATTA ATGGCACAGAC	ATCCGAACACAGCGTAGATAGACC
R* LXRalpha	AGGAGTCTGTGCTGTCAGAAGAAC	TCCTCTTCTTGCCGCTTCA
R* LXRbeta	ATGTCTTCCCCCACAAGTTCT	GACCACGATGTAGGCAGAGC
R* ABCA1	CGCTTCGTCTCTCCGCTCTC	CCGCCTCACATCCTCATCCTC
R* ABCG1	TGCTGCCTCACCTCACTGTTC	TCTCGTCTGCCTTCATCCTTCTC
T* beta-actin	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTA
T* Api6	AACCTCTGCTCTGGGCGACT	CATACCACCTGGTCCTCCTTTTC
T* SR-A	GCACTGATTGCCCTTTACCTCC	TTTCCTCTTCGCTGTCATTTCC
T* CD36	TCATCGCTGGGGCTGTCA	TGTTGCTGCTGTTCATCATCACT
T* LXRalpha	TCTGGAGACATCTCGGAGGTACA	CAAGGCAAACTCGGCATCAT
T* LXRbeta	CTCCTGAAGGCATCCACTATCG	GGTGGAAGTCGTCCTTGCTGTA
T* ABCA1	CTTCCTGTCCGTGTTTGCTGT	TCCAATGCCCTGCTCCTCA
T* ABCG1	GGGTCGCTCCATCATTTGC	ATCTGCTGGGTTGTGGTAGGTT

R*: RAW264.7 T*:THP-1

新生小牛血清,不含抗生素的 RPMI1640 培养基中转染 16 h 后,提取细胞总 RNA,Real time-PCR 检测瞬时转染前后 Api6 的表达量。

2 结 果

2.1 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的形态学和 SR-A 表达量检测(图 1)

THP-1 细胞未经 PMA 处理时,呈悬浮生长,无伪足(图 1A);经 PMA 诱导 72 h 后,贴壁,伸出伪足,细胞呈梭型,多角型等多种形态(图 1B);Real time PCR 结果证实 PMA 诱导后显著增加了巨噬细胞标志物—清道夫受体 SR-A mRNA 的表达(图 1C),表明巨噬细胞诱导成功。以下实验中提及的 THP-1 细胞均为 PMA 诱导后的细胞。

2.2 不同处理条件下巨噬细胞油红 O 染色结果(图 2)

油红 O 染色用以检测巨噬细胞内中性脂质的蓄积情况。实验结果显示 RAW 264.7 和 THP-1 2 种细胞株,单纯 100 μg/ml oxLDL 处理(以下简称高脂处理)时,细胞内红染脂滴蓄积明显(B、F);单纯 200 ng/ml LPS 处理(以下简称炎症处理)时,细胞内红染脂滴蓄积不明显(C、G);当炎症和高脂共同处理条件下,细胞内红染脂滴蓄积显著增加(D、H)。

2.3 高脂、炎症状态下 CD36、SR-A 在 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中的表达(图 3)

实验结果表明,RAW264.7 细胞在单纯炎症,单纯高脂,以及炎症和高脂共同处理条件下,清道夫受体 SR-A 表达分别上调了 6 倍,2.5 倍和 6.4 倍;THP-1 细胞在单纯炎症,单纯高脂,以及炎症和高脂共同处理条件下,SR-A 表达分别上调了 6 倍,44 倍和 19 倍;单纯高脂处理时,CD36 表达上调了 10 倍。

2.4 高脂、炎症状态下 Api6 在 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中的表达(图 4)

实验结果表明,在 RAW264.7 细胞,除单纯炎症组 Api6 的表达轻微上调 1.6 倍以外,其他各处理组 Api6 的表达没有明显差异;LXR 受体激动剂 T0901317 没有使 Api6 的表达上调。作为阳性对照,在含 Api6 cDNA 序列的 Api6/PCDNA3.1 质粒瞬时转染 RAW264.7 细胞后,Api6 表达上调了 12 500 倍。在 THP-1 细胞,炎症和高脂同时处理以及 LXR 受体激动剂 T0901317 处理使 Api6 的表达上调了 2.7 倍和 2 倍。

2.5 高脂、炎症状态下 LXRalpha 和 LXRbeta 在 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中的表达(图 5)

实验结果表明,在 RAW264.7 细胞,除单纯炎症组 LXRalpha 的表达上调 2.1 倍以外,其他各处理组 LXRalpha 的表达没有明显差异;在 THP-1 细胞,单纯高脂组 LXRalpha 的表达上调了 5.8 倍,LXR 受体激动剂 T0901317 处理使 LXRalpha 和 LXRbeta 的表达分别上调了 3.7 和 4.2 倍。

2.6 LXR 受体激动剂 T0901317 刺激下 ABCA1 和 ABCG1 在 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中的表达(图 6)

实验结果表明,RAW264.7 细胞在 LXR 受体激动剂 T0901317 作用下,ABCA1 和 ABCG1 分别上调了 22 倍和 7 倍;THP-1 细胞在 LXR 受体激动剂 T0901317 作用下,ABCA1 和 ABCG1 均上调了 9 倍。

3 讨 论

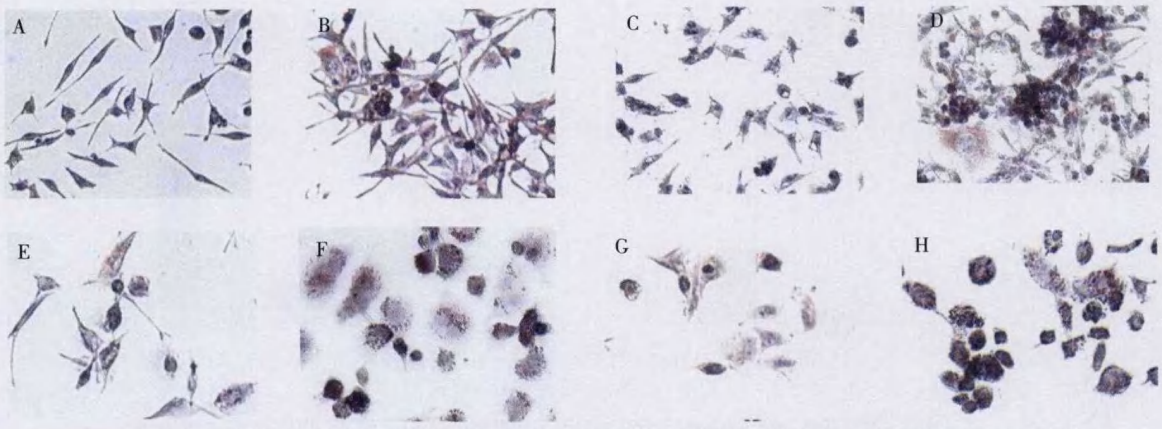
巨噬细胞过量蓄积胆固醇而泡沫化是动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)的早期病理学基础[8]。AS 发生时,LDL 很容易受到氧化或乙酰化等修饰,由于缺乏有效的负反馈调节机制,在清道夫受体(Scavenger receptors, SR)的介导下,巨噬细胞可以不断地摄取修饰性 LDL 而泡沫化。目前清道夫受体家族成员中,清道夫受体 A(Scavenger receptor-A,SR-A)和 CD36 是介导巨噬细胞膜摄入修饰性 LDL 的主要受体[9],但其他清道夫受体家族成员在介导脂质转运中的作用也不容忽视[10]。Api6 是清道夫受体家族中富含半胱氨酸残基超家族新成员(Scavenger receptor cysteine-rich superfamily,SRCR-SF)[2],Arai S 等[1]的研究发现,Api6 在粥样硬化斑块的泡沫化巨噬细胞中高度表达,Api6 基因敲除小鼠(aim-/- 小鼠)的早期动脉粥样硬化病变程度明显降低;研究者认为 Api6 的促动脉粥样硬化机制与其凋亡抑制作用有关,但作为清道夫受体,Api6 在脂质代谢中的作用尚未得到深入的研究。

炎症和高脂是脂代谢异常相关疾病如动脉粥样硬化、糖尿病和肥胖等共同的病理基础,本研究采用 200 ng/ml LPS 和 100 μg/ml oxLDL 刺激体外培养的小鼠 RAW264.7 和人 THP-1 巨噬细胞建立炎症和高脂模型,油红 O 染色结果显示单纯高脂可以导致两种细胞内脂质的蓄积,但炎症和高脂同时存在的情况下,巨噬细胞对脂质的蓄积增加(图 2)。定量 RT-PCR 检测结果显示,介导 oxLDL 摄取的清道夫受体



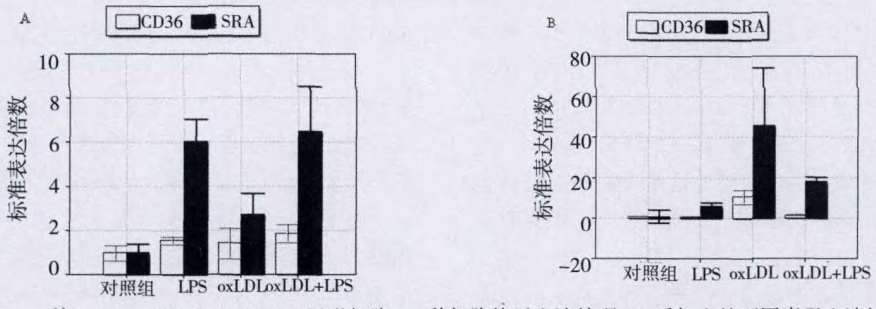
注:A. 自然状态下的 THP-1;B. 经 160 nmol/L PMA 处理 72 h 后的 THP-1 巨噬细胞;C. PMA-:未经 PMA 处理的 THP-1,PMA 72 h:160 nmol/L PMA 处理 72 h 后的 THP-1 巨噬细胞。Beta-actin 作为管家基因,SR-A 基因 mRNA 表达的 Real time-PCR 结果,由 Bio-Rad 公司的 IQ 5 软件采用 pfaffl 方法计算(以下 Real time-PCR 实验内参和计算方法均相同)

图 1 PMA 诱导分化 THP-1 为巨噬细胞(200×)



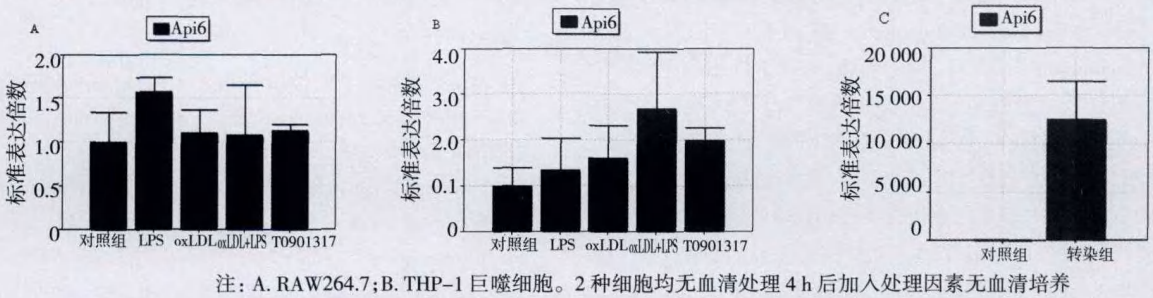
注：A～D. RAW264.7；E～H. THP-1 巨噬细胞。2 种细胞均无血清培养 4 h 后加入处理因素无血清培养 24 h。A 和 E 为对照组，B 和 F 中加入 100 g/ml oxLDL，D 和 H 中加入 100 g/ml oxLDL 和 200 ng/ml LPS，C 和 G 中加入 200 ng/ml LPS

图 2 巨噬细胞脂质蓄积的油红 O 染色（200×）



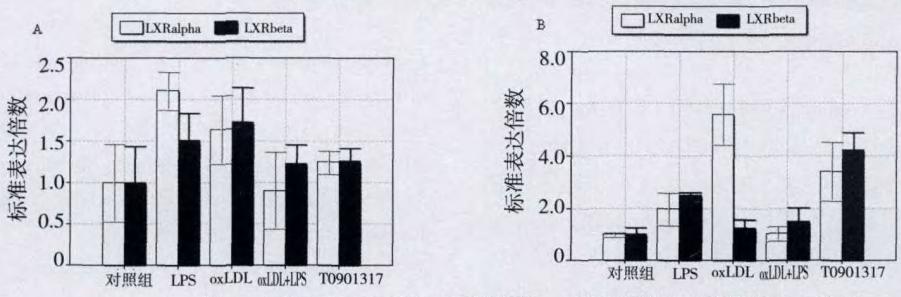
注：A. RAW264.7；B. THP-1 巨噬细胞。2 种细胞均无血清处理 4 h 后加入处理因素无血清培养 24 h。处理因素加入浓度为 200 ng/ml LPS，100 g/ml oxLDL

图 3 高脂和炎症下 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中 CD36 和 SR-A 的 mRNA 表达水平



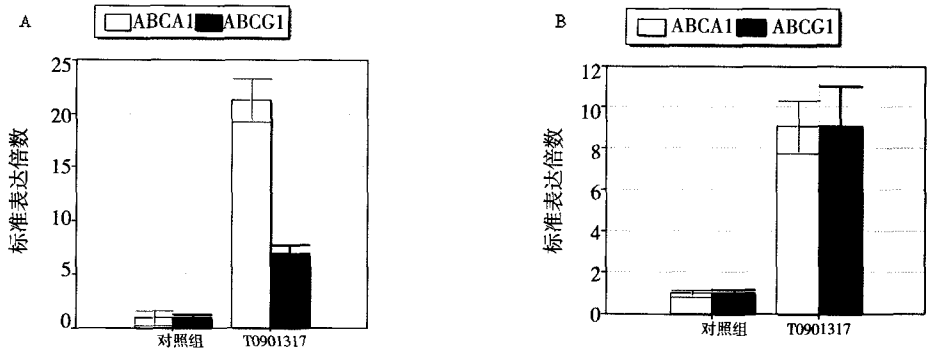
注：A. RAW264.7；B. THP-1 巨噬细胞。2 种细胞均无血清处理 4 h 后加入处理因素无血清培养 24 h。处理因素加入浓度为 200 ng/ml LPS，100 g/ml oxLDL。C. Api6/PCDNA3.1 质粒瞬时转染 RAW264.7 细胞后 Api6 mRNA 表达水平

图 4 高脂和炎症下 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中 Api6 的 mRNA 表达水平



注：A. RAW264.7；B. THP-1 巨噬细胞。2 种细胞均无血清处理 4 h 后加入处理因素无血清培养 24 h。处理因素加入浓度为 200 ng/ml LPS，100 g/ml oxLDL，10 mol/L T0901317

图 5 高脂和炎症下 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞中 LXRalpha 和 LXRbeta 的 mRNA 表达水平



注：A. RAW264.7；B. THP-1 巨噬细胞。2 种细胞均无血清培养 4 h 后加入 10 mol/L T0901317 无血清处理 24 h

图 6 T0901317 处理 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞后 ABCA1 和 ABCG1 的 mRNA 表达水平

SRA 和 CD36 在炎症和高脂刺激下的表达也明显升高；与对照组细胞相比，高脂状态下，SRA 和 CD36 在 RAW264.7 细胞中的表达分别上调了 2.5 倍和 1.5 倍；在 THP-1 细胞中分别上调了 44 倍和 12 倍(图 3)。但同样各种处理条件下，在 Raw264.7 细胞，除单纯炎症组 Api6 的表达轻微上调 1.6 倍以外，其他各处理组 Api6 的表达没有明显差异；在 THP-1 细胞，炎症和高脂同时处理以及 LXR 受体激动剂 T0901317 处理均可以使 Api6 的表达分别上调 2.7 和 2 倍(图 4)。

为了解不同巨噬细胞株 Api6 的表达对炎症和高脂刺激存在不同反应的机制所在，本研究深入探讨了 Api6 的表达水平与 LXR 不同亚型表达水平之间的相关性。LXR 是核受体家族成员之一，在维持体内脂质代谢平衡和抗炎反应中都发挥着重要的作用：在肝外组织细胞，LXR 诱导胆固醇逆转运相关基因如三磷酸腺酐结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter-A1，ABCA1)，三磷酸腺酐结合盒转运体 G1(ATP binding cassette transporter-G1，ABCG1)以及载脂蛋白 E(Apolipoprotein E，ApoE)的表达，有利于细胞内胆固醇的清除；在肝脏组织细胞，LXR 诱导胆酸合成相关基因如胆固醇 7α 羟化酶(CYP7A1)的表达；LXR 同时具有抑制促炎症反应相关基因如 iNOS，IL-6，IL-1β 的表达的作用[11]。2003 年，Maxwell KN[12]等采用基因芯片分析比较了不同胆固醇含量饲料(0.5%与 0%)喂养的小鼠肝脏的差异表达基因，在 32 个上调的基因中，13 个基因同时受 LXR 受体激动剂 T0901317 的调控，Api6 是其中之一。2004 年，Joseph SB 等[6]直接证实了 Api6 基因启动子区域 -5404 位点存在 LXR 的反应元件，是 LXR 的靶基因之一；该研究同时发现 Api6 受 LXR 的调控具有亚型选择性，它特异性地受到 LXRα、而不是 LXRβ 的调控。

本研究结果发现：Api6 在各种处理条件下表达水平的变化趋势与 LXRα 的表达水平基本一致(图 4，5)。在 RAW264.7 细胞，除单纯炎症组 LXRα 的表达上调 2 倍以外，其他各处理组 LXRα 的变化都不明显；与此相对应的是 Api6 也只在单纯炎症组存在轻微的上调。作为阳性对照，LXR 受体激动剂 T0901317 可以使 RAW264.7 细胞中 LXR 没有亚型选择性的其它靶基因 ABCA1 和 ABCG1 表达分别上调 22 倍和 7 倍。Venkateswaran A 等的研究也发现 LXRα 在 RAW264.7 细胞中的表达水平很低[13]。在 THP-1 细胞，LXR 受体激动剂 T0901317 使 LXRα 的表达上调了 3.7 倍，与此对应的是，Api6 在 THP-1 细胞中的表达也上调了 2 倍。因此，LXRα 的低表达可能是导致 RAW264.7 细胞 Api6 基础表达量低的原因之一。THP-1 细胞由于可以同时表达 LXRα 和 LXRβ 受体，一定刺激条件下 Api6 的表达可以受 LXRα 的调控而上调。

近年来，有关 Api6 的研究不仅在脂代谢领域开始起步，在其他领域的研究也逐渐活跃和扩展开来，已有研究发现巨噬细胞过表达 Api6 可以导致小鼠肺癌的发生[5]；Api6 在特应性皮炎、丙型肝炎导致的肝纤维化和哮喘患者中的表达也异常升高[14-16]。本研究结果提示，由于缺乏 LXRα 受体，RAW264.7 细胞 Api6 的基础表达量较低，因此它可以作为载体细胞，应用于建立过表达 Api6 或 LXRα 的细胞模型，进一步研究 Api6 在脂质代谢、免疫反应和肿瘤发生中的作用。

参 考 文 献

[1] Arai S, Shelton J M, Chen M, et al. A role of the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development[J]. Cell Metab, 2005, 1(3): 201-213.

[2] Miyazaki T, Hirokami Y, Matsuhashi N, et al. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily[J]. J Exp Med, 1999, 189(2): 413-422.

[3] Valledor A, Hsu L, Ogawa S, et al. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(51): 17813-17818.

[4] Haruta I, Kato Y, Hashimoto E, et al. Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages[J]. J Biol Chem, 2001, 276(25): 22910-22914.

[5] Qu P, Du H, Li Y, et al. Myeloid-specific expression of Api6/AIM/Spα induces systemic inflammaiton and adenocarcinoma in the lung[J]. J Immunol, 2009, 182(3): 1648-1659.

[6] Joseph S B, Bradley M N, Castrillo A, et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response[J]. Cell, 2004, 119(2): 299-309.

[7] Hamilton T A, Ma G, Chisolm G M. Oxidized low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0493-04

下调 PTEN 基因对缺氧损伤后海马神经元 NR2B 受体调控机制研究

陈力学[1],刘宝松[2],石少权[3],周冀英[1],桂 蓓[1],邵 阳[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院实验研究中心、重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;2.第三军医大学大坪医院野战外科研究所三室,重庆 400042;3.中山大学附属第五医院妇产科,珠海 519000)

【摘 要】目的:探讨用 RNAi 干扰技术下调第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶张力蛋白基因(Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten,PTEN)对缺氧损伤引起的神经元 NR2B 受体表达调控机制。方法:建立海马神经元培养缺氧缺糖(Oxygen-glucose deprivation,OGD)损伤模型,转染 shRNAspten-GFP 质粒,采用细胞比色分析(Colorimetric assay)法观察神经元膜表面 NR2B 含量,RT-PCR 测定 NR2B 受体的 mRNA 的表达,采用 Fura 2-AM 法测定胞内 Ca^{2+} 浓度,AlamarBlue 进行神经元活力分析。结果:shRNAspten-GFP 能成功转染到神经元中;细胞比色法显示神经元膜表面有大量 NR2B 表达,与 PshGFP 对照组相比 shRNAspten 治疗组 NR2B 含量明显降低($P<0.05$),RT-PCR 测定结果与细胞比色法结果基本一致;OGD 损伤组比正常组胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高($P<0.05$),转染 PTEN 基因后胞内 Ca^{2+} 浓度比 PshGFP 对照组明显降低($P<0.05$);无关对照 PshGFP 组神经元活力较正常对照组和治疗组均有显著下降($P<0.05$)。结论:下调 PTEN 基因可降低 NR2B 的表达,阻断 Ca^{2+} 内流,增加细胞活力,从而保护神经元损伤。

【关键词】PTEN;shRNAs;Fura 2-AM;AlamarBlue 测定;细胞比色分析

【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-12

The regulation mechanism of shRNAspten to NR2B after neuron subjected to anoxia insult

CHEN Li-xue, et al

(*Laboratory Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the regulation of PTEN with RNAi on NR2B after OGD. *Methods*: In the OGD model with anaerobic gas mixture and deoxygenated, glucose-free extracellular solution, shRNAspten-GFP and unrelated control plasmid PshGFP transfection were done respectively. The quantities of NR2B in the neuronal membrane were quantitatively measured with colorimetric assay, and the expression of NR2B mRNA were analyzed by RT-PCR. The neuronal activity was analyzed by AlamarBlue and

作者介绍:陈力学(1973-),男,助理研究员,博士,研究方向:中枢神经系统继发性损害发生机制。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2007BB5287)。

stimulated murine peritoneal macrophages[J].J Immunol 1990,144(6):2343-2350.

[8] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications[J]. J Clin Invest,2002,110(7):905-911.

[9] Kunjathoor V V,Febbraio M,Podrez E A,et al. Scavenger receptors class A-Ⅰ/Ⅱ and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages[J]. J Bio Chem, 2002, 277(51): 49982-49988.

[10] Greaves D R,Gordon S.Thematic review series:The immune system and atherogenesis,Recent insight into the biology of macrophage scavenger receptors[J]. J lipid res,2005, 46(1):11-20.

[11] Bensinger S,Tontonoz P.*Integration of metabolism and inflammation* by lipid-activated nuclear receptors[J].Nature,2008,454(7203):470-477.

[12] Maxwell K, Soccio R, Duncan E ,et al. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice[J]. J Lipid Res,2003, 44(11): 2109-2119.

[13] Venkateswaran A,Laffitte B A,Joseph S B,et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR[J]?Proc.Natl. Acad. Sci. USA,2000,97(22):12097-12102.

[14] Kim W,Hwang H,Kim D,et al.Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis:CD5L and ApoE as potential biomarkers[J]. Exp Mol Med, 2008, 40(6): 677-685.

[15] Gangadharan B,Antrobus R, Dwek R,et al.Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients[J].Clin Chem,2007,53(10): 1792-1799.

[16] Wu J, Kobayashi M, Sousa E,et al. Differential proteomic analysis of *bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen* challenge[J]. Mol Cell Proteomics,2005,4(9):1251-1264.

(责任编辑:冉明会)