

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.03.004

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250303.1613.002\(2025-03-03\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250303.1613.002(2025-03-03))

外被体蛋白 I 参与载脂蛋白 A-1 介导泡沫细胞胆固醇流出的作用研究

洪伟涛,张飞龙,黄 婕,梁钰敏,陈耿基,陈晓佳,马卫列,丁 航,张志珍[△]
(广东医科大学基础医学院,广东东莞 523808)

[摘要] **目的** 建立人单核 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型,分析外被体蛋白 I (COP I) 的 α -COP 亚基在载脂蛋白 A-1 (apoA-1) 介导泡沫细胞胆固醇流出过程中的作用。**方法** 采用佛波酯 (PMA) 诱导 THP-1 细胞贴壁 (PMA 组) 后加入乙酰化低密度脂蛋白 (Ac-LDL), 建立 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型 (Ac-LDL 组), 在此基础上加入 apoA-1 得到 apoA-1 组细胞。采用液体闪烁计数法和油红 O 染色检测 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出率及细胞内的脂质蓄积。通过实时荧光定量 PCR (qPCR)、蛋白免疫印迹 (Western blot) 法和激光共聚焦显微镜观察分析泡沫细胞 α -COP 的表达情况。用 Scrambled shRNA (Scr 组)、 α -COP shRNA (α -COP shRNA 组) 慢病毒感染 apoA-1 介导的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞, 分析干扰 α -COP 表达对泡沫细胞胆固醇流出率和细胞总胆固醇水平的影响, 通过激光共聚焦显微镜观察细胞内脂肪分化相关蛋白 (ADFP) 和胆固醇探针 Fillipin III 表达的改变。查询 GEO 数据库, 分析不同颈动脉粥样硬化斑块组织中 α -COP 的表达水平差异。**结果** 与 Ac-LDL 组比较, apoA-1 组泡沫细胞胆固醇流出率明显升高 $[(9.77 \pm 0.79)\% \text{ vs. } (2.74 \pm 0.37)\%, P < 0.001]$; 油红 O 染色显示, apoA-1 组泡沫细胞内脂质蓄积较 Ac-LDL 组减少。apoA-1 组泡沫细胞内 α -COP mRNA 相对表达水平较 Ac-LDL 组升高 ($P < 0.001$), α -COP 蛋白表达水平也升高 ($P < 0.001$)。荧光强度分析表明, apoA-1 组 α -COP 的平均荧光强度较 Ac-LDL 组升高。shRNA 敲低 α -COP 表达水平后, 与 Scr 组比较, α -COP shRNA 组泡沫细胞内 apoA-1 介导的胆固醇流出率降低 ($P < 0.05$), 总胆固醇水平增加 ($P < 0.001$)。与 Scr 组比较, α -COP shRNA 组泡沫细胞内 ADFP 的红色荧光强度增加 ($P < 0.05$), Fillipin III 的蓝色荧光强度也增加 ($P < 0.01$)。GEO 数据库结果表明, 颈动脉粥样硬化斑块组织中 α -COP mRNA 表达水平低于正常动脉组织, 且晚期颈动脉粥样硬化斑块组织 α -COP mRNA 表达水平低于早期颈动脉粥样硬化斑块组织 ($P < 0.05$)。**结论** α -COP 参与了 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出过程, 干扰 α -COP 表达会导致泡沫细胞胆固醇外流减少, 细胞内脂质蓄积增加。

[关键词] 外被体蛋白 I; 载脂蛋白 A-1; 泡沫细胞; 胆固醇流出
[中图法分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)03-0580-08

Study on the role of coatomer protein I in apolipoprotein A-1-mediated cholesterol efflux from foam cells

HONG Weitao, ZHANG Feilong, HUANG Jie, LIANG Yumin, CHEN Gengji, CHEN Xiaojia, MA Weilie, DING Hang, ZHANG Zhizhen[△]
(School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China)

[Abstract] **Objective** To establish a human monocytic THP-1 macrophage-derived foam cell model and analyze the role of the α subunit of coatomer protein I (α -COP) in apolipoprotein A-1 (apoA-1)-mediated cholesterol efflux from foam cells. **Methods** THP-1 cells were induced to adhere using PMA (PMA group), followed by treatment with acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) to generate macrophage-derived foam cells (Ac-LDL group). Subsequent incubation with apoA-1 formed the apoA-1 group. Cholesterol efflux rates mediated by apoA-1 and intracellular lipid accumulation were quantified through liquid scintillation counting and oil red O staining. The expression patterns of α -COP were systematically analyzed using quantitative real-time PCR (qPCR), Western blotting, and laser scanning confocal microscopy. THP-1 macrophage-derived foam cells mediated by apoA-1 were transduced with scrambled shRNA (Scr group) or α -COP-specific shRNA

[△] 通信作者, E-mail: zzzhang@gdmu.edu.cn.

lentivirus (α -COP shRNA group) to assess the effects of α -COP knockdown on cholesterol efflux efficiency and total cellular cholesterol content. Subcellular localization of adipopoilin (ADFP) and cholesterol probe Filipin III staining patterns were visualized via laser scanning confocal microscopy. Bioinformatics analysis of α -COP expression profiles in carotid atherosclerotic plaques was performed using datasets from the GEO database. **Results** Compared with the Ac-LDL group, the cholesterol efflux rate in the apoA-1 group was significantly increased [$(9.77 \pm 0.79)\%$ vs. $(2.74 \pm 0.37)\%$, $P < 0.001$]. Oil red O staining demonstrated reduced lipid accumulation in foam cells of the apoA-1 group compared with the Ac-LDL group. The relative mRNA expression level of α -COP in the apoA-1 group was significantly higher than that in the Ac-LDL group ($P < 0.001$), with corresponding elevation in protein expression ($P < 0.001$). Fluorescence intensity analysis revealed increased mean fluorescence intensity of α -COP in the apoA-1 group compared with the Ac-LDL group. Following α -COP knockdown by shRNA, the apoA-1-mediated cholesterol efflux rate was significantly decreased ($P < 0.05$) and total intracellular cholesterol levels were increased ($P < 0.001$) in the α -COP shRNA group compared with the Scr group. The α -COP shRNA group exhibited enhanced red fluorescence intensity of ADFP ($P < 0.05$) and increased blue fluorescence intensity of Filipin III ($P < 0.01$) compared with the Scr group. Database analysis indicated that α -COP mRNA expression was lower in carotid atherosclerotic plaques than in normal arterial tissues, with reduced expression in advanced-stage plaques compared with early-stage plaques ($P < 0.05$). **Conclusion** α -COP participates in apoA-1-mediated cholesterol efflux from foam cells, and interference with α -COP expression results in reduced cholesterol efflux and increased intracellular lipid accumulation.

[Key words] coatomer protein I; apolipoprotein A-1; foam cell; cholesterol efflux

动脉粥样硬化性心血管疾病是全世界发病率较高的疾病,而动脉粥样硬化是心血管疾病的最主要病理基础^[1]。在动脉粥样硬化斑块形成的早期阶段,动脉内皮细胞胆固醇过度聚集、形成泡沫细胞是其发展过程的关键步骤^[2]。胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)途径被认为是人体清除外周组织多余胆固醇的主要机制^[3]。RCT 途径从泡沫细胞内逆向转运累积的胆固醇至肝脏中进行清除,其起始的关键步骤是高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)通过载脂蛋白(apolipoprotein, apoA)介导,促进泡沫细胞内的胆固醇外流^[4]。

载脂蛋白 A-1 (apolipoprotein A-1, apoA-1) 是 HDL 的主要蛋白成分, apoA-1 与位于泡沫细胞膜上的受体相互作用, 启动细胞内信号转导, 促进脂滴内的胆固醇以分泌囊泡形式被转运到细胞外^[5]。外被体蛋白 I (coat protein I, COP I) 参与组装形成的 COP I 囊泡可携带蛋白和脂质从顺面高尔基体逆向转运至内质网, 并介导高尔基体膜囊间物质的逆向和正向运输^[6]。也有研究报道, COP I 囊泡参与蛋白和脂质从内质网到高尔基体的正向运输^[7-8]。哺乳动物的 COP I 是由 α -COP、 β -COP、 β' -COP、 γ -COP、 δ -COP、 ϵ -COP 和 ζ -COP 7 个亚基形成的复合物, 细胞内的 ADP-核糖基化因子 1 (ADP-ribosylation factor 1, ARF1) 调节 COP I 囊泡的形成。活化的 ARF1 与 β -COP 亚基结合, 并募集其他外被体蛋白组装形成 COP I 囊泡, 参与胆固醇在细胞内的逆向转运过程^[9-11]。研究表明, ARF1 被敲低或者发生缺失, 会导致细胞内的胆固醇转运障碍, apoA-1 介导的胆固醇外

流效率降低^[12-13]。本课题组已有前期研究发现, 利用 shRNA 干扰泡沫细胞内 β -COP 表达后, apoA-1 介导的胆固醇流出明显减少, 细胞内总胆固醇积聚, 泡沫细胞内出现大的囊泡, 证实 β -COP 是 apoA-1 介导泡沫细胞胆固醇囊泡转运的组成成分之一^[14]。蛋白质组学进一步分析发现, 在 apoA-1 处理的泡沫细胞培养基中可鉴定出 α -COP 蛋白的存在^[14]。因此, α -COP 亚基作为 COP I 复合物的组成成分, 是否参与 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇囊泡转运过程, α -COP 是否可作为胆固醇流出过程中的一个新靶点, 目前相关报道很少, 需要进行验证。本研究拟以 α -COP 作为研究靶点, 在人外周血单核细胞 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型上, 分析 α -COP 是否参与 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出过程及其对泡沫细胞胆固醇流出的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞 THP-1 购于美国菌种保藏中心, RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。佛波酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 购自美国 Promega 公司, 乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated low density lipoprotein, AC-LDL) 购自上海经科化学科技有限公司, apoA-1、油红 O 染液、苏木素染液购自德国 Sigma 公司,^[34] 胆固醇购自中国科学院上海原子研究所。TRIzol 试剂购自美国 Life Technologies 公司, 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time, qPCR) 试剂购自日本 TaKaRa 公司, α -COP shRNA 特异性干扰序列、Scrambled shRNA 对照序列、pGM-

LV-SC1 RNAi 慢病毒载体由吉满生物科技(上海)有限公司构建和提供。 α -COP 抗体、GAPDH 抗体、脂肪分化相关蛋白(adipopoilin,ADFP)抗体、Alexa 568 二抗购自英国 Abcam 公司,胆固醇探针 Fillipin III 购自美国 Cayman Chemical 公司,辣根过氧化物酶(horseadish、peroxidase, HRP) 标记的 IgG (IgG-HRP)购自美国 Santa Cruz 公司,RIPA 缓冲液、BCA 蛋白检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,总胆固醇测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立

将 THP-1 细胞复苏后使用 RPMI-1640 完全培养基进行培养。细胞传 3 代后,将细胞铺 24 孔细胞培养板,用 160 nmol/L PMA 诱导 48 h 分化为贴壁巨噬细胞(PMA 组),更换含 0.2% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)和 50 μ g/mL Ac-LDL 的 RPMI-1640 培养基孵育 48 h,贴壁巨噬细胞转化为泡沫细胞(Ac-LDL 组)。

1.2.2 液体闪烁计数法

将 THP-1 细胞铺板,加入 MPA 诱导贴壁得 PMA 组,再加入含 0.2 μ Ci/mL [³H] 胆固醇和 50 μ g/mL Ac-LDL 的 RPMI-1640 培养,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 48 h,RPMI-1640 培养基平衡 12 h 得 Ac-LDL 组,在此基础上加入 10 μ g/mL apoA-1 作用 12 h 得 apoA-1 组。各组细胞设置 3 个复孔。收集培养基,用

0.1 mol/L NaOH 裂解细胞,采用液体闪烁计数法测定培养基和细胞裂解液中的放射强度(单位:cpm)。胆固醇流出率(%)=培养基放射强度/(细胞内放射强度+培养基放射强度) $\times$ 100%。

1.2.3 油红 O 染色

取 PMA 组、Ac-LDL 组和 apoA-1 组细胞爬片,4%多聚甲醛固定 20 min;60%异丙醇洗涤 1 min,加入 1 mL 油红 O 染液室温孵育 40 min;苏木素染液室温孵育 1 min,60%异丙醇洗涤 30 s。用甘油明胶封片,于倒置显微镜下观察细胞内脂质蓄积情况。

1.2.4 α -COP shRNA 慢病毒感染

将构建的慢病毒 shRNA 载体和 Lenti-HG Mix 共转染 HEK 293T 细胞,包装产生 α -COP shRNA 慢病毒颗粒和对照慢病毒颗粒, α -COP shRNA 序列及对照序列 Scrambled shRNA 见表 1。取对数生长期的 THP-1 细胞,用 5 μ g/mL polybrene 预处理 12 h 后接种于 12 孔细胞培养板,以 MOI 30 的 α -COP shRNA 慢病毒对对数生长期的 THP-1 细胞进行感染(α -COP-shRNA 组),37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 48 h。同时设置 Scrambled shRNA 对照组(Scr 组)。PMA 诱导细胞贴壁,加入 50 μ g/mL Ac-LDL 作用 48 h,加入 10 μ g/mL apoA-1 处理细胞 12 h。病毒感染 5 d 后,荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的表达,分析慢病毒感染效率。通过实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)和蛋白免疫印记(Western blot)法分析慢病毒的干扰效果。

表 1 α -COP shRNA 序列和对照序列信息

引物名称	方向	序列(5'-3')
α -COP-shRNA	正向	GAT CCG CCG TGA GTA CAT TGT GGG TTT CTC GAG AAA CCC ACA ATG TAC TCA CGG TTT TTT
	反向	AAA AAA CCG TGA GTA CAT TGT GGG TTT CTC GAG AAA CCC ACA ATG TAC TCA CGG CGG ATC
Scrambled shRNA	正向	GTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT TCA AGA GAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA CTT TTT TAC GCG T
	反向	ACG CGT AAA AAA GTT CTC CGA ACG TGT CAC GTT CTC TTG AAA CGT GAC ACG TTC GGA GAA C

1.2.5 qPCR 实验

实验分为 PMA 组、Ac-LDL 组、apoA-1 组、 α -COP shRNA 组和 Scr 组,每组设置 3 个复孔。使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增。qPCR 反应体系为:2 μ L cDNA,正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,SYBR Green 10 μ L,ddH₂O 6 μ L。扩增程序如下:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40 次循环;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。以 GAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 α -COP mRNA 表达水平。 α -COP 和 GAPDH 的引物序列见表 2。

表 2 qPCR 引物序列

引物名称	方向	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
α -COP	正向	GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT	87
	反向	AAT CAT GGG AAA TAG GCC CTC	
GAPDH	正向	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G	108
	反向	CGC TGT TGA AGT CAG AGG AGA C	

1.2.6 Western blot 分析

收集 PMA 组、Ac-LDL 组、apoA-1 组、 α -COP shRNA 组和 Scr 组细胞,用 RIPA 缓冲液提取各组细

胞总蛋白,用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行电泳分离;电泳结束后,将凝胶中的蛋白转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜;5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 α -COP 一抗(1:1 000)、GAPDH(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入相应的二抗(1:2 000),室温孵育 1 h。利用 Azure Biosystems C400 成像系统进行曝光,分析蛋白条带灰度值,计算蛋白表达水平。

1.2.7 激光共聚焦显微镜观察

收集 PMA 组、Ac-LDL 组、apoA-1 组、 α -COP shRNA 组和 Scr 组细胞,用 4%多聚甲醛固定 20 min 后,将细胞置于含 5% BSA、0.1% 乙基苯基聚乙二醇(nonaethylene glycol octylphenyl ether, NP40)的磷酸盐缓冲液中透化并封闭 45 min。分别使用 ADFP 抗体(1:100)与 α -COP 一抗(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,再分别使用 50 $\mu\text{g/mL}$ Fillipin III 和 Alexa568 二抗(1:1 000)孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后封片。通过激光共聚焦显微镜观察细胞,使用 Image J 分析各组细胞的荧光强度。

1.2.8 细胞内总胆固醇水平测定

收集 PMA 组、Ac-LDL 组、apoA-1 组、 α -COP shRNA 组和 Scr 组细胞。按照总胆固醇测定试剂盒说明书处理各组细胞,每组设置 3 个复孔,按照 BCA 测定试剂盒操作步骤,计算各组细胞的平均蛋白水平,根据胆固醇标准曲线计算相对应的细胞内总胆固醇水平。

1.2.9 动脉粥样硬化斑块中 α -COP mRNA 表达分析

以“atherosclerotic plaques”“gene expression”为检索词,在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)进行检索,下载相关数据集;参照临床

样本信息处理数据,并在数据集中检索“COPA”(即 α -COP),对 α -COP 的表达情况进行分析。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism8.0 软件分析数据,所有实验独立重复 3 次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

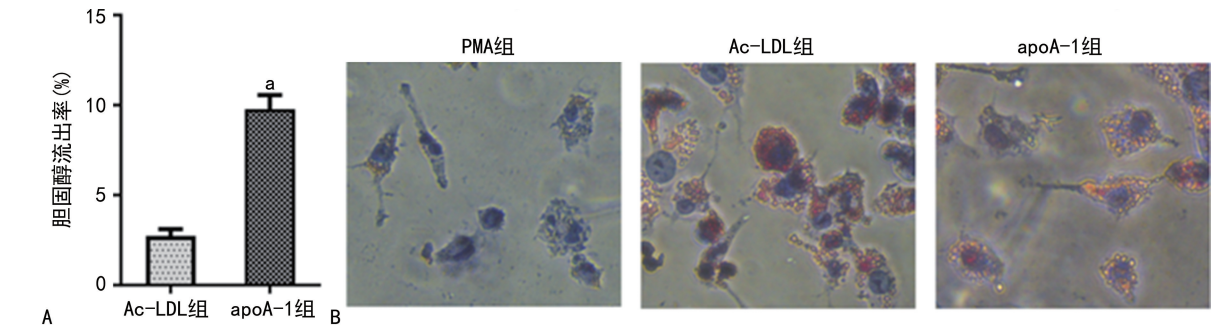
2 结 果

2.1 泡沫细胞胆固醇流出率测定与脂质蓄积观察

液体闪烁计数法检测结果表明,与 Ac-LDL 组比较,apoA-1 组泡沫细胞胆固醇流出率明显升高 $[(9.77\pm0.79)\% \text{ vs. } (2.74\pm0.37)\%]$,差异有统计学意义($P<0.001$),见图 1A。油红 O 染色后,显微镜观察显示,Ac-LDL 组泡沫细胞细胞质内分布着大量红色脂滴,细胞核呈现蓝色,提示泡沫细胞模型建立成功,与 Ac-LDL 组细胞比较,apoA-1 组泡沫细胞内红色脂滴数量明显减少,并且脂滴颜色变浅,见图 1B。

2.2 泡沫细胞 α -COP 表达分析

采用 Western blot 和 qPCR 分析泡沫细胞内 α -COP 的表达水平,结果显示,与 PMA 组比较,Ac-LDL 组与 apoA-1 组泡沫细胞的 α -COP mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$);与 Ac-LDL 组泡沫细胞比较,apoA-1 组细胞 α -COP mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.001$),见图 2A~C。激光共聚焦显微镜观察显示,与 PMA 组比较,Ac-LDL 组与 apoA-1 组泡沫细胞细胞质中 α -COP 红色荧光强度明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.001$);与 Ac-LDL 组比较,apoA-1 组泡沫细胞的细胞质中 α -COP 红色荧光明显增强,呈现密集的点状分布,数据分析显示,apoA-1 组细胞内 α -COP 荧光强度较 Ac-LDL 组升高($P<0.001$),见图 2D、E。



A:泡沫细胞胆固醇流出率定量分析;B:泡沫细胞油红 O 染色(200 $\times$);^a: $P<0.001$,与 Ac-LDL 组比较。

图 1 泡沫细胞胆固醇流出率测定与油红 O 染色

2.3 α -COP shRNA 慢病毒感染分析

α -COP shRNA 组和 Scr 组慢病毒感染 THP-1 细胞 5 d 后,通过倒置荧光显微镜观察 GFP 的表达,结果显示,与白光对照比较, α -COP shRNA 组和 Scr 组呈现 GFP 荧光的细胞数量占总细胞数的 80% 以

上,提示慢病毒的感染效率达到 80% 以上,见图 3。qPCR 和 Western blot 分析 shRNA 干扰 α -COP 的表达后各组细胞 α -COP 的表达水平,结果显示,与 Scr 组比较, α -COP shRNA 组 α -COP mRNA 和蛋白表达水平降低($P<0.001$),见图 4。

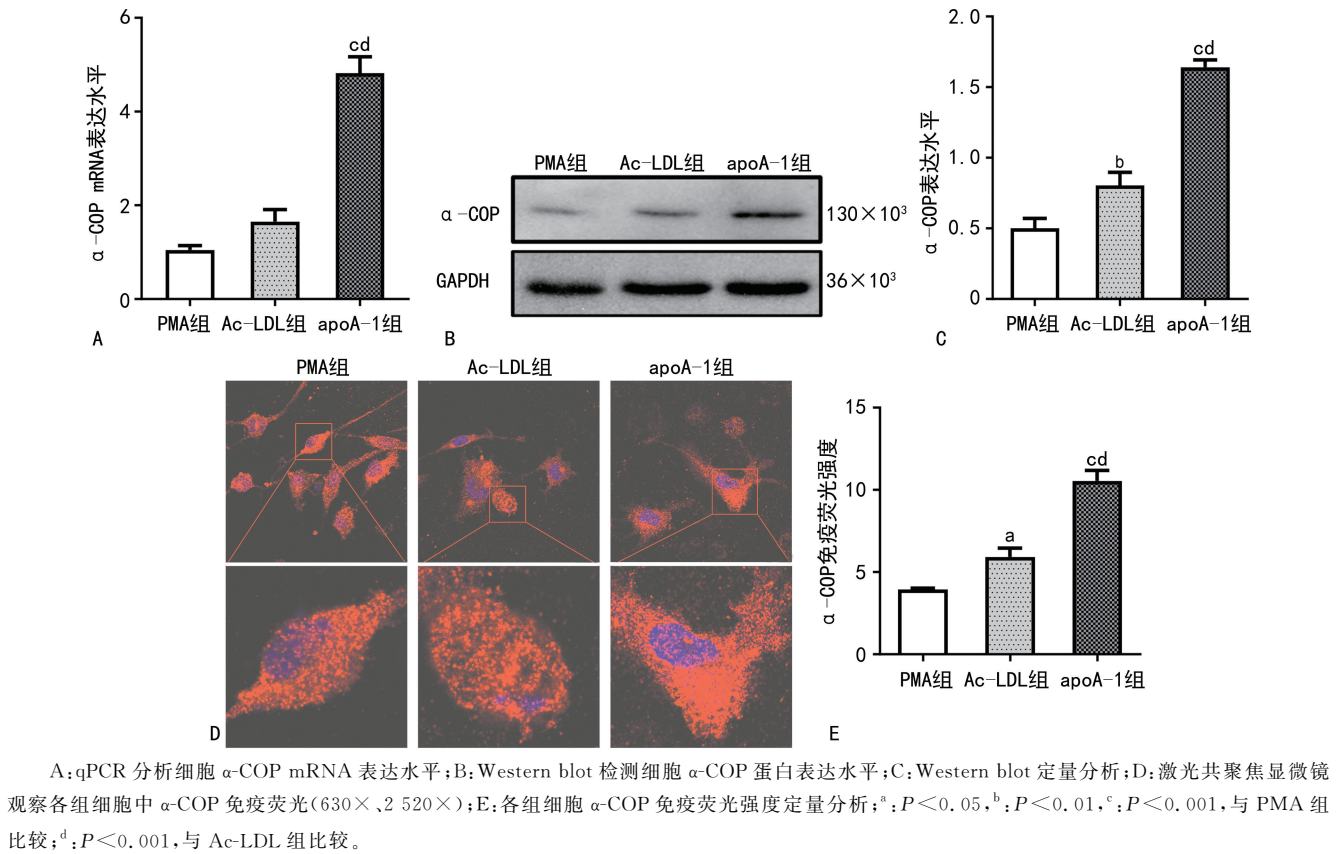


图 2 不同处理组细胞 α-COP 表达水平

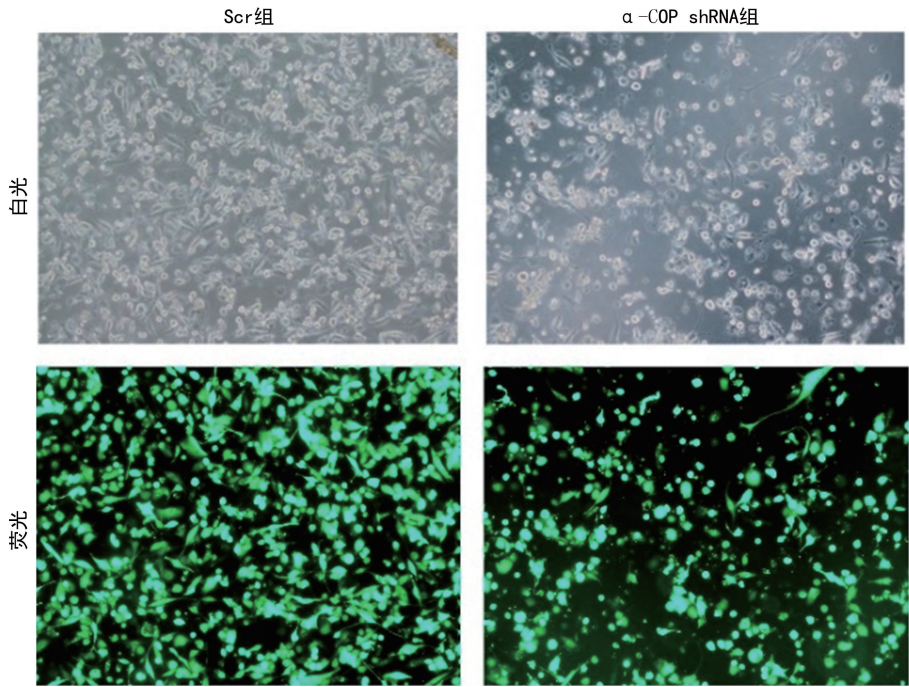


图 3 shRNA 慢病毒感染 THP-1 细胞结果图(100×)

2.4 α-COP shRNA 干扰 α-COP 后泡沫细胞胆固醇流出率与脂质蓄积分析

测定结果显示,apoA-1 组与 Scr 组泡沫细胞胆固醇流出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与 Scr 组比较,α-COP shRNA 组细胞内 apoA-1 介导的胆固醇流出率降低($P<0.05$),见图 5A。细胞内总胆固醇水平测定结果显示,与 Scr 组比较,α-COP shRNA 组

泡沫细胞内总胆固醇水平增加($P<0.001$),见图 5B。进一步采用 ADFP 和 Filipin III 作为标记,利用共聚焦显微镜观察 shRNA 干扰 α-COP 的泡沫细胞内脂质滴变化及脂质蓄积情况。结果显示,与 Scr 组比较,α-COP shRNA 组泡沫细胞内 ADFP 的红色荧光强度明显增加,Filipin III 的蓝色荧光强度也明显增加($P<0.01$),见图 6。

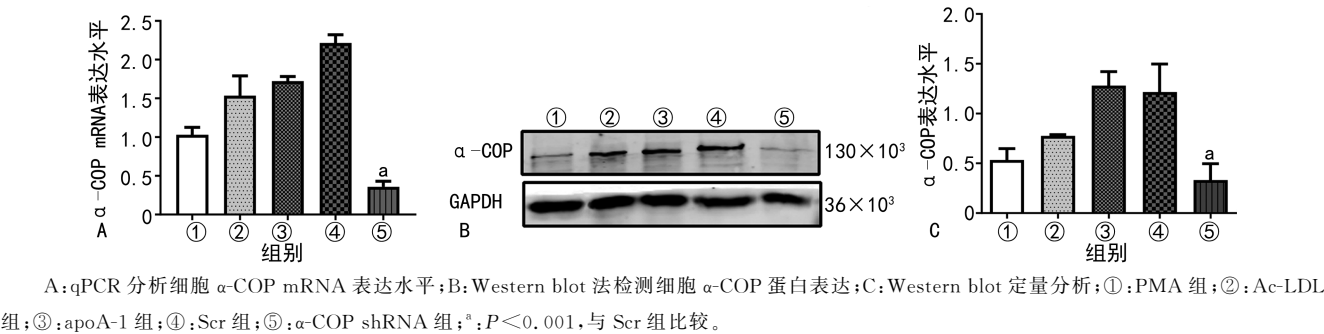


图 4 shRNA 干扰后各组细胞 α-COP 表达水平

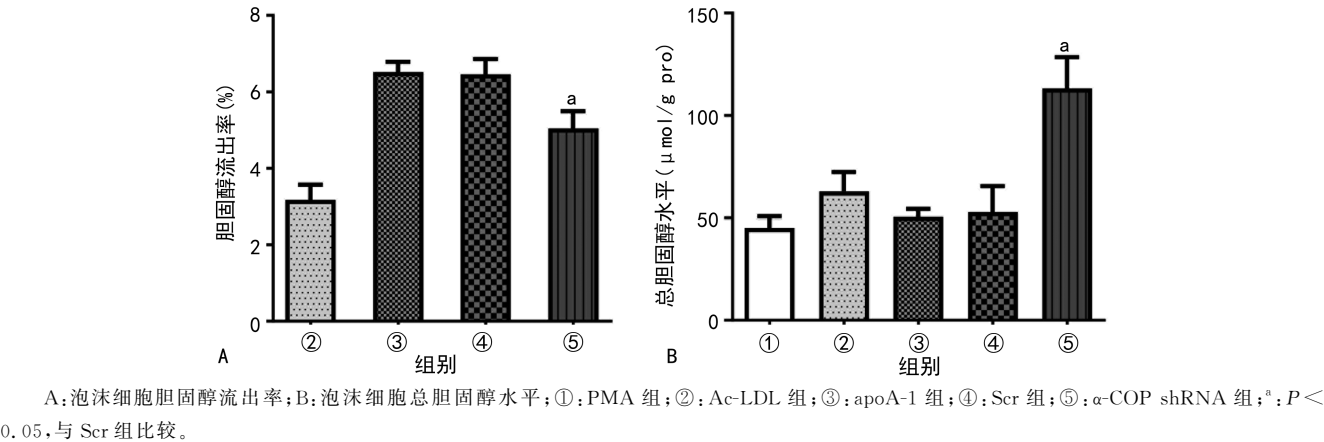


图 5 shRNA 干扰后泡沫细胞胆固醇流出率与总胆固醇水平测定

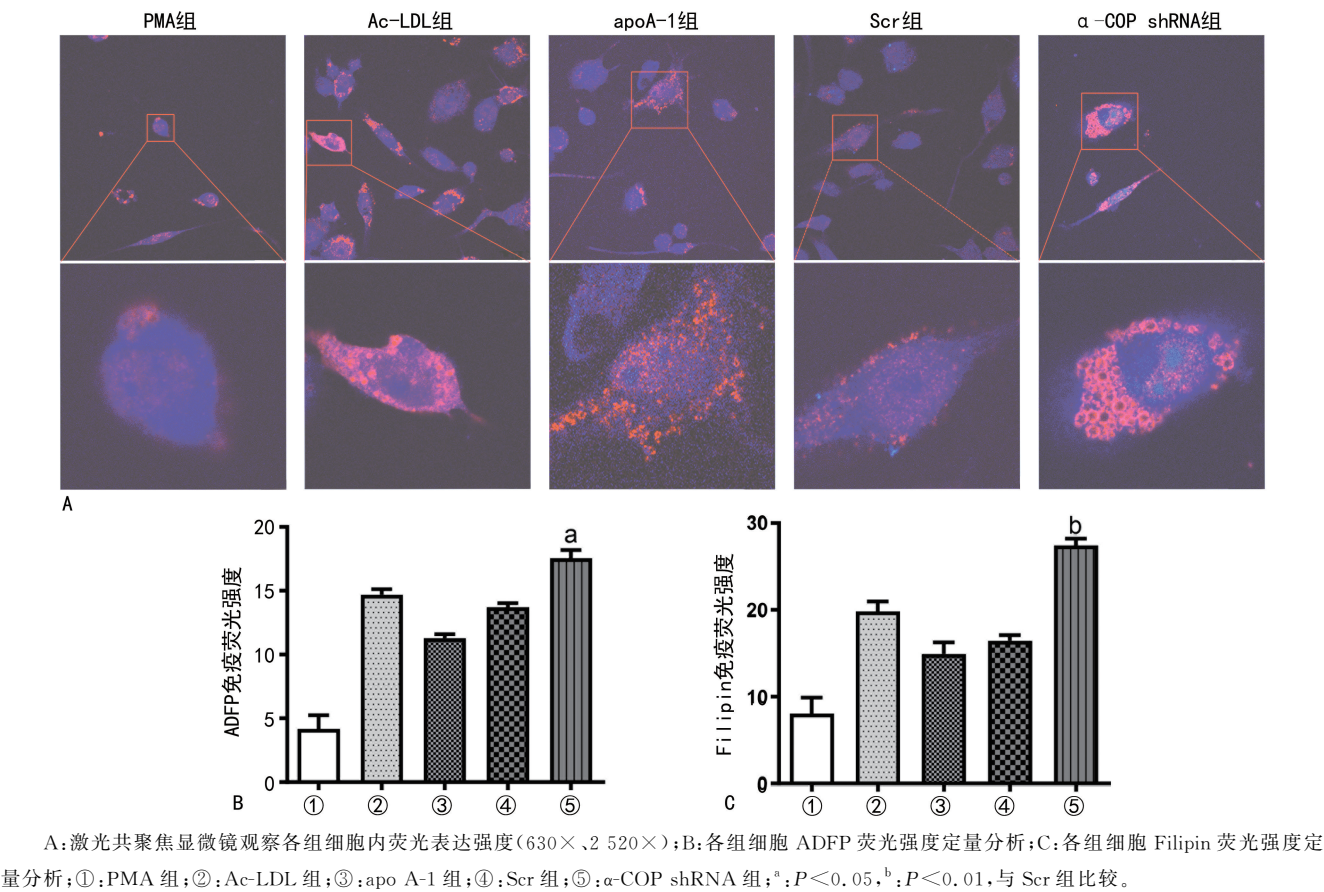


图 6 shRNA 干扰后不同处理组细胞内 ADFP 与 Filipin 荧光分析

2.5 动脉粥样硬化斑块中 α-COP 表达分析

在 GEO 数据库中检索到编号为 GSE100927 和

GSE28829 的两个数据集。GSE100927 数据集中,颈动脉粥样硬化斑块组织中的 α -COP mRNA 表达水平低于健康对照动脉组织(6.398 ± 0.185 vs. 6.503 ± 0.205 , $t = 2.407$, $P = 0.018$)。在 GSE28829 数据集中,晚期颈动脉粥样硬化斑块组织 α -COP mRNA 表达水平低于早期颈动脉粥样硬化斑块组织(5.334 ± 0.131 vs. 5.423 ± 0.138 , $t = 1.768$, $P = 0.044$)。

3 讨 论

巨噬细胞内的脂质蓄积导致泡沫细胞形成是动脉粥样硬化的主要特征,促进泡沫细胞的胆固醇外流是维持细胞内胆固醇稳态的关键。在真核细胞内蛋白和脂质的运输主要依赖于囊泡转运,COP I 囊泡在分泌阶段早期介导蛋白和脂质运输,主要参与高尔基体至内质网的逆向转运、体内运输和巨噬细胞自噬等过程^[15-16]。采用 siRNA 技术敲低 COP I 的 β -COP 亚基或 ARF,导致了脂质在细胞内的积累,表明 COP I 囊泡对脂质运输和脂滴内中性脂质的储存至关重要^[17-19]。本实验首先建立 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型,由于经过修饰的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)被内吞是导致泡沫细胞形成的重要过程,且该过程不受胆固醇负反馈调节^[20-21],因此本实验使用 $50 \mu\text{g/mL}$ Ac-LDL 诱导贴壁巨噬细胞转化为泡沫细胞,以增加细胞内的胆固醇水平。利用该模型分析 apoA-1 处理对泡沫细胞胆固醇流出率的影响,结果发现 apoA-1 处理后泡沫细胞胆固醇流出率增加($P < 0.05$)。油红 O 染色观察发现,apoA-1 处理后泡沫细胞内脂滴数量明显减少,颜色明显变浅,说明细胞内脂质水平明显降低,见图 1B。采用 qPCR 和 Western blot 法分析发现,apoA-1 介导后泡沫细胞 α -COP mRNA 及蛋白表达水平均明显升高($P < 0.001$),激光共聚焦显微镜观察也显示,经过 apoA-1 处理的泡沫细胞 α -COP 红色荧光明显增强($P < 0.001$)。以上结果提示, α -COP 参与了 apoA-1 介导的泡沫细胞胆固醇流出过程,在该途径中 α -COP 的表达水平升高。

为了进一步验证上述结果,本研究采用 shRNA 干扰细胞内 α -COP 的表达,分析 apoA-1 介导的泡沫细胞内胆固醇流出和脂质蓄积改变情况。 α -COP shRNA 慢病毒感染 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞后,apoA-1 处理的泡沫细胞胆固醇流出率降低,而细胞内总胆固醇水平升高($P < 0.001$)。这一结果说明,干扰 α -COP 表达降低了泡沫细胞内胆固醇的流出,增加了泡沫细胞内的脂质蓄积。ADFP 是一种脂滴包被蛋白,位于泡沫细胞内脂滴的最外层,可作为观察脂滴大小及改变的特异性标志物^[22]。Filipin III 作为一种胆固醇的探针,能够与游离胆固醇结合形成聚集

体或复合物,并在激发时产生蓝色荧光。激光共聚焦显微镜观察显示, α -COP shRNA 组泡沫细胞内 ADFP 的红色荧光较 Scr 组明显增强,Filipin III 蓝色荧光也较 Scr 组明显增强,并且泡沫细胞内出现大的脂质囊泡,这表明干扰 α -COP 的表达,会导致泡沫细胞胆固醇外流受阻,且加剧细胞内的胆固醇蓄积与脂质囊泡的形成。

本课题组前期研究表明,apoA-1 能促进泡沫细胞内 COP I 的 β -COP 亚基易位至细胞膜并分泌到培养基中,而且在人血浆 HDL 组分中也检测到 β -COP 存在^[14]。为此,在上述研究基础上,本研究进一步分析了 α -COP 在人颈动脉粥样硬化斑块中的表达情况。通过对 GEO 数据库检索得到的数据集分析发现,与健康动脉组织比较,动脉粥样硬化斑块组织中的 α -COP mRNA 表达水平降低,且晚期动脉粥样硬化斑块组织中 α -COP mRNA 表达水平低于早期动脉粥样硬化斑块组织($P < 0.05$)。STEENMAN 等^[23]曾报道,罹患心血管疾病的患者与健康人群比较,在动脉斑块中出现基因表达的差异可认为是心血管危险因素之一。 α -COP 作为 COP I 囊泡的蛋白组分,在细胞内囊泡转运过程中可能起作用,而动脉粥样硬化斑块组织中 α -COP 表达水平有降低的趋势,与本研究细胞水平的结果相一致,说明 α -COP 表达水平的降低,会加剧动脉粥样硬化斑块组织泡沫细胞内胆固醇的蓄积与脂质囊泡形成,提示 α -COP 的作用可能与动脉粥样硬化斑块形成、进展及胆固醇代谢转运相关,可作为评估心血管危险因素的指标之一。在后续研究中,将进一步探究 α -COP 在胆固醇外流及脂质蓄积过程中的详细机制,为治疗脂质沉积与动脉粥样硬化提供潜在靶点。

参考文献

- [1] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. Cell, 2022, 185(10):1630-1645.
- [2] BLAGOV A V, MARKIN A M, BOGATYREVA A I, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cells, 2023, 12(4):522.
- [3] NISHIDA T, AYAORI M, ARAKAWA J, et al. Liver-specific Lxr inhibition represses reverse cholesterol transport in cholesterol-fed mice[J]. Atherosclerosis, 2024, 397:117578.
- [4] FUNG K Y Y, HO T W W, XU Z, et al. Apolipoprotein A1 and high-density lipoprotein limit

low-density lipoprotein transcytosis by binding SR-B1[J]. *J Lipid Res*, 2024, 65(4):100530.

[5] LIN G. Insights of high-density lipoprotein apo-lipoprotein-mediated lipid efflux from cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 727-731.

[6] 梁钰敏, 丁航, 张志珍. COP I 囊泡形成与结构研究进展[J]. *生命的化学*, 2018, 38(6):852-859.

[7] DELAFONTAINE S, IANNUZZO A, BIGLEY T M, et al. Heterozygous mutations in the C-terminal domain of COPA underlie a complex autoinflammatory syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(4):e163604.

[8] QIU H, WU X, MA X, et al. Short-distance vesicle transport via phase separation[J]. *Cell*, 2024, 187(9):2175-2193.

[9] ADOLF F, RHIEL M, HESSLING B, et al. Proteomic profiling of mammalian COP II and COP I vesicles[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(1):250-265.

[10] XIE B, GUILLEM C, DATE S S, et al. An interaction between β' -COP and the ArfGAP, Glo3, maintains post-Golgi cargo recycling[J]. *J Cell Biol*, 2023, 222(4):e202008061.

[11] TAYLOR R J, TAGILTSEV G, BRIGGS J A G. The structure of COP I vesicles and regulation of vesicle turnover[J]. *FEBS Lett*, 2023, 597(6):819-835.

[12] ANDERSEN J P, ZHANG J, SUN H, et al. Aster-B coordinates with Arf1 to regulate mitochondrial cholesterol transport[J]. *Mol Metab*, 2020, 42:101055.

[13] GOGULAMUDI V R, ISLAM M T, DURR-ANT J R, et al. Heterozygosity for ADP-ribosylation factor 6 suppresses the burden and severity of atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2023, 18(5):e0285253.

[14] MA W, LIN M, DING H, et al. β -COP as a component of transport vesicles for HDL apolipoprotein-mediated cholesterol exocytosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3):e0151767.

[15] BECK R, RAWET M, WIELAND F T, et al. The COP I system: molecular mechanisms and function[J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(17): 2701-2709.

[16] CHOI H, PARK K, HSU V W, et al. Studying the role of lipid geometry in COP I vesicle formation[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2557:519-528.

[17] TASKINEN J H, RUHANEN H, MATYSIK S, et al. Systemwide effects of ER-intracellular membrane contact site disturbance in primary endothelial cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2023, 232:106349.

[18] SAGER G, SZUL T, LEE E, et al. Modeling the dynamic behaviors of the COP I vesicle formation regulators, the small GTPase Arf1 and its activating Sec7 guanine nucleotide exchange factor GBF1 on Golgi membranes[J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(5):446-459.

[19] ENKLER L, SZENTGYÖRGYI V, PENN-AUER M, et al. Arf1 coordinates fatty acid metabolism and mitochondrial homeostasis[J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(8):1157-1172.

[20] WANG Y, WANG Q, XU D. New insights into macrophage subsets in atherosclerosis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2022, 100(9):1239-1251.

[21] SONG Y, LIU J, ZHAO K, et al. Cholesterol-induced toxicity: an integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(10):1911-1925.

[22] ROBENEK H, ROBENEK M J, TROYER D. PAT family proteins pervade lipid droplet cores[J]. *J Lipid Res*, 2005, 46(6):1331-1338.

[23] STEENMAN M, ESPITIA O, MAUREL B, et al. Identification of genomic differences among peripheral arterial beds in atherosclerotic and healthy arteries[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3940.