

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.03.001

文章编号: 1005-8982(2016)03-0001-08

论著

慢病毒介导磷酸二酯酶 7A 基因沉默细胞株的构建 及三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的表达变化*

向乐,唐菀泽,张志珍,马卫列

(广东医学院 生物化学与分子生物学教研室,广东 东莞 523808)

摘要:目的 利用慢病毒介导构建磷酸二酯酶 7A (*PDE7A*) 基因沉默人单核巨噬细胞 (THP-1) 株,并分析沉默细胞株的三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ABCA1) 的表达变化。**方法** 以 *PDE7A* 基因为靶点,设计合成 3 段 shRNA 片段,与慢病毒载体 PmiRzip 连接,构建重组质粒。测序鉴定后进行病毒包装,感染 THP-1 细胞,实时荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 进行分析,确定最佳干扰片段。嘌呤霉素筛选得到 *PDE7A* 基因沉默稳转细胞株。qPCR 和 Western blot 检测鉴定所构建的细胞株,将其诱导成为泡沫细胞后鉴定 ABCA1 基因的表达。**结果** 转染 shRNA1、shRNA2、shRNA3 细胞的 *PDE7A* 相对表达量分别为 (0.480 ± 0.028) 、 (0.561 ± 0.016) 和 (0.377 ± 0.013) ,故选择 shRNA3 作为干扰 *PDE7A* 基因的最佳片段。采用 1.4 g/L 嘌呤霉素成功筛选出 *PDE7A* 沉默细胞株,qPCR 和 Western blot 检测 *PDE7A* 基因的干扰效率,其抑制效率 >70%。将其诱导成巨噬泡沫细胞后,Western blot 检测显示,ABCA1 的表达量增加 40%。**结论** 成功构建 *PDE7A* shRNA 慢病毒干扰载体,并筛选出 *PDE7A* 基因沉默的 THP-1 细胞株,且 ABCA1 的表达量增加。

关键词: 磷酸二酯酶 7A; RNA 干扰; 慢病毒; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

中图分类号: R341

文献标识码: A

Construction of *PDE7A* gene silencing THP-1 cell lines by lentivirus-mediated RNA interference and expression of ABCA1*

Le Xiang, Wan-ze Tang, Zhi-zhen Zhang, Wei-lie Ma

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical
College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: Objective To construct phosphodiesterase 7A (*PDE7A*) gene silencing human acute monocytic leukemia (THP-1) cell lines by lentivirus-mediated RNA interference technique, and to analyze the expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in THP-1 cell lines. **Methods** Three human *PDE7A* gene targeted shRNA fragments (shRNA1, shRNA2 and shRNA3) and shRNA-NC fragment were designed and synthesized, then connected with lentiviral vector PmiRzip to construct recombinant plasmids. After DNA sequencing, the lentivirus was packaged, and infected the THP-1 cells. The inhibitory effect of *PDE7A* shRNAs was analyzed by qPCR. Subsequently, the THP-1 cells were screened with Puromycin to get stable *PDE7A* gene silencing cell lines which were then identified by qPCR and Western blot. The expression of ABCA1 was determined after THP-1 cells were induced to develop macrophage foam cells. **Results** The relative expression of *PDE7A* in the cells transfected with shRNA1, shRNA2 or shRNA3 was (0.480 ± 0.028) , (0.561 ± 0.016) and (0.377 ± 0.013) respectively; then shRNA3 was chosen as interferent *PDE7A* gene fragment. *PDE7A* silence cell lines were successfully screened with 1.4 g/L Puromycin. *PDE7A* gene interference efficiency was identified by qPCR and Western blot, and inhibition efficiency was more than 70%. The expression of ABCA1 was

收稿日期: 2015-10-14

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81170267); 广东省高等学校人才引进专项 [No: 粤财教 (2013) 246 号]

[通信作者] 马卫列, E-mail: mazhangwu@163.com

increased by more than 40% after THP-1 cells were induced into macrophage foam cells. **Conclusions** *PDE7A* silencing lentivirus interference vector has been successfully constructed, and *PDE7A* gene silencing THP-1 cell lines have been screened out in which ABCA1 expression is increased.

Keywords: phosphodiesterase 7A; RNA interference; lentivirus; ATP-binding cassette transporter A1

胆固醇在巨噬细胞中积累是动脉粥样硬化形成的关键因素,促进细胞中胆固醇的逆向转运(reverse cholesterol transport,RCT)是防治动脉粥样硬化的有效方法^[1-2]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1,ABCA1)主要转运细胞内胆固醇至贫脂的载脂蛋白 A-1(apolipoprotein A-1,apoA-1),通过增加高密度脂蛋白来启动 RCT,促进细胞中胆固醇外排。

磷酸二酯酶 7A(phosphodiesterase 7A,PDE7A)作为环腺苷一磷酸(cyclic adenosine monophosphate,cAMP)特异性蛋白水解酶,可降低细胞中 cAMP 浓度^[3-4]。cAMP 作为第二信使,通过 cAMP/PKA 信号通路上调 ABCA1 表达,促进细胞内胆固醇外流^[5-6]。因此,干扰细胞 PDE7A 的表达,使细胞内 cAMP 浓度增加而上调 ABCA1 表达,进而促进胆固醇外流。为研究 PDE7A 在促进细胞内胆固醇外流中的作用,需要构建合适的细胞模型。本实验以人单核巨噬细胞(human acute monocytic leukemia cell line,THP-1)为研究对象,通过慢病毒介导的 shRNA 干扰技术构建 *PDE7A* 基因沉默细胞株,为后续研究 *PDE7A* 基因功能及巨噬细胞内胆固醇逆向转运提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

THP-1 细胞购自湘雅医学院细胞库,HEK-293FT 细胞、HEK-293T 细胞及慢病毒包装系统由中国医学科学院医药生物技术研究所免疫生物学室惠赠,Lipofectine 2000 购自美国 Life 公司,改良杜氏伊格尔培养基(dulbecco modified eagle medium,DMEM)、洛斯基维-1640(roswell park memorial institute 1640,RPMI 1640)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国 Gibco 公司,嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司,聚凝胺(Polybrene)购自上海翊圣生物科技有限公司,佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate,PMA)购自美国 Promega 公司,ac-LDL 购自上海经科化学科技有限公司,apoA-1 购自美国 Sigma 公司,无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生物公司,荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司。

兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)一抗购自杭州至贤生物公司,兔抗 PDE7A 一抗购自英国 Abcam 公司,兔抗 ABCA1 一抗购自美国 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 设计合成 根据 GenBank 中 *PDE7A* mRNA 全序列(NM_002603)及短发夹 RNA(shRNA)设计原则,分别设计合成 3 条靶序列和阴性对照序列的 shRNA 寡核苷酸单链:①5'-GGCCATGCACTGTTACTTAAA-3';②5'-GAAATAGTCTAGTAAGCTTA A-3';③5'-GATCGTCACACTGAATCTATT-3';④NC:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3',由上海吉泰生物技术有限公司合成。

1.2.2 慢病毒干扰载体构建及慢病毒包装 ①慢病毒干扰载体构建:将设计合成的 3 条靶序列和阴性对照序列连接到慢病毒载体 Pmi Rzip 中,构建重组质粒 Pmi Rzip-shRNA1、Pmi Rzip-shRNA2、Pmi Rzip-shRNA3、Pmi Rzip-shRNA-NC;将重组质粒转化为大肠杆菌 DH5 α ,筛选得到单菌落,挑取单菌落扩大培养,提取质粒用 *Eco*I 和 *Bam*HI 双酶切鉴定,实验重复 >3 次。将酶切鉴定结果一致的质粒,送上海吉泰生物技术有限公司进行测序。②慢病毒包装:HEK-293FT 细胞铺 10 cm 培养皿,37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳 CO₂ 培养至细胞密度约为 85%时,更换无抗生素、无血清的 DMEM 培养基。取 10.0 ml 离心管,加入 1.5 ml 无血清、无双抗 DMEM,按 pMD 2.0 : psPAX2 : Pmi Rzip-shRNA=1 : 1 : 2 加入 24 μ g 质粒进行稀释。取 1.5 ml Ep 管,各加 1.5 μ l 无血清、无双抗 DMEM,加入 48 μ l Lipofectamine 2000,轻轻混匀,静置 5 min;将稀释的 Lipofectamine 2000 与稀释质粒混匀,静置 15 min 后制备成转染复合物。将质粒与 Lipofectamine 2000 的复合物加入培养皿中,轻轻震荡,使复合物均匀地分散在细胞中;37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 6 h 后更换新鲜无抗生素的 DMEM 完全培养基继续培养,48 h 后在荧光显微镜下观察转染效率,收集病毒,用 0.45 μ m 滤器过滤,4 $^{\circ}$ C、4 500 装,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。病毒包装实验重复 >3 次。

③慢病毒滴度的测定:将 HEK-293T 细胞培养至对数生长期,经胰酶消化后,按 8×10^3 个细胞/孔,接种 96 孔板,待细胞长至 30%~50% 密度时,更换含病毒的完全培养基,病毒用含有 10%FBS 的 DMEM 培养基进行梯度稀释。48 h 后去除含慢病毒的培养基,加入 $100 \mu\text{l}$ 完全培养基。96 h 后在荧光显微镜下观察各孔荧光细胞数,病毒滴度为表达荧光的细胞数乘以相应稀释倍数。

1.2.3 慢病毒 shRNA 干扰效果鉴定 接种 THP-1 细胞于 24 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,加入聚凝胺 (Polybrene) 至浓度 8 g/L。12 h 后用 RPMI 1640 完全培养基将病毒浓缩液稀释 5 倍,加入 Polybrene 至浓度 8 g/L,弃 24 孔板的培养基,加入含病毒的 RPMI 1640 完全培养基。24 h 后更换新鲜 RPMI 1640 完全培养基,培养 72 h 后实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time qPCR) 鉴定最佳干扰片段。

1.2.4 沉默细胞株的构建 ①嘌呤霉素最佳浓度确定:将 THP-1 细胞接种至 24 孔板, 1×10^5 个细胞/孔,置 37°C 、 CO_2 培养箱中培养 24 h。分别用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 g/L 嘌呤霉素对正常 THP-1 细胞进行筛选预实验,14 d 后观察细胞全部死亡的最小浓度作为最佳筛选浓度。②建立 PDE7A 沉默细胞株:接种 THP-1 细胞至 6 孔板, 2×10^6 个细胞/孔,加入 Polybrene 至浓度 8 g/L。12 h 后用 RPMI 1640 完全培养基将最佳干扰片段 shRNA3 病毒上清液稀释 5 倍,加入 Polybrene 至浓度 8 g/L,弃 6 孔板的培养基,加入含病毒的 RPMI 1640 完全培养基。24 h 后更换新鲜 RPMI 1640 完全培养基,培养 48 h 后用 0.4 g/L 嘌呤霉素 RPMI 1640 完全培养基筛选细胞,正常 THP-1 细胞做对照组,逐渐增加嘌呤霉素的浓度至最佳筛选浓度 1.4 g/L,直至无细胞死亡。连续培养 50 代后,采用 qPCR 和 Western blot 检测鉴定 PDE7A 的表达。

1.2.5 PDE7A 沉默细胞株的鉴定 ①PDE7A 基因沉默细胞株的 qPCR 鉴定:分别取 THP-1 细胞、PDE7A 沉默的 THP-1 细胞和 shRNA-NC-THP-1 细胞,按 RNA 提取试剂盒说明书进行提取各细胞的总 RNA,逆转录成 cDNA。以 GAPDH 为内参,使用 Light Cycler@96 实时荧光定量 PCR 仪检测 THP-1 细胞和各组 THP-1 基因沉默细胞 PDE7A 基因的相对表达,实验重复 3 次。②PDE7A 蛋白表达分析,分别取 THP-1 细胞、PDE7A 沉默的 THP-1 细胞和

shRNA-NC-THP-1 细胞,800 r/min 离心 5 min 去培养基,加入细胞裂解液置冰上裂解 40 min; 12 000 r/min 离心 10 min;加入 $5 \times$ 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 上样缓冲液,沸水浴中变性 5 min;进行 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜,5%牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 2 h;分别用 PDE7A 和 GAPDH 抗体 4°C 孵育过夜;TBST 缓冲液 (tris buffered saline with tween-20, TBST) 洗膜 5 次,每次 5 min,加入二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min,加入增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 化学发光试剂后进行成像,并用蛋白灰度分析软件分析结果,实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 PDE7A 沉默的巨噬泡沫细胞中 ABCA1 的表达 取 6 孔板, 1.5×10^6 个细胞/孔,实验分 4 组。第 1、2 组接种 THP-1 细胞;第 3 组接种 shRNA-NC-THP-1 细胞,第 4 组接种 PDE7A 沉默的 THP-1 细胞。加入 PMA 至终浓度 160 nmol/L, 37°C 、5% CO_2 培养 48 h,使悬浮细胞分化为贴壁巨噬细胞。加入含 0.2%BSA 和 37.5 g/LAc-LDL 的 1640 完全培养基, 37°C 、5% CO_2 培养 48 h,使巨噬细胞变为泡沫细胞。加入含 10 g/L apoA-1 的 1640 完全培养基,12 h 提取蛋白,Western blot 检测分析泡沫细胞中 ABCA1 的表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用单因素方差 (One-way, ANOVA) 分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

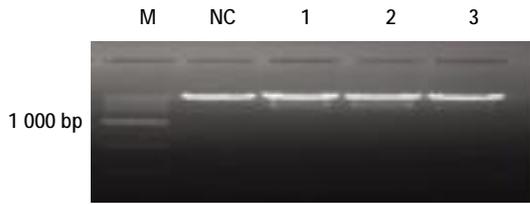
2 结果

2.1 慢病毒干扰载体的构建

根据 PDE7A 的基因序列设计 3 段寡核苷酸片段,构建慢病毒重组质粒,用 *Eco*I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定 (见图 1)。将阳性重组质粒测序,证实插入的核酸序列与前期设计完全一致 (见图 2),提示 PDE7A 基因 shRNA 慢病毒表达载体构建成功。

2.2 慢病毒包装

如图 3 所示,按 pMD2.0 : psPAX2 : Pmi Rzip-shRNA=1 : 1 : 2 共转染 HEK-293FT 细胞, 37°C 、5% CO_2 培养 6 h,更换新鲜无抗生素的 DMEM 完全培养基继续培养,48 h 后在荧光显微镜下观察转染



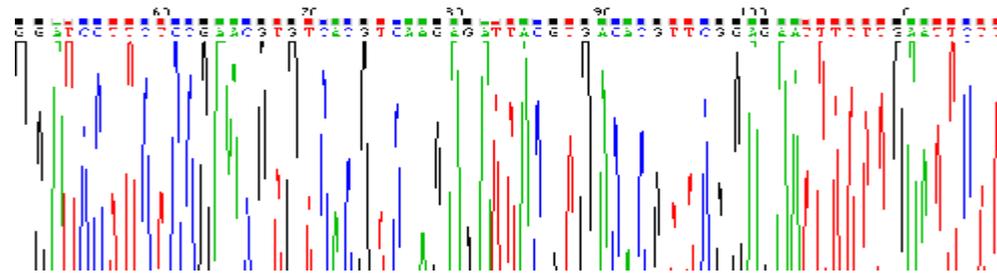
M: Marker; NC: PmiRZip-shRNA-NC; 1: PmiRZip-shRNA1; 2: PmiRZip-shRNA2; 3: PmiRZip-shRNA3

图 1 慢病毒重组质粒的双酶切鉴定

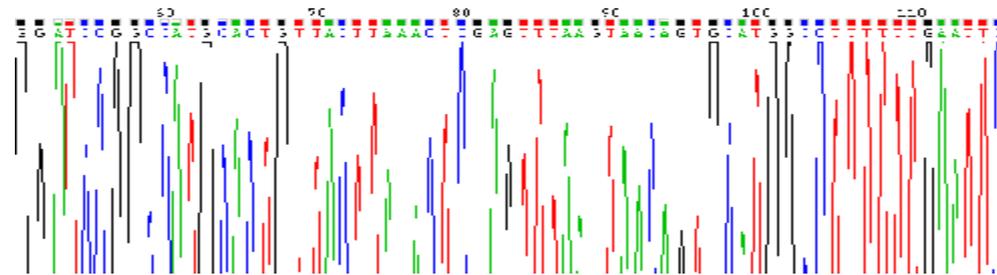
有效率 >90%。

2.3 慢病毒滴度测定

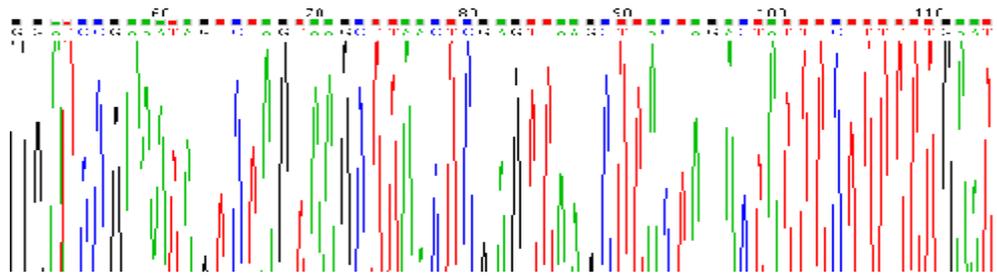
将 HEK-293T 细胞按 8×10^3 个细胞 / 孔, 接种 96 孔板, 待细胞长至 30% ~ 50% 的密度时, 更换含病毒的完全培养基, 病毒用含有 10% FBS 的细胞培养液梯度稀释至 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-8}$ 。48 h 后去除含慢病毒的培养基, 加入 $100 \mu\text{l}$ 完全培养基。96 h 后在荧光显微镜下观察各孔荧光细胞数, 病毒滴度为



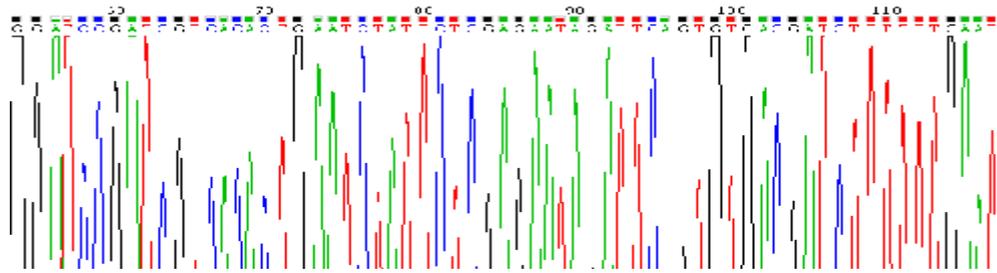
A



B



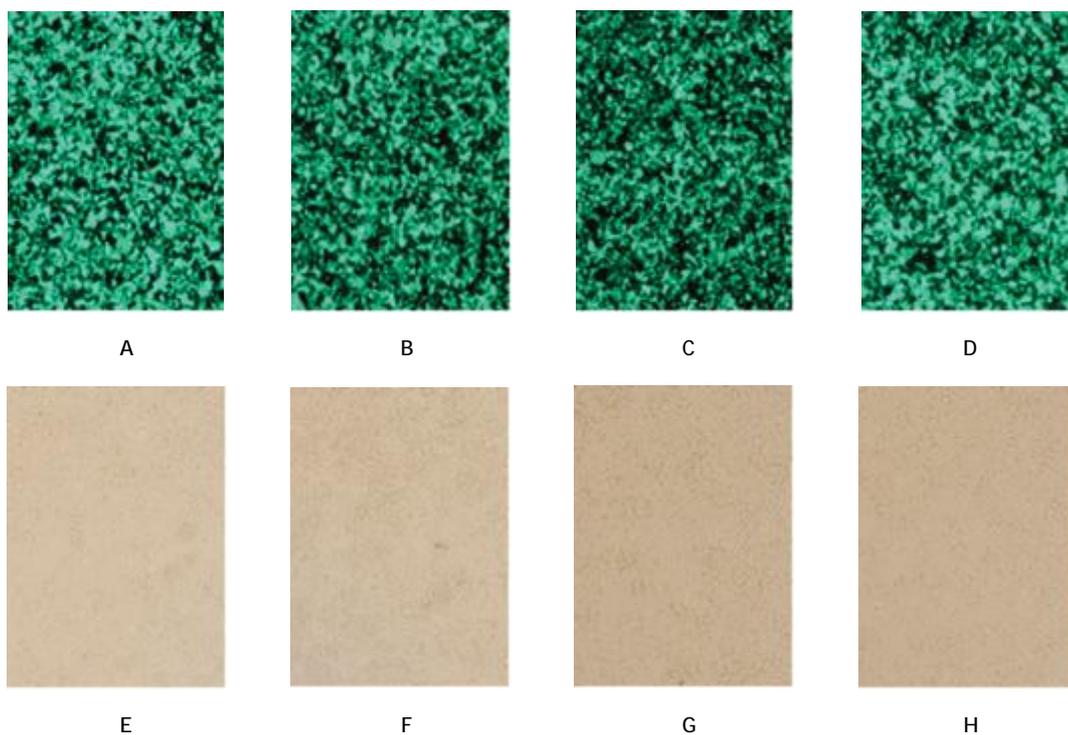
C



D

A: Pmi Rzip-shRNA-NC; B: Pmi Rzip-shRNA1; C: Pmi Rzip-shRNA2; D: Pmi Rzip-shRNA3

图 2 慢病毒重组质粒测序图谱



A:PmiRzip-shRNA1 转染后的绿色荧光 ;B:PmiRzip-shRNA2 转染后的绿色荧光 ;C:PmiRzip-shRNA3 转染后的绿色荧光 ;D:PmiRzip-shRNA-NC 转染后的绿色荧光 ;E:PmiRzip-shRNA1 转染后的白光 ;F:PmiRzip-shRNA2 转染后的白光 ;G:PmiRzip-shRNA3 转染后的白光 ;H:PmiRzip-shRNA-NC 转染后的白光

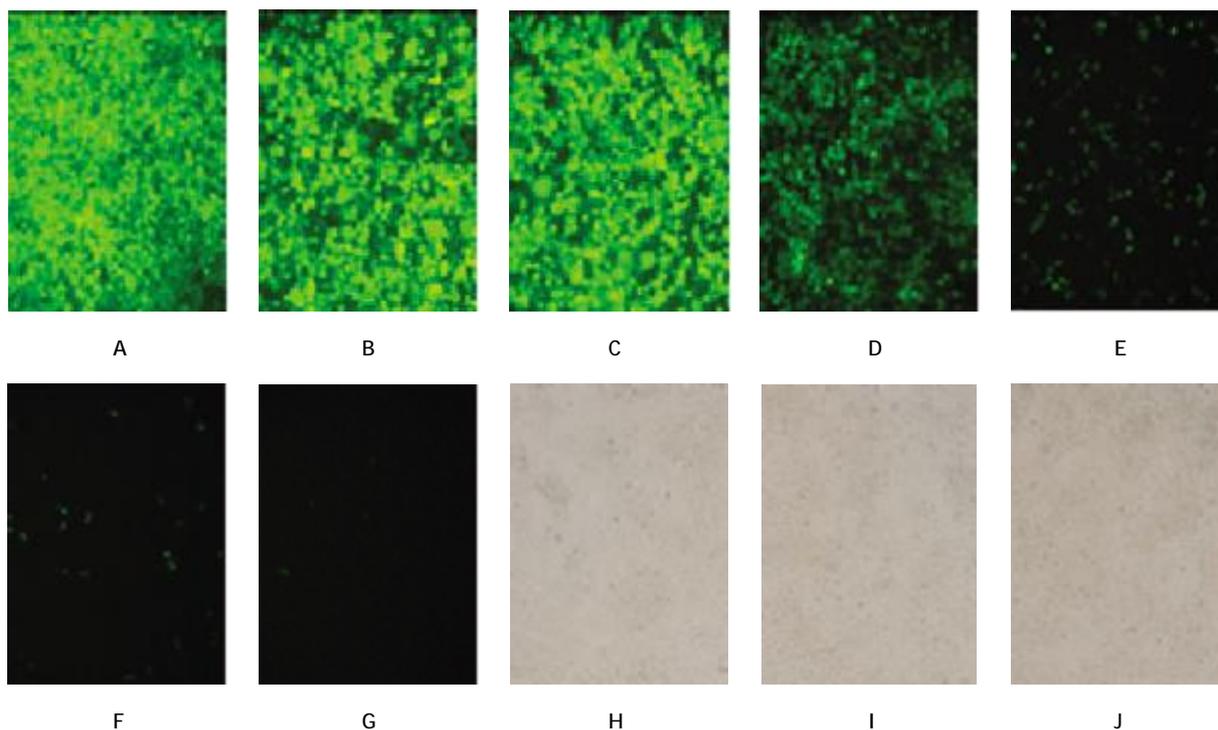
图 3 共转染 48 h 后 HEK-293FT 细胞荧光显微镜观察结果 (× 100)

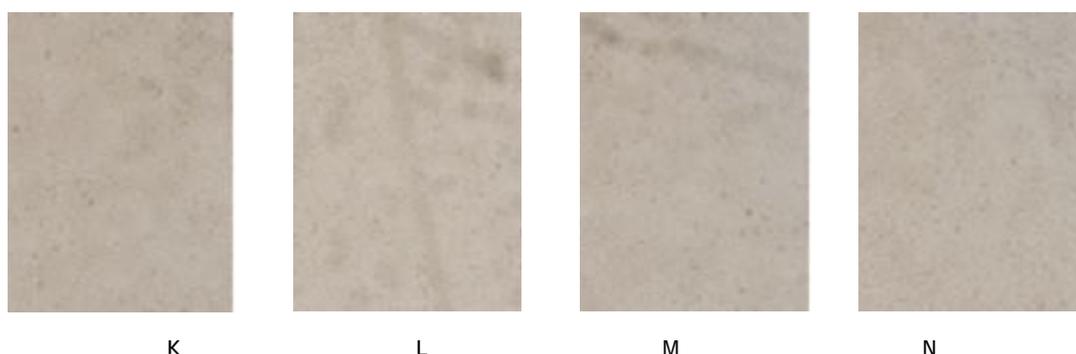
1×10^8 TU/ml。见图 4。

2.4 shRNA 片段的干扰效果分析

3 个干扰片段和阴性对照组病毒稀释液感染

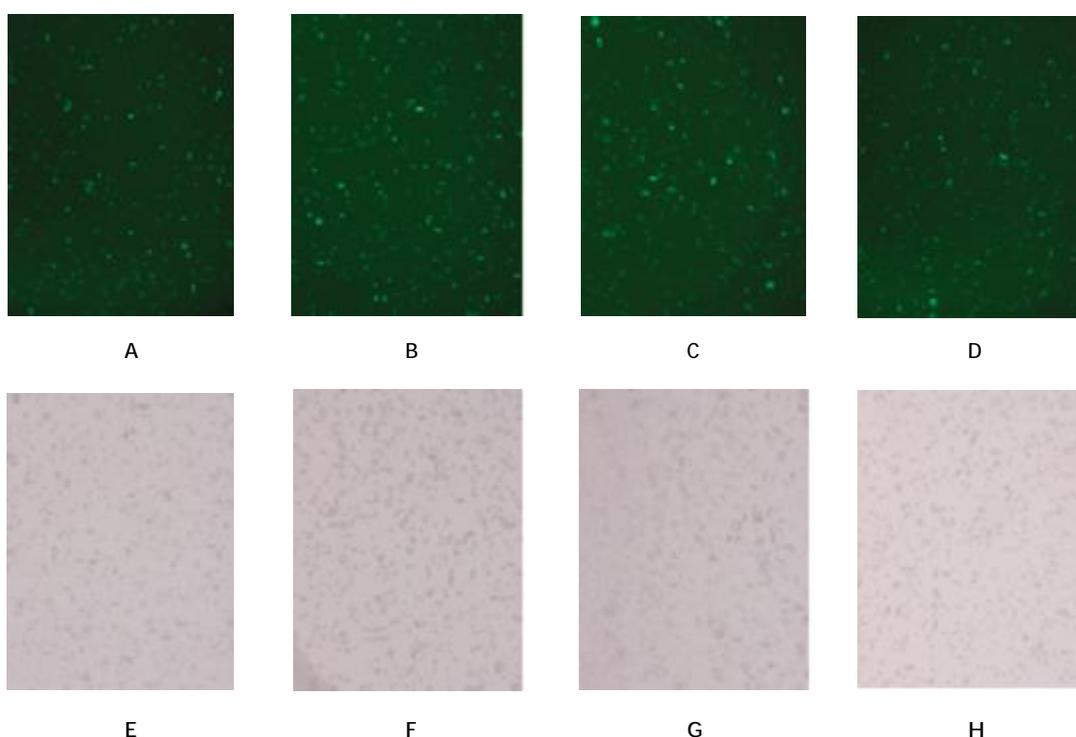
THP-1 细胞,72 h 后荧光显微镜下观察,感染有效率达 90%(见图 5)。通过 qPCR 分析,感染 shRNA1、shRNA2 和 shRNA3 片段慢病毒细胞的 PDE7A





A ~ G: 病毒稀释 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-8}$ 感染 HEK-293T 细胞的荧光表达; H ~ N: 白光下的 HEK-293T 细胞

图 4 病毒稀释液感染 HEK-293T 细胞的荧光图 ($\times 100$)



A: 含 shRNA1 片段的绿色荧光; B: 含 shRNA2 片段的绿色荧光; C: 含 shRNA3 片段的绿色荧光; D: 含 shRNA-NC 片段的绿色荧光; E: 含 shRNA1 片段的白光; F: 含 shRNA2 片段的白光; G: 含 shRNA3 片段的白光; H: 含 shRNA-NC 片段的白光

图 5 慢病毒感染 THP-1 细胞 72h 后荧光显微镜下观察结果 ($\times 100$)

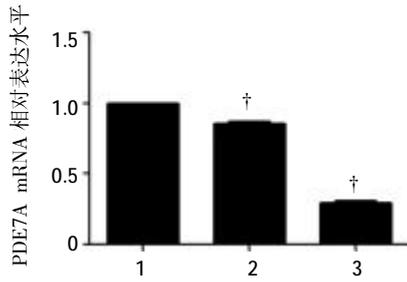
相对表达量分别为 (0.480 ± 0.028) 、 (0.561 ± 0.016) 和 (0.377 ± 0.013) , 提示 shRNA3 片段对 PDE7A 干扰效果较好, 故后续实验选择 shRNA3 片段作为干扰片段。

2.5 嘌呤霉素最佳浓度确定

本实验分别用 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 g/L 嘌呤霉素对正常 THP-1 细胞进行筛选, 14 d 后 0.4 g/L 少部分细胞死亡, 0.8 g/L 大部分细胞死亡, 1.4 g/L 细胞几乎全部死亡, 故确定嘌呤霉素最佳浓度为 1.4 g/L。

2.6 PDE7A 沉默细胞株的鉴定

连续培养 50 代后, qPCR 结果表明, shRNA-NC-THP-1 和 shRNA3-THP-1 细胞中 PDE7A mRNA 相对表达量分别为 (0.859 ± 0.016) 和 (0.293 ± 0.032) , 差异有统计学意义 ($P=0.000$) (见图 6 和表 1)。Western blot 检测 THP-1 细胞、shRNA-NC-THP-1 和 shRNA3-THP-1 细胞中 PDE7A 蛋白表达 (见图 7 和表 2)。蛋白灰度分析软件分析表明, shRNA3-THP-1 细胞中 PDE7A 蛋白的相对表达量为 (0.153 ± 0.025) , 差异有统计学意义

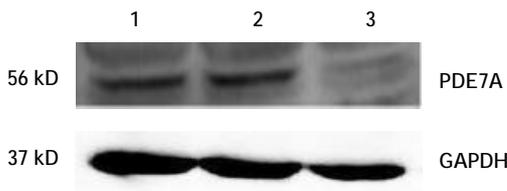


1: 正常 THP-1 细胞;2: 含 shRNA-NC 病毒感染细胞;3: 含 shRNA3 病毒感染细胞;† 与正常 THP-1 细胞比较, $P < 0.01$

图 6 PDE7A mRNA 相对表达水平

表 1 PDE7A mRNA 在 THP-1、shRNA-NC-THP-1 和 shRNA3-THP-1 的相对表达水平方差分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理组间	0.839	2	0.420	958.520	0.000
误差	0.003	6	0.000		
合计	0.842	8			



1: THP-1 细胞;2: shRNA-NC 病毒感染细胞;3: shRNA3 病毒感染细胞

图 7 PDE7A 蛋白相对表达水平

表 2 PDE7A 蛋白在 THP-1、shRNA-NC-THP-1 和 shRNA3-THP-1 的相对表达水平方差分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理组间	0.692	2	0.346	173.000	0.000
误差	0.012	6	0.002		
合计	0.704	8			

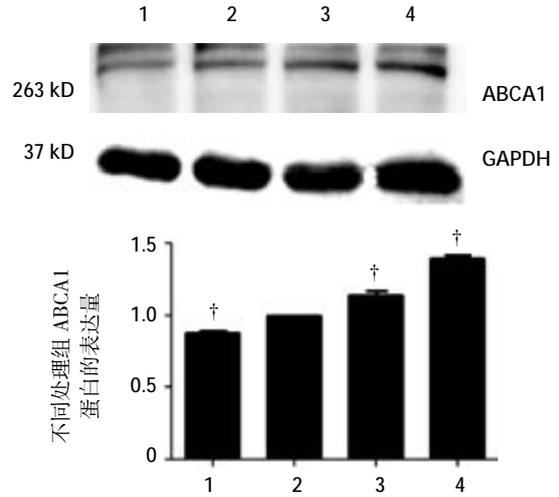
($P = 0.000$)。

2.7 PDE7A 沉默的巨噬泡沫细胞中 ABCA1 蛋白相对表达水平

Western blot 检测巨噬泡沫细胞各组中 ABCA1 的相对表达量(见图 8 和表 3),与 apoA-1 处理

表 3 不同处理组的 ABCA1 蛋白相对表达水平的方差分析

变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
处理组间	0.448	3	0.149	92.520	0.000
误差	0.013	8	0.220		
合计	0.461	11			



1: Ac-LDL 处理组;2: apoA-1 处理组;3: shRNA-NC 处理组;4: shRNA3 处理组;† 与 apoA-1 处理组比较, $P < 0.01$

图 8 不同处理组 ABCA1 蛋白的相对表达量

组比较,shRNA3 处理组 ABCA1 蛋白相对表达量为 (1.400 ± 0.023),差异有统计学意义($P = 0.000$)。

3 讨论

cAMP 作为第二信使在细胞内有重要作用,当其含量变化时会使细胞内信号通路、细胞的增殖及新陈代谢等生理活动受影响。细胞内 cAMP 含量受腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)和磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDEs)的动态调节,通过专一性抑制 PDEs 活性,可减少细胞内 cAMP 降解,促进细胞内过量胆固醇流出,PDEs 抑制剂用于抗动脉粥样硬化形成受到关注^[7]。细胞内 cAMP 特异性 PDEs 主要为 PDE4 和 PDE7^[8]。临床上,现有的 PDE4 抑制剂有明显的副作用,如呕吐、痉挛^[9],所以需要寻找新的 PDEs 抑制剂。PDE7 家族有两种亚型即 PDE7A 和磷酸二酯酶 7B(phosphodiesterase 7B, PDE7B),主要分布在免疫和炎症细胞中,已有多种合成抑制剂^[10]。PDE7B 广泛分布于人体不同组织器官,而 PDE7A 则局限于心脏等器官,且 PDE7A 表达水平比 PDE7B 高出约 10 倍,通过 cAMP/PKA 通路调节 ABCA1 介导的胆固醇流出,可作为新的心血管疾病治疗靶点。

本实验选择人单核 THP-1 细胞作为靶细胞,针对 PDE7A 基因设计干扰片段,与慢病毒载体连接构建重组质粒,经转化、质粒抽提后,电泳与基因测序鉴定慢病毒 PDE7A 干扰载体构建成功。PDE7A 慢病毒干扰载体与病毒包装质粒共转染 HEK-293FT,

荧光显微镜下观察到大量绿色荧光蛋白表达,显示慢病毒成功包装。慢病毒感染 THP-1 细胞后经嘌呤霉素筛选出稳定的干扰细胞株,qPCR 和 Western blot 检测证实 PDE7A 的干扰效率可达 70%。ABCA1 作为主要体内转运体将细胞内胆固醇排出至 apoA-1,是高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)颗粒形成的关键过程。apoA-1 与 ABCA1 结合后促进细胞胆固醇流出,促使贫脂的 apoA-1 形成富含胆固醇的 HDL 进入 RCT 循环^[11-13]。实验结果显示,apoA-1 处理组比 Ac-LDL 处理组的 ABCA1 表达量升高,提示 apoA-1 可通过提高 ABCA1 表达,增强泡沫细胞内胆固醇的流出,shRNA3-apoA-1 处理组的 ABCA1 表达量比 apoA-1 处理组增加 40%,说明干扰后 PDE7A 基因的 ABCA1 表达量增加。本实验为进一步研究 PDE7A 在胆固醇逆向转运中的作用提供实验基础,同时也为发现新的治疗心血管疾病药物提供潜在靶点。

参 考 文 献:

- [1] Yin K, Liao DF, Tang CK. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport[J]. Mol Med, 2010, 16(9): 438-449.
- [2] Lin G, Bornfeldt KE. cAMP-specific PDE4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(2): 663-669.
- [3] Irene P, Emanuela M, Carmen G, et al. PDE-7 Inhibitors: new potential drugs for the therapy of spinal cord injury [J]. PLoS One, 2010, 1(6): 1-15.
- [4] Hu YW, Ma X, Li XX, et al. Eicosapentaenoic acid reduced ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol sflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(2): 35-43.
- [5] Shao B, Tang C, Sinha A, et al. Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase[J]. Circ Res, 2014, 114(11): 1733-1742.
- [6] Feig JE, Hewing B, Smith JD, et al. High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies[J]. Circ Res, 2014, 114(1): 205-213.
- [7] 饶勇, 马卫列, 张志珍, 等. 磷酸二酯酶 7 及其抑制剂[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 28(10): 906-912.
- [8] Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation [J]. Circ Res, 2007, 100(3): 309-327.
- [9] Chapman RW, House A, Richard J, et al. Pharmacology of a potent and selective inhibitor of PDE-4 for inhaled administration[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 643(2/3): 274-281.
- [10] Gewald R. Synthesis and structure-activity relationship studies of dihydronaphthyridinediones as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(22): 6652-6656.
- [11] Areenault BJ, Dube MP, Brodeur MR, et al. Evaluation of links between high-density lipoprotein genetics, functionality, and aortic valve stenosis risk in humans [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(2): 457-462.
- [12] 吴剑锋, 唐艳艳, 曾高峰, 等. 载脂蛋白 A-I 对 HDL 生成影响的研究新进展[J]. 生理科学进展, 2014, 45(2): 81-86.
- [13] Hafiane A, Bielicki JK, Johansson JO, et al. Apolipoprotein E derived HDL mimetic peptide ATI-5261 promotes nascent HDL formation and reverse cholesterol transport in vitro [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(10): 1498-1512.

(童颖丹 编辑)