

# 褪黑素通过 PPAR $\gamma$ - LXR $\alpha$ 调控 THP - 1 巨噬细胞 ABCA1 表达

王 雨 陈连凤 王 伟 宋 玮 严晓伟

**摘 要** **目的** 研究褪黑素对巨噬细胞 ABCA1 受体表达的影响及作用机制。**方法** 使用 THP - 1 细胞体外培养 PMA 诱导分化为巨噬细胞,给予不同浓度的褪黑素(0,50nmol/L、100nmol/L、500nmol/L 和 1 $\mu$ mol/L)干预细胞,RT - PCR 和 Western blot 法分别检测巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的 mRNA 和蛋白相对表达量的变化。分别应用 LXR $\alpha$  抑制剂 GSK2033、PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662、非选择性 MT1/MT2 受体拮抗剂 Luzindole、选择性 MT2 受体拮抗剂 K185 进一步验证褪黑素调控 ABCA1 表达的作用机制。**结果** 褪黑素显著上调 THP - 1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的 mRNA 和蛋白相对表达量,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。GW9662 均可显著抑制褪黑素上调的 ABCA1 和 LXR $\alpha$  蛋白表达水平( $P = 0.000$ ),GSK2033 可显著抑制褪黑素上调的 ABCA1 蛋白表达( $P = 0.000$ ),但对 LXR $\alpha$  蛋白表达水平无影响。而 Luzindole 和 K185 均未明显抑制褪黑素上调的 ABCA1 蛋白表达。**结论** 褪黑素显著上调巨噬细胞 ABCA1 的表达,PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  通路参与了褪黑素对 ABCA1 表达的调节作用。

**关键词** 褪黑素 ABCA1 PPAR $\gamma$  LXR $\alpha$

**中图分类号** R3

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.07.007

**Melatonin Regulates the Expression of the THP - 1 Derived Macrophage ABCA1 Receptor through PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$ .** Wang Yu, Chen Lianfeng, Wang Wei, et al. Department of Cardiology, Fu Wai Hospital, National Center for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

**Abstract** **Objective** To study the effect of melatonin on macrophage ABCA1 receptor expression and its mechanism. **Methods** THP - 1 cells were cultured in vitro and differentiated into macrophages by PMA. The cells were treated with melatonin at different concentrations (0,50nmol/L,100nmol/L, 500nmol/L and 1 $\mu$ mol/L, respectively). The mRNA and protein levels of ABCA1 and LXR $\alpha$  were measured by RT - PCR and Western Blot analysis, respectively. LXR $\alpha$  inhibitor GSK2033, PPAR $\gamma$  inhibitor GW9662, non - selective MT1/MT2 receptor antagonist Luzindole and selective MT2 receptor antagonist K185 were used to further verify the mechanism of melatonin in regulating ABCA1 expression. **Results** Melatonin significantly upregulated the relative mRNA and protein expression levels of ABCA1 and LXR $\alpha$  of macrophages in a dose - dependent manner ( $P < 0.05$ ). GW9662 significantly inhibited the upregulated ABCA1 and LXR $\alpha$  protein levels ( $P = 0.000$ ), and GSK2033 significantly inhibited the upregulated ABCA1 and LXR $\alpha$  protein levels ( $P = 0.000$ ), but had no effect on LXR $\alpha$  protein expression levels. Neither Luzindole nor K185 significantly inhibited the expression of ABCA1 protein upregulated by melatonin. **Conclusion** Melatonin significantly upregulated the expression of ABCA1 in macrophages, and PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  pathway was involved in the regulation of ABCA1 expression by melatonin.

**Key words** Melatonin; ATP - binding cassette transporter A1; PPAR $\gamma$ ; LXR $\alpha$

褪黑素(melatonin)是脊椎动物的松果体合成的一种吲哚类激素,对机体胆固醇代谢具有调节作用<sup>[1]</sup>。胆固醇外流是将细胞内游离胆固醇(free cholesterol,FC)等转运到胞外 HDL 颗粒的过程,是

胆固醇逆转运的第一步,也是机体调控动脉粥样硬化(atherosclerosis)发生、发展的关键步骤<sup>[2]</sup>。其中,三磷酸腺苷结合盒转运子 A1(ATP - binding cassette transporter A1,ABCA1)在此过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。研究发现,褪黑素缺乏可导致大鼠巨噬细胞 ABCA1 介导的胆固醇外流功能降低,并导致 ABCA1 受体表达下降,但机制尚不明确<sup>[4]</sup>。笔者通过 THP - 1 来源巨噬细胞体外培养,并用褪黑素溶液及相应受体拮抗剂干预巨噬细胞,探讨褪黑素调控巨噬细胞 ABCA1 表达的作用机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81270381)

作者单位:100037 中国医学科学院/北京协和医学院国家心血管病中心、中国医学科学院阜外医院心内科(王雨);1000730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院心内科(陈连凤、王伟、宋玮、严晓伟)

通讯作者:严晓伟,电子信箱:pumcyxw@126.com

## 材料与方法

1. 主要试剂:褪黑素干粉购自美国 Sigma 公司。THP-1 细胞购自北京中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。RPMI-1640 培养基购自英国 Gibco-BRL 公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、牛血清白蛋白(bovineserum albumin, BSA)购自美国 Hyclone 公司。佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自美国 Sigma 公司。Trizol、总 RNA 抽提试剂盒、cDNA 合成试剂盒购自大连宝生物有限公司。ABCA1、LXR $\alpha$  和 GAPDH 引物购自上海生工生物工程股份有限公司。全蛋白提取试剂盒购自北京普利莱生物技术公司。兔抗人 ABCA1 多克隆抗体、兔抗人 LXR $\alpha$  多克隆抗体、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司。HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662、非选择性 MT1/MT2 受体拮抗剂 Luzindole、选择性 MT2 受体拮抗剂 K185 购自美国 Sigma 公司。LXR $\alpha$  抑制剂 GSK2033 购自美国 Glaxo Smith Kline 公司。

2. THP-1 细胞的培养和巨噬细胞的分化:THP-1 细胞在 RPMI-1640 培养基和 10% 胎牛血清中培养,37℃、5% CO<sub>2</sub>-95% 空气的恒温培养箱中。THP-1 细胞生长至对数期时接种于 6 孔板,在培养液中加入终浓度为 100nmol/L 的 PMA 诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化 24h。通过倒置显微镜观察细胞形态变化,流式细胞术检测细胞表面特异性抗原 CD14 表达量的变化,鉴定 THP-1 细胞是否分化为巨噬细胞。

3. 不同浓度褪黑素溶液对 THP-1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的 mRNA 及蛋白表达的作用:将 THP-1 巨噬细胞分为对照组(阴性对照组)和褪黑素干预组。其中褪黑素干预组根据浓度又分为:50nmol/L 浓度褪黑素干预组(褪黑素 50nmol/L 组)、100nmol/L 浓度褪黑素干预组(褪黑素 100nmol/L 组)、500nmol/L 浓度褪黑素干预组(褪黑素 500nmol/L 组)、1 $\mu$ mol/L 浓度褪黑素干预组(褪黑素 1 $\mu$ mol/L 组)。对照组给予不含褪黑素的 RPMI-1640 培养基预处理 24h,而褪黑素干预组分别给予 50nmol/L、100nmol/L、500nmol/L 和 1 $\mu$ mol/L 的褪黑素溶液预处理 24h。

实时荧光定量 PCR 检测:提取各组 THP-1 来源巨噬细胞的总 RNA,反转录得到 cDNA。PCR 引物用 Primer 5.0 软件设计:ABCA1 基因上游引物:5' -

TACAGCCAGAAAGACACCAG - 3',下游引物:5' - CACAGTAGACTTTGGGAGAG - 3'。LXR $\alpha$  基因上游引物:5' - TCAGCCGGGAGGACCAGATTG - 3',下游引物:5' - TCCGGAGGCTCACCAGTTTCATTA - 3'。内参基因 GAPDH 上游引物:5' - CTCTGCTCCTCCTGTTGAC - 3',下游引物:5' - ACGACCAAATCCGTTGACTC - 3'。实时荧光定量 PCR 实验在 ABI7500 RT-PCR 仪上进行,通过各孔样品的 Ct 值计算样品 mRNA 相对内参基因 GAPDH 的表达量。

蛋白免疫印迹实验(Western blot)法分析:提取各组 THP-1 来源巨噬细胞胞质蛋白,BCA 蛋白定量后取 50 $\mu$ g 样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离和转膜,用含 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 60min,分别加入 ABCA1、LXR $\alpha$  和 GAPDH 的一抗(稀释比 1:500 ~ 1:800),4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 15min  $\times$  3 次后,加入 1:2000 稀释的相应二抗室温孵育 60min。再次用 TBST 洗膜 15min  $\times$  3 次,ECL 发光试剂盒显色,X 光片感光显影,用 Image J 软件分析各组 ABCA1、LXR $\alpha$  和 GAPDH 的灰度值,将各组的 ABCA1、LXR $\alpha$  分别与内参 GAPDH 的灰度值进行比值化处理,并比较各组 ABCA1 和 LXR $\alpha$  蛋白的相对表达量。

4. 褪黑素调控 THP-1 来源巨噬细胞 ABCA1 表达的信号调控机制:通过上述浓度梯度实验获得的结果,后续实验均采用浓度为 1 $\mu$ mol/L 的褪黑素溶液进行。

为明确褪黑素是否通过激活 LXR $\alpha$  来调节 ABCA1 的表达,笔者应用了 LXR $\alpha$  拮抗剂 GSK2033 和 PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW9662 进行后续实验。THP-1 来源巨噬细胞与 10 $\mu$ mol/L 的 GSK2033 (GSK 组)或 GW9662 (GW 组)溶液预孵育 6h,然后与 1 $\mu$ mol/L 的褪黑素溶液干预 24h。以未使用褪黑素的 RPMI-1640 培养基处理的细胞作为阴性对照(对照组),以仅使用 1 $\mu$ mol/L 褪黑素处理的细胞作为阳性对照(褪黑素组)。24h 后弃去干预溶液,然后收集细胞,进行蛋白质印迹(Western blot)法分析 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的蛋白表达情况。

为明确褪黑素是否通过褪黑素膜受体 1 型(MT1)或 2 型(MT2)介导的途径调节 ABCA1 的表达,笔者使用了两种拮抗剂:①非选择性 MT1/MT2 拮抗剂 luzindole (LUZ);②选择性 MT2 拮抗剂 K185。THP-1 来源巨噬细胞用 10 $\mu$ mol/L LUZ (LUZ 组)或 K185 (K185 组)预孵育 6h,然后用 1 $\mu$ mol/L 褪黑素处理 24h,以未使用褪黑素的 RPMI-1640 培养

基处理的细胞作为阴性对照(对照组),以仅使用  $1\mu\text{mol/L}$  褪黑素处理的细胞作为阳性对照(褪黑素组)。24h 后弃去干预溶液,然后收集细胞,进行 Western blot 法分析 ABCA1 蛋白表达情况。

5. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析。实验均重复 3 次,结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组的结果值采用独立  $t$  检验进行比较。多组的结果值使用单因素方差分析进行比较,并采用  $LSD$  检验进行双向比较,以  $P < 0.05$  为差异

有统计学意义。

## 结 果

1. 不同浓度褪黑素溶液对 THP-1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的 mRNA 及蛋白表达的作用:与对照组比较,随着褪黑素浓度的增加,巨噬细胞 ABCA1 mRNA 和蛋白表达均显著升高,且呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ , 图 1A、图 2 中 A 和 C)。与对照组比较,褪黑素干预组 LXR $\alpha$  mRNA 和蛋白水平显著升高,且呈剂量依赖性 ( $P < 0.05$ , 图 1B 及图 2 中 B、D)。

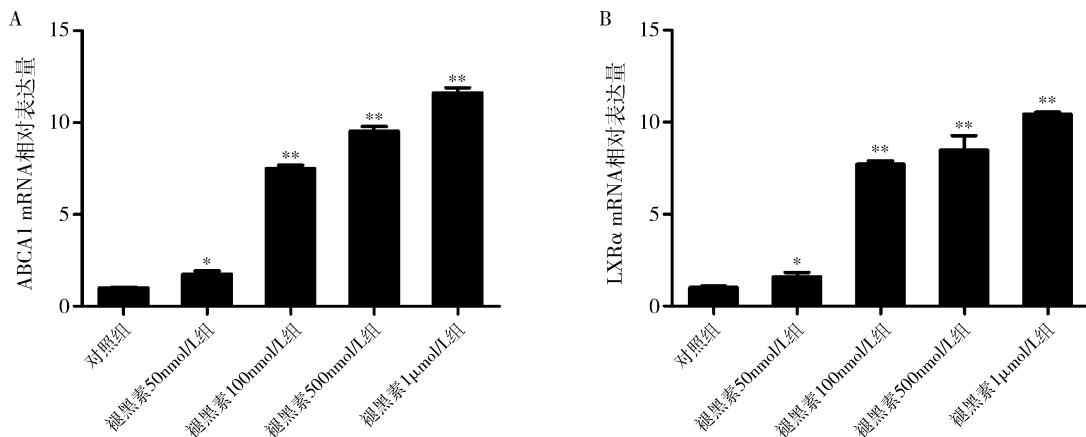


图1 不同浓度褪黑素溶液干预体外培养 THP-1 来源巨噬细胞后 ABCA1 及 LXR $\alpha$  mRNA 相对表达量

A. 巨噬细胞 ABCA1 mRNA 相对表达量; B. 巨噬细胞 LXR $\alpha$  mRNA 相对表达量;

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

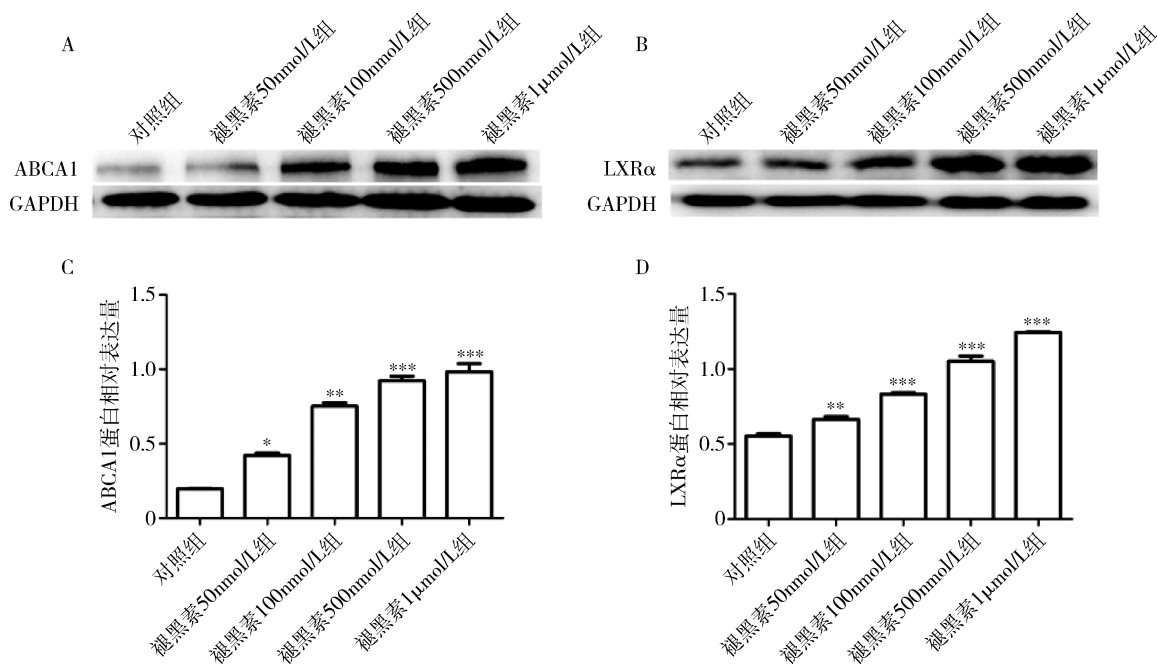


图2 不同浓度褪黑素溶液干预体外培养 THP-1 来源巨噬细胞后 ABCA1 及 LXR $\alpha$  蛋白表达

A. ABCA1 蛋白 Western blot 法条带图; B. LXR $\alpha$  蛋白 Western blot 法条带图; C. ABCA1 蛋白相对表达量柱形图;

D. LXR $\alpha$  蛋白相对表达量柱形图; 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.000$

2. GSK2033 或 GW9662 对经褪黑素处理的 THP - 1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  蛋白表达的影响:与对照组比较,褪黑素组的 ABCA1 蛋白表达水平显著升高( $P=0.000$ ,图 3 中 A 和 C)。然而,GSK 组的 ABCA1 蛋白表达水平显著低于褪黑素组( $P=0.000$ ,图 3 中 A 和 C)。与上述结果类似,GW 组对

ABCA1 表达相对褪黑素组存在显著的抑制作用( $P=0.000$ ,图 3 中 A 和 C)。与对照组比较,褪黑素组的 LXR $\alpha$  蛋白表达水平显著升高( $P=0.000$ ,图 3 中 B 和 D)。然而,与褪黑素组比较,GSK 组的 LXR $\alpha$  蛋白表达保持不变(图 3 中 B 和 D)。GW 组的 LXR $\alpha$  蛋白表达相比褪黑素组显著下降( $P=0.000$ ,图 3 中 B 和 D)。

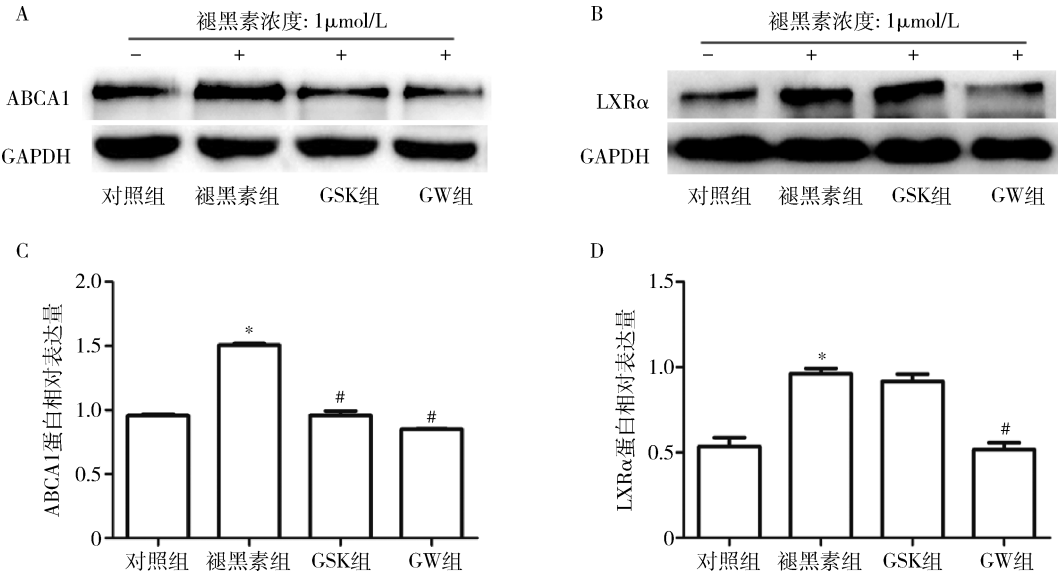


图 3 经褪黑素处理和 GSK2033 或 GW9662 预处理的 THP - 1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的蛋白表达  
A. ABCA1 蛋白 Western blot 法条带图;B. LXR $\alpha$  蛋白 Western blot 法条带图;C. ABCA1 蛋白相对表达量柱形图;  
D. LXR $\alpha$  蛋白相对表达量柱形图;与对照组比较,\*  $P=0.000$ ;与褪黑素组比较,#  $P=0.000$

3. LUZ 或 K185 对经褪黑素处理的 THP - 1 来源巨噬细胞 ABCA1 蛋白表达的影响:与对照组比较,褪黑素组的 ABCA1 蛋白表达水平显著升高( $P=$

0.000,图 4)。然而,与褪黑素组比较,LUZ 组或 K185 组中褪黑素上调的 ABCA1 蛋白表达均未被抑制(图 4)。

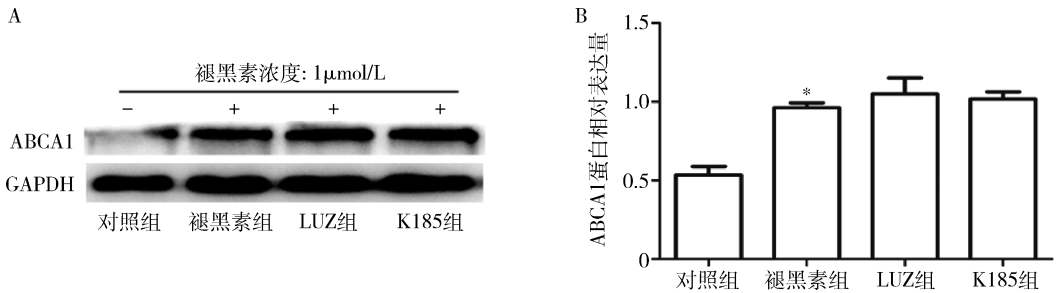


图 4 经褪黑素处理和 LUZ 或 K185 预处理的 THP - 1 来源巨噬细胞 ABCA1 和 LXR $\alpha$  的蛋白表达  
A. ABCA1 蛋白 Western blot 法条带图;B. ABCA1 蛋白相对表达量柱形图;与对照组比较,\*  $P=0.000$

讨 论

ABCA1 在预防动脉粥样硬化疾病的发生中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。Matsunaga 等<sup>[6]</sup>早期研究发现,人类 ABCA1 表达缺陷可导致 Tangier 病,其特征是患者血浆高密度脂蛋白胆固醇水平大幅降低,其胆固醇外排

功能受损,细胞内胆固醇酯积聚。因此,Tangier 病患者往往比正常人更早发生冠状动脉性心脏病和外周动脉粥样硬化性疾病<sup>[7]</sup>。而上调 ABCA1 的表达及其胆固醇外排功能均能发挥抗动脉粥样硬化作用<sup>[8]</sup>。为明确褪黑素对 ABCA1 表达的直接影响作用,笔者



用不同浓度的褪黑素体外干预 THP - 1 来源的巨噬细胞,发现褪黑素可同时上调 ABCA1 转录和蛋白水平,表明一定药理剂量浓度的褪黑素可以直接影响 ABCA1 的表达水平,尤其以  $1\mu\text{mol/L}$  浓度的褪黑素干预组最为显著。

研究表明,ABCA1 的表达可能受到多种核转录因子的调控,包括肝 X 受体(LXR)、视黄素 X 受体(RXR)和过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR),而 PPAR 被认为是 LXR 的上游转录调控因子<sup>[9~12]</sup>。其中,PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  通路是目前研究最深入的调控 ABCA1 表达和功能的信号转导通路,其与动脉粥样硬化发生过程密切相关<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,作为 PPAR $\gamma$  拮抗剂,GW9662 显著抑制了褪黑素对 ABCA1 和 LXR $\alpha$  表达的促进作用,表明 PPAR $\gamma$  参与了褪黑素对 ABCA1 促表达作用,并同时影响了 LXR $\alpha$  的表达。这之前报道的 PPAR $\gamma$  对 LXR $\alpha$  存在调控作用的结果一致<sup>[14]</sup>。而 GSK2033 显著抵消了褪黑素上调 ABCA1 作用,但其并不影响 LXR $\alpha$  的蛋白表达。这一方面表明,LXR $\alpha$  拮抗剂可能对 LXR $\alpha$  仅发挥功能性阻断作用;另一方面表明,LXR $\alpha$  也参与了褪黑素对 ABCA1 表达的调控。因此笔者推测褪黑素通过 PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  - ABCA1 参与的途径调节巨噬细胞 ABCA1 的表达。

既往研究发现,褪黑素通过与其膜受体 MT1 和 MT2 或核受体相互作用,从而调节哺乳动物的一些生理功能<sup>[15]</sup>。而本研究结果表明,褪黑素膜受体 MT1 和 MT2 都不参与褪黑素诱导的 ABCA1 表达。Cecon 等<sup>[16]</sup>研究认为,褪黑素作为亲脂性激素,可以进入细胞直接与核转录因子相互作用,而不经细胞的膜受体。Zhang 等<sup>[17]</sup>研究表明,褪黑素核受体与 PPAR  $\gamma$  交互作用可能影响体外培养细胞的部分功能表达。因此笔者推测,褪黑素可能通过核受体而非膜受体参与调节 ABCA1 的表达。

综上所述,褪黑素可剂量依赖性的上调巨噬细胞 ABCA1 的表达,PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  通路参与了褪黑素对 ABCA1 表达的调节作用,且该调节作用不依赖褪黑素膜受体。

#### 参考文献

1 Loloei S, Sepidarkish M, Heydarian A, *et al.* The effect of melatonin supplementation on lipid profile and anthropometric indices: a systematic review and meta - analysis of clinical trials[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13 (3): 1901 - 1910

2 Hutchins PM, Heinecke JW. Cholesterol efflux capacity, macrophage reverse cholesterol transport and cardioprotective HDL[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2015, 26 (5): 388 - 393

3 Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(35): 24020 - 24029

4 王雨, 刘晓燕, 陈连凤, 等. 褪黑素缺乏对去松果体大鼠巨噬细胞胆固醇外流功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (6): 493 - 496

5 邓倩, 李小雪, 方延廷, 等. ATP 结合 ABCA1 在动脉粥样硬化性疾病发生发展中的作用机制研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(1): 65 - 69

6 Matsunaga A, Sasaki J. Tangierdisease[J]. *Ryoikibetsu shokogun shirizu*, 1998, 19(2): 20 - 23

7 Muratsu J, Koseki M, Masuda D, *et al.* Accelerated atherogenicity in Tangier disease[J]. *Atheroscler Thromb*, 2018, 25 (10): 1076 - 1085

8 Ren K, Jiang T, Zhou HF, *et al.* Apigenin retards atherogenesis by promoting ABCA1 - mediated cholesterol efflux and suppressing inflammation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5): 2170 - 2184

9 Liu Y, Tang C. Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways[J]. *Biochim Et Biophys Acta*, 2012, 1821(3): 522 - 529

10 付育, 李霓. 靶向肝 X 受体的抗动脉粥样硬化药物研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(3): 254 - 263

11 Angela C, Nathan K, Brad C, *et al.* ABCA1 is necessary for hexarotene - mediated clearance of soluble amyloid beta from the hippocampus of APP/PS1 Mice [J]. *J Neuroimmun Pharmacol*, 2016, 11 (1): 61 - 72

12 Lin XL, Hu HJ, Liu YB, *et al.* Allicin induces the upregulation of ABCA1 expression via PPARgamma/LXRalpha signaling in THP - 1 macrophage - derived foam cells[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (6): 1452 - 1460

13 Gu HF, Li N, Xu ZQ, *et al.* Chronic unpredictable mild stress promotes atherosclerosis via HMGB1/TLR4 - mediated downregulation of PPARgamma/LXRalpha/ABCA1 in ApoE ( - / - ) Mice [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 165 - 165

14 Dong SZ, Zhao SP, Wu ZH, *et al.* Curcumin promotes cholesterol efflux from adipocytes related to PPARgamma - LXRalpha - ABCA1 passway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 358(1 - 2): 281 - 285

15 MucahitE, Halil O, Lutfu O, *et al.* A review of melatonin, its receptors and drugs[J]. *Eurasian J Med*, 2016, 48(2): 135 - 141

16 Cecon E, Liu L, Jockers R. Melatonin receptor structures shed new light on melatonin research [J]. *J Pineal Res*, 2019, 67 (4): e12606 - e12606

17 Zhang L, Su P, Xu C, *et al.* Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARgamma expression and enhancing Runx2 expression[J]. *J Pineal Res*, 2010, 49(4): 364 - 372

(收稿日期: 2020 - 12 - 11)

(修回日期: 2020 - 12 - 25)