

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.12.1514

高磷环境下胆固醇敏感器 SCAP 功能失调促进巨噬细胞内胆固醇蓄积

刘巧^{1,2}, 欧阳南³, 何泉¹, 周超^{1*}

1. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016
2. 重庆代谢性疾病转化医学重点实验室, 重庆 400016
3. 重庆医科大学附属第一医院肾脏内科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 观察高磷环境对巨噬细胞内胆固醇蓄积的影响及其分子机制。**方法** 将人单核细胞株(THP-1)源性巨噬细胞分为对照组(磷 1.0 mmol/L)、高磷处理组(磷 3.0 mmol/L)、磷甲酸钠(PFA)处理组(磷 1.0 mmol/L 加 PFA 1.0 mmol/L)以及高磷联合 PFA 处理组(磷 3.0 mmol/L 加 PFA 1.0 mmol/L),按不同要求分别处理各组细胞。培养 24 h 后,油红 O 染色观察细胞内中性脂质的分布,酶催化比色法定量测定细胞内的胆固醇含量,qPCR 检测细胞内羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGCoAR)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(SCAP) mRNA 的表达,蛋白质印迹法测定细胞内 SCAP、LDLR、HMGCoAR 及核内固醇调节元件结合蛋白 2(N-SREBP2)的蛋白水平,激光共聚焦法检测 SCAP 从内质网向高尔基体的移位情况。**结果** 与对照组相比,高磷处理组巨噬细胞内中性脂质明显聚集,细胞内总胆固醇与胆固醇酯的含量增加($P < 0.05$),LDLR、HMGCoAR mRNA 与蛋白的表达增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),细胞核内 N-SREBP2 的蛋白表达水平增加($P < 0.05$),SCAP 从内质网向高尔基体的移位增加;PFA 处理(高磷联合 PFA 处理组)可阻断高磷引起的上述作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。高磷处理组巨噬细胞内 SCAP 的蛋白水平相对对照组增高($P < 0.05$),PFA 处理能抑制高磷导致的 SCAP 蛋白水平增高,但 SCAP mRNA 的表达在各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 高磷环境下,钠磷转运体介导磷离子进入巨噬细胞内,通过基因转录后机制增加 SCAP 的蛋白水平,诱导其功能失调并促使其异常转运 SREBP2 至高尔基体裂解释放 N-SREBP2,后者转位入核促进 HMGCoAR 和 LDLR 的表达,促使细胞内源性胆固醇合成和外源性 LDL 经 LDLR 摄入的增加,最终导致细胞内胆固醇异常蓄积。

[关键词] 巨噬细胞;高磷酸盐血症;胆固醇贮积病;动脉粥样硬化

[中图分类号] R 392.32; R 364.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)12-1514-07

Dysfunction of cholesterol sensor SCAP under high phosphate condition promotes cholesterol accumulation in macrophage

LIU Qiao^{1,2}, OUYANG Nan³, HE Quan¹, ZHOU Chao^{1*}

1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Chongqing Key Laboratory of Translational Medicine in Major Metabolic Diseases, Chongqing 400016, China
3. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of high phosphate (Pi) condition on the cholesterol accumulation in macrophage and its underlying mechanisms. **Methods** The human monocytic cell line THP-1 derived macrophages were divided into control group (concentration of Pi being 1.0 mmol/L), high Pi exposure group (concentration of Pi being 3.0 mmol/L), phosphonoformic acid (PFA) treatment group (concentration of Pi and PFA being 1.0 mmol/L) and high phosphate plus PFA treatment group (concentration of Pi and PFA being 3.0 mmol/L and 1.0 mmol/L, respectively). Intracellular neutral lipids were observed by Oil Red O staining. Cholesterol contents were quantified by enzyme catalyzed colorimetry. qPCR was used to detect the relative mRNA expressions of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme

[收稿日期] 2017-06-05 **[接受日期]** 2017-08-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81500341). Supported by Youth Science Fund of National Natural Science Foundation of China (81500341).

[作者简介] 刘巧,硕士,住院医师. E-mail: 1015262646@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-89011565, E-mail: zhouchao2008@hotmail.com

A reductase (HMGCoAR), low density lipoprotein receptor (LDLR) and sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage activating protein (SCAP), and their proteins and nuclear SREBP 2 (N-SREBP2) protein expressions were assessed by Western blotting. The translocation of SCAP from endoplasmic reticulum (ER) to Golgi body was observed by laser confocal microscope. **Results** Compared with the control group, the macrophages in the high Pi exposure group showed an obvious aggregation of neutral lipids and significantly increased contents intracellular cholesterol ester and total cholesterol ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of LDLR and HMGCoAR, and protein level of N-SREBP2 in macrophage nucleus in the high Pi exposure group were increased significantly in comparison to the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The SCAP translocated obviously from ER to Golgi body. However, above-mentioned changes were significantly suppressed by PFA treatment (high Pi plus PFA treatment group) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, the significant increase of protein level of SCAP induced by high Pi treatment ($P < 0.05$) was suppressed by PFA treatment, but there were no differences in SCAP mRNA expressions in each group ($P > 0.05$). **Conclusion** Under high Pi condition, sodium-phosphate transporter Pit-1 mediates the entry of phosphorus ions into the macrophages. High Pi concentration in macrophages up-regulates the protein level via a post transcriptional pathway and induces the dysfunction of SCAP, which facilitates the transport of SREBP2 from ER to Golgi body. SREBP2 in Golgi body is splitted, activated and releases N-SREBP2. The N-SREBP2 translocates into the nucleus and promotes the expressions of LDLR and HMGCoAR, increasing exogenous LDL uptake and endogenous cholesterol synthesis leading abnormal accumulation of intracellular cholesterol.

[**Key words**] macrophage; hyperphosphatemia; cholesterosis; atherosclerosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(12): 1514-1520]

动脉粥样硬化性心血管疾病是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者最常见的并发症和死亡原因之一^[1-2]。高磷血症是 CKD 患者发生加速性动脉粥样硬化的独立危险因素, 但其促进动脉粥样硬化的分子机制不清^[3-4]。固醇调节元件结合蛋白 2 (sterol regulatory element binding protein 2, SREBP2) 及其裂解激活蛋白 (SREBP cleavage activating protein, SCAP) 介导的负反馈调控系统对真核细胞内胆固醇稳态的调节具有关键作用^[5], 其功能异常与炎症、糖尿病等多种病理状态下外周细胞内脂质异常集聚有关^[6-7]。本研究拟利用体外细胞培养模拟高磷血症, 探讨高磷环境对巨噬细胞内源性胆固醇积聚的影响及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 人单核细胞株 (human acute monocytic leukemia cell line, THP-1, No: TIB-202) 购于美国 ATCC 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于德国 PAN 公司, DMEM 培养基、青/链霉素购于 Hyclone 公司, 蛋白酶抑制剂、佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA)、磷酸钠 (phosphonoformic acid, PFA)、无脂肪酰牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、磷酸二氢钠

(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 购于美国 Sigma 公司, 培养瓶、培养皿购于 NEST 公司, PrimeScript RT 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司, 兔抗人 SCAP 多克隆一抗、兔抗人 SREBP2 多克隆一抗购于 Abgent 公司, 兔抗人羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, HMGCoAR) 多克隆一抗购于美国 Abcam 公司, 兔抗人低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 多克隆一抗购于武汉三鹰公司, 兔抗小鼠、山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 小鼠抗 Golgin 一抗、山羊抗兔绿色荧光二抗、山羊抗小鼠红色荧光二抗购于英国 Molecular Probes 公司。激光扫描共聚焦显微镜 (LEICA TCS SP2)、正置高清显微镜 (DM4000B) 由德国 Leica 公司生产。其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养及巨噬细胞处理 THP-1 细胞使用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液 (生长培养基), 置于 37 °C、5% CO_2 孵箱中培养。均匀接种适量 THP-1 细胞于含 160 nmol/L PMA 的生长培养液中培养 72 h, 诱导分化其成为形态典型的 M1 型巨噬细胞^[8]。使用含 0.5% BSA 和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养液作为实验培养液。将分化成熟的巨噬细胞用实验培养液预

处理 12 h 后,使用 pH 为 7.4 的 200 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液配制不同磷浓度实验培养液,设置对照组(含磷 1.0 mmol/L)、高磷处理组(含磷 3.0 mmol/L)、PFA 处理组(含磷 1.0 mmol/L 及 PFA 1.0 mmol/L)、高磷联合 PFA 处理组(含磷 3.0 mmol/L 及 PFA 1.0 mmol/L)处理细胞,置于 37 °C、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后待检。

1.3 巨噬细胞油红 O 染色 将 THP-1 细胞接种于 1 cm×1 cm 玻片上,经诱导分化和不同处理 24 h 后收集各组细胞,4%多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗,1,2-丙二醇孵育 2 min 后加入 0.2%油红 O 染液染色 15 min,苏木精染核,甘油明胶封片,正置显微镜高倍视野(×400)下观察拍照。

1.4 细胞内胆固醇定量测定 将细胞接种于 6 孔板内,经诱导分化和处理后收集各组细胞悬液,离心去除上清,加入氯仿/甲醇溶液混匀,超声震碎后摇床室温震荡 15 min,超高速离心,取上清液真空干燥后加入 95%乙醇溶液,测量细胞内的游离胆固醇(free cholesterol, FC)及总胆固醇(total cholesterol, TC)含量,两者之差即为胆固醇酯(cholesterol ester, CE)含量。另取超高速离心沉淀,加入 1.0 mol/L NaOH 溶液至沉淀完全溶解,使用 Lowry 法测量蛋白浓度,以各组细胞蛋白含量标化胆固醇含量。

1.5 qPCR 检测 LDLR、HMGCoAR 及 SCAP mRNA 的表达 取 THP-1 细胞接种于 6 孔板中,诱导分化和给予不同处理后,TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,用 Nano 2000 核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度并标准化。按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将不同组等量 RNA 反转录为 cDNA。以 β actin 为内参,按照 25 μL 反应体系使用 Opticon 2 real time PCR 仪进行 qPCR,检测 SCAP、HMGCoAR、LDLR 及 β actin mRNA 的表达水平。引物序列如下:SCAP 上游 5'-GGG AAC TTC TGG CAG AAT GAC T-3',下游 5'-CTG GTG GAT GGT CCC AAT G-3';LDLR 上游 5'-CTG TGG GCT CCA TAG GCT ATC T-3',下游 5'-GCG GTC CAG GGT CAT CTT C-3';HMGCoAR 上游 5'-TCT GGC AGT CAG TGG GAA CTA TT-3',下游 5'-CCT CGT CCT TCG ATC CAA TTT-3'; β actin 上游 5'-CCT GGC ACC CAG CAC

AAT-3',下游 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'。qPCR 反应条件为:50 °C 120 s,95 °C 300 s;95 °C 20 s,55 °C 20 s,共 40 次循环;95 °C 60 s,55 °C 60 s。以 Ct 值反应初始模板量,采用比较 Ct 值法($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)计算目的基因表达水平。

1.6 蛋白质印迹法检测 LDLR、HMGCoAR、N-SREBP2 及 SCAP 的蛋白水平 各组巨噬细胞经不同处理后,PBS 清洗 3 次,使用添加 1%蛋白酶抑制剂的裂解液裂解细胞,提取总蛋白,按照核蛋白提取试剂盒说明书提取细胞核蛋白,使用 Lowry 法测定蛋白浓度并标准化。各组取等量蛋白(80~100 μg)上样,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,250 mA 4 °C 转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入兔抗人 HMGCoAR 一抗(1:1 000)、兔抗人 LDLR 一抗(1:1 000)、兔抗人 SCAP 一抗(1:200)、兔抗人 SREBP2 一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)1 h,超敏 ECL 显影液及凝胶成像系统显影,以目标蛋白与 β -actin 条带的光密度值比值为其相对表达含量。

1.7 激光共聚焦法检测 SCAP 共定位 取 THP-1 细胞接种于 1 cm×1 cm 玻片上,经诱导分化和不同处理后,4%多聚甲醛室温固定,0.25% Triton X-100 透膜,10%山羊血清室温封闭 30 min,加入兔抗人 SCAP 一抗(1:50)、小鼠抗 Golgin 一抗(1:50)室温孵育 1 h,PBS 清洗 15~30 min,加入山羊抗兔绿色荧光二抗(1:100)、山羊抗小鼠红色荧光二抗(1:100)室温避光孵育 60 min,PBST 清洗 3 次后共聚焦显微镜下观察并拍摄照片。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件分析处理数据,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多个不同处理组定量指标比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用两样本均数的 t 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 THP-1 源性巨噬细胞油红 O 染色 高磷处理组巨噬细胞内中性脂质含量明显高于对照组,表现为红染颗粒更多、更大。PFA 处理组巨噬细胞内中性脂质含量较对照组并无显著减少,但高磷环境下 PFA 处理(高磷联合 PFA 处理组)明显抑制了高磷引起的细胞内脂质蓄积。见图 1。

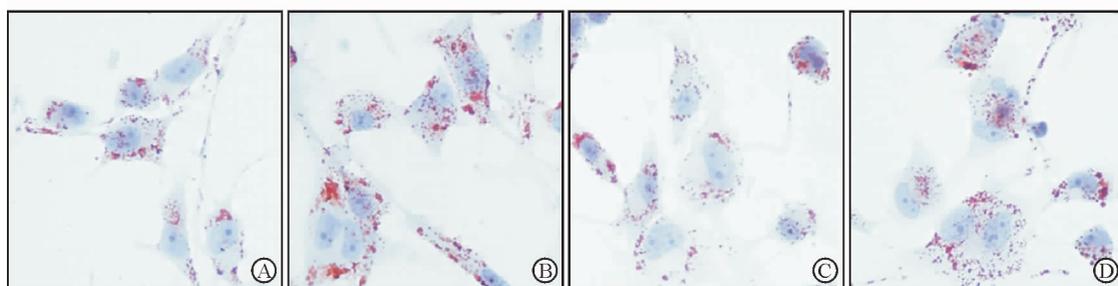


图 1 油红 O 染色观察高磷及 PFA 对巨噬细胞内脂质蓄积的影响

Fig 1 Effects of high phosphate condition and PFA on neutral lipid accumulation in macrophage by Oil Red O staining

A: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; B: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; C: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; D: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA; Phosphonoformic acid. Original magnification: $\times 400$

2.2 细胞内胆固醇定量测定 使用酶催化比色法定量测定细胞内胆固醇含量, 消除油红 O 染色法中脂肪酸造成的假阳性。结果(图 2)显示, 高磷处理组巨噬细胞内 TC 和 CE 含量较对照组均增加($P < 0.05$), 而 FC 含量在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与单纯高磷处理组相比, 高磷联合 PFA 处理组巨噬细胞内 TC 和 CE 含量降低($P < 0.05$), 接近对照组的水平。

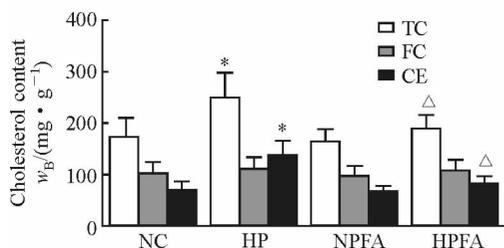


图 2 高磷及 PFA 对巨噬细胞内胆固醇含量的影响

Fig 2 Effects of high phosphate condition and PFA on cholesterol contents in macrophage

NC: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; HP: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; NPFA: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; HPFA: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA; Phosphonoformic acid; TC: Total cholesterol; FC: Free cholesterol; CE: Cholesterol ester. * $P < 0.05$ vs NC group; $\triangle P < 0.05$ vs HP group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 高磷状态下巨噬细胞内 LDLR、HMGCoAR mRNA 水平增高 高磷处理组巨噬细胞内 HMGCoAR、LDLR mRNA 的表达水平较对照组均升高($P < 0.01$); 而单独 PFA 处理对 HMGCoAR、LDLR mRNA 的表达水平无明显影响。与高磷处理组相比, 高磷环境下 PFA 处理能抑制高磷导致的 HMGCoAR、LDLR mRNA 表达上调($P < 0.01$, 图 3)。

2.4 高磷状态下巨噬细胞内 LDLR、HMGCoAR 及核内 N-SREBP2 蛋白水平增高 蛋白质印迹法检测结果显示, 高磷处理组巨噬细胞内 LDLR、HMGCoAR 的蛋白表达水平较对照组增加($P < 0.05$), 而单独 PFA 处理对巨噬细胞 LDLR、HMGCoAR 蛋白的表达水平无明显影响($P > 0.05$); 高磷下 PFA 处理(高磷联合 PFA 处理组)可抵消高磷导致的上述作用($P < 0.05$)。进一步检测细胞核内 SREBP2 活化片段 N-SREBP2 的蛋白含量, 发现高磷处理增加了 N-SREBP2 的蛋白水平($P < 0.05$), 单独 PFA 处理对 N-SREBP2 的蛋白水平无明显影响, 而高磷下 PFA 处理(高磷联合 PFA 处理组)可抵消高磷导致的上述作用($P < 0.05$)。见图 4。

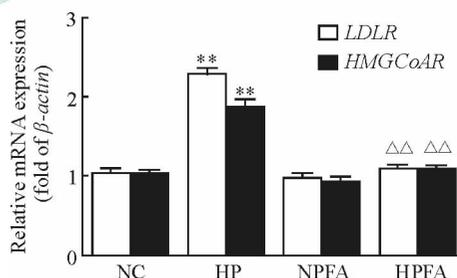


图 3 高磷与 PFA 对巨噬细胞 LDLR 与 HMGCoAR mRNA 表达水平的影响

Fig 3 Effects of high phosphate condition and PFA on the LDLR and HMGCoAR mRNA expressions in macrophage

NC: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; HP: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; NPFA: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; HPFA: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA; Phosphonoformic acid; LDLR: Low density lipoprotein receptor; HMGCoAR: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase. ** $P < 0.01$ vs NC group; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs HP group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

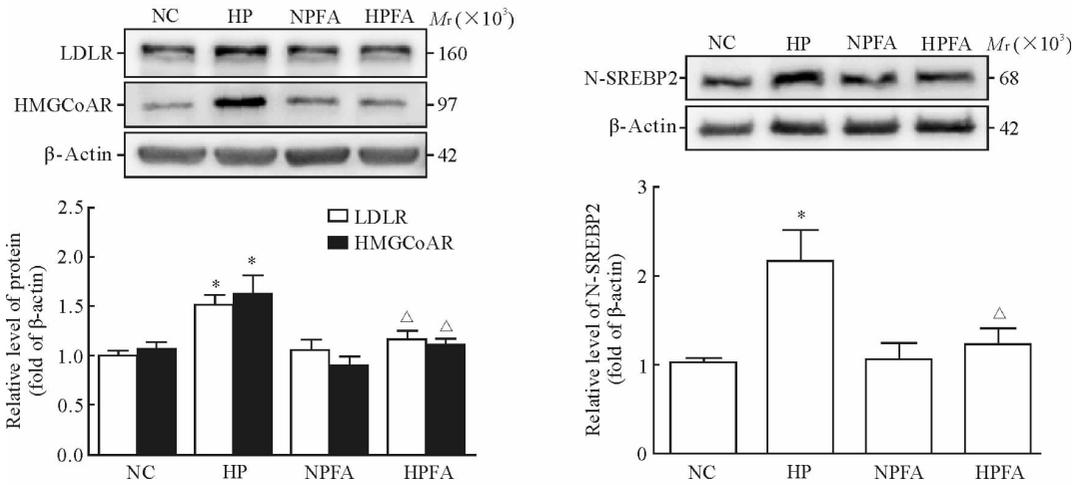


图 4 高磷与 PFA 对巨噬细胞 LDLR、HMGCoAR 及核内 N-SREBP2 蛋白水平的影响

Fig 4 Effects of high phosphate condition and PFA on the protein level of LDLR, HMGCoAR and nuclear N-SREBP2 in macrophage

NC: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; HP: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; NPFA: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; HPFA: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA: Phosphonoformic acid; LDLR: Low-density lipoprotein receptor; HMGCoAR: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase; N-SREBP2: Nuclear sterol regulatory element binding protein 2. * $P < 0.05$ vs NC group; △ $P < 0.05$ vs HP group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 高磷状态下巨噬细胞内 SCAP 向高尔基体的移位增加 激光共聚焦检测结果(图 5)发现,高磷条件下巨噬细胞内 SCAP 的荧光强度增加,且 SCAP 与高

尔基体共定位增多;加入 PFA 处理后,上述变化消失。单独 PFA 处理对巨噬细胞内 SCAP 荧光强度及其与高尔基体共定位的影响均不大。

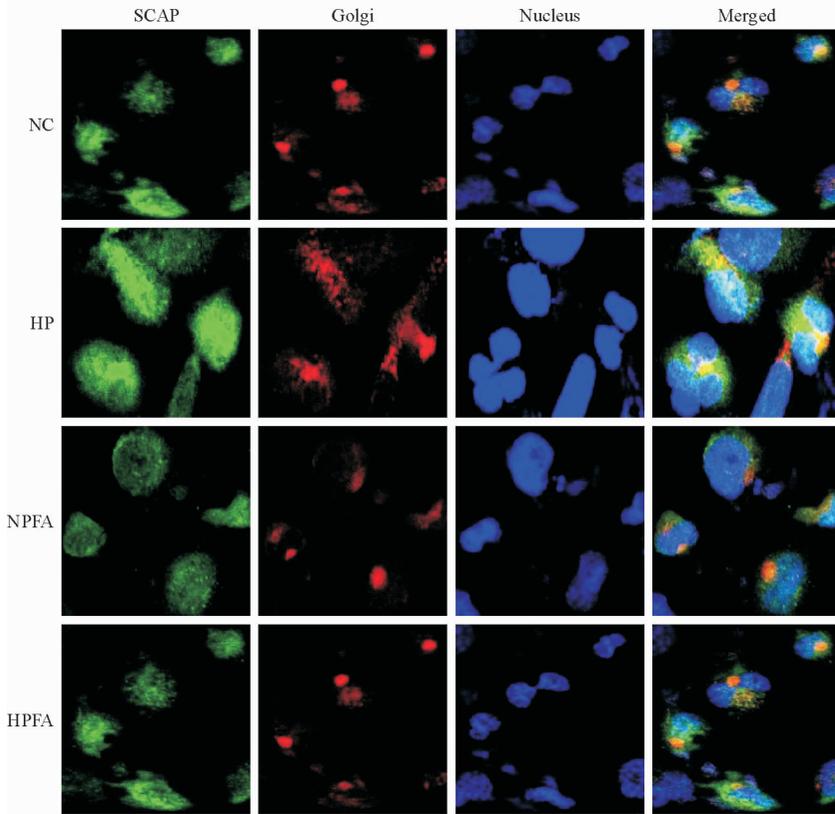


图 5 高磷及 PFA 对巨噬细胞内 SCAP 与高尔基体共定位的影响

Fig 5 Effects of high phosphate condition and PFA on protein translocation of SCAP from endoplasmic reticulum to Golgi in macrophage

NC: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; HP: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; NPFA: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; HPFA: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA: Phosphonoformic acid; SCAP: Sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein. Confocal microscopy. Original magnification: $\times 400$

2.6 高磷处理增高巨噬细胞内 SCAP 的蛋白水平 与对照组相比,高磷处理组巨噬细胞内 SCAP 蛋白水平增高($P < 0.05$);PFA 处理能减弱高磷的上述作用($P < 0.05$),但对正常磷环境下 SCAP 的蛋白水平无影响($P > 0.05$)。SCAP mRNA 的表达水平在各处理组间差异均无统计学意义。见图 6。

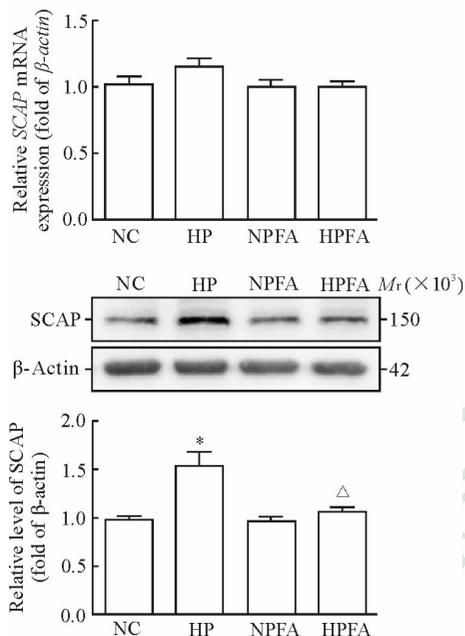


图 6 高磷与 PFA 对巨噬细胞 SCAP mRNA 及蛋白水平的影响

Fig 6 Effects of high phosphate condition and PFA on the mRNA and protein levels of SCAP in macrophage

NC: Normal control group, phosphate 1.0 mmol/L; HP: High phosphate group, phosphate 3.0 mmol/L; NPFA: PFA treatment group, phosphate 1.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L; HPFA: High phosphate plus PFA treatment group, phosphate 3.0 mmol/L+PFA 1.0 mmol/L. PFA: Phosphonoformic acid; SCAP: Sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein. * $P < 0.05$ vs NC group; $\Delta P < 0.05$ vs HP group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

CKD 患者的动脉粥样硬化病变发生早、进展快,又被称为“加速性动脉粥样硬化”,其引起的心血管疾病是 CKD 尤其是终末期肾脏病患者最主要的并发症和死亡原因之一^[1,9],阐明 CKD 患者动脉粥样硬化的分子机制对探索新的防治策略具有重要意义。人体正常血磷范围为 0.8~1.5 mmol/L,CKD 患者由于磷排泄功能异常,磷代谢明显紊乱,高磷血症的发生率高达 70%~80%^[2]。近年来,众多研究表明血磷水平增高是动脉粥样硬化的重要独立危险因素^[4,10-11],但其分子机制目前仍不清楚。

胆固醇在血管壁单核源性巨噬细胞和血管平滑肌细胞内大量异常积聚,促使其形成泡沫细胞是动脉粥样斑块形成的基本病理过程^[12]。越来越多的

临床研究提示,血磷可能具有与胆固醇相似的致动脉粥样硬化作用^[10,13]。本研究利用 THP-1 源性巨噬细胞探讨高磷环境对泡沫细胞形成的影响及分子机制,THP-1 细胞可经 PMA 诱导分化为巨噬细胞,能较快蓄积大量脂质,在动脉粥样硬化泡沫细胞形成及脂质代谢紊乱的研究中广泛应用^[7-8]。鉴于高磷血症患者的血磷浓度多为 1.5~3.0 mmol/L^[14],而 PFA 可有效阻断磷离子通过细胞表面的钠磷转运体 Pit-1 进入细胞内^[15],本研究设置高磷处理(含磷 3.0 mmol/L)及高磷联合 PFA 等干预巨噬细胞,结果发现高磷环境下巨噬细胞内 CE 明显积聚,而 PFA 能有效抑制上述变化且对正常磷环境中的巨噬细胞无明显影响。结果表明高磷血症可能是通过增加细胞内磷离子浓度干扰细胞内胆固醇的稳态平衡,促进 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化。

生理状态下真核细胞内的胆固醇稳态平衡受 SCAP-SREBP2 介导的负反馈调控系统的控制^[5]。SCAP 是一种内质网膜蛋白,其氨基端含有一个固醇敏感区,能感受细胞内胆固醇水平的变化,因此 SCAP 也被认为是一种细胞内的胆固醇敏感器^[5,16]。在细胞内,SCAP 可与 SREBP2 紧密结合形成复合物。当细胞内胆固醇缺乏时,SCAP 的固醇敏感区感受到这一变化,随即发生空间构象改变,作为活性伴侣分子运载 SREBP2 至高尔基体进行酶解,释放其氨基端活性片段 N-SREBP2,后者转位入核并与 HMGCoAR 和 LDLR 基因启动子区的固醇调节元件(sterol regulatory element, SRE)结合,促进 HMGCoAR 与 LDLR 基因转录,上调 HMGCoAR 与 LDLR 的蛋白水平,最终导致细胞内胆固醇水平增加。反之,当细胞内胆固醇充足时,SCAP 处于非活化空间构象,与 SREBP2 形成复合物而将其滞留在内质网上,从而抑制 HMGCoAR 与 LDLR 的蛋白表达,不会导致细胞内胆固醇水平的增加^[17]。在炎症、糖尿病等病理条件下,上述调节机制“失灵”是肝细胞^[18]、血管平滑肌细胞^[8]等多种外周细胞内胆固醇异常积聚的重要病理机制。

本研究采用 qPCR 和蛋白质印迹法检测发现,高磷处理后 THP-1 源性巨噬细胞内 HMGCoAR 和 LDLR mRNA 和蛋白的表达水平均增高,核内 N-SREBP2 的含量也增加,而 PFA 能有效抵消高磷引起的上述变化。结果表明,高磷环境下 THP-1 源性巨噬细胞对 HMGCoAR 和 LDLR 表达的负反馈调控机制可能处于“失灵”状态。研究进一步检测了 SCAP 与高尔基体的共定位以及 SCAP mRNA 与蛋白的表达水平,结果显示高磷环境下 SCAP 的蛋白水平升高,且其与高尔基体共定位显著增加,而 PFA 处理可抵消这一变化,同时高磷或 PFA 单独处理均不影响

SCAP mRNA 的表达,表明细胞内磷浓度增高后,可能通过某种转录后调节机制增加了 SCAP 的蛋白水平,导致 SCAP-SREBP2 由内质网向高尔基体移位增加。目前,异常糖基化修饰是唯一已知的可在转录后水平异常调节 SCAP 功能的机制^[7],且被证实与肿瘤发生、HMC 细胞内脂质积聚有关^[19],但限于糖蛋白富集过程中的糖链丢失、糖蛋白质谱分析技术难度高等条件的制约,目前 SCAP 蛋白异常糖基化修饰与其功能失调的相关研究还处于初步探索阶段。

综上所述,高磷环境下磷通过细胞表面 Pit-1 进入细胞,在转录后阶段增加 SCAP 蛋白水平并诱导其功能失调,从而异常运载 SREBP2 至高尔基体裂解生成过多 N-SREBP2,后者转位入核上调 HMGC_oAR 及 LDLR 的表达,促进巨噬细胞内源性胆固醇的合成和外源性 LDL 经 LDLR 摄取细胞内,最终导致巨噬细胞内胆固醇大量积聚及泡沫化。这可能是 CKD 合并高磷血症患者加速性动脉粥样硬化的发病机制之一。

[参考文献]

- [1] ENE-IORDACHE B, PERICO N, BIKBOV B, CARMINATI S, REMUZZI A, PERNA A, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study[J/OL]. *Lancet Glob Health*, 2016, 4: e307-e319. doi: 10.1016/s2214-109x(16)00071-1.
- [2] LEVIN A, STEVENS P E. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward[J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 49-61.
- [3] CHANG A R, LAZO M, APPEL L J, GUTIERREZ O M, GRAMS M E. High dietary phosphorus intake is associated with all-cause mortality: results from NHANES III[J]. *Am J Clin Nutr*, 2014, 99: 320-327.
- [4] PARK K S, PARK J, CHOI S H, ANN S H, SINGH G B, SHIN E S, et al. Serum phosphorus concentration and coronary artery calcification in subjects without renal dysfunction[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0151007. doi: 10.1371/journal.pone.0151007.
- [5] GOLDSTEIN J L, DEBOSE-BOYD R A, BROWN M S. Protein sensors for membrane sterols[J]. *Cell*, 2006, 124: 35-46.
- [6] MA K L, LIU J, WANG C X, NI J, ZHANG Y, WU Y, et al. Activation of mTOR modulates SREBP-2 to induce foam cell formation through increased retinoblastoma protein phosphorylation[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 100: 450-460.
- [7] ZHOU C, LEI H, CHEN Y, LIU Q, LI L C, MOORHEAD J F, et al. Enhanced SCAP glycosylation by inflammation induces macrophage foam cell formation[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e75650. doi: 10.1371/journal.pone.0075650.
- [8] YE Q, LEI H, FAN Z, ZHENG W, ZHENG S. Difference in LDL receptor feedback regulation in macrophages and vascular smooth muscle cells: foam cell transformation under inflammatory stress[J]. *Inflammation*, 2014, 37: 555-565.
- [9] TANAKA K, WATANABE T, TAKEUCHI A, OHASHI Y, NITTA K, AKIZAWA T, et al. Cardiovascular events and death in Japanese patients with chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2017, 91: 227-234.
- [10] ELLAM T J, CHICO T J. Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220: 310-318.
- [11] TONELLI M, SACKS F, PFEFFER M, GAO Z, CURHAN G, CHOLESTEROL, et al. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease[J]. *Circulation*, 2005, 112: 2627-2633.
- [12] SORCI-THOMAS M G, THOMAS M J. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118: 679-691.
- [13] YAMADA S, TOKUMOTO M, TATSUMOTO N, TANIGUCHI M, NOGUCHI H, NAKANO T, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306: 1418-1428.
- [14] BLOCK G A, KLASSEN P S, LAZARUS J M, OFSTHUN N, LOWRIE E G, CHERTOW G M. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 2208-2218.
- [15] LI X, YANG H Y, GIACHELLI C M. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification[J]. *Circ Res*, 2006, 98: 905-912.
- [16] YE J, DEBOSE-BOYD R A. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: 1-13. doi: 10.1101/cshperspect.a004754.
- [17] SATO R. Sterol metabolism and SREBP activation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 501: 177-181.
- [18] LIU J, MA K L, ZHANG Y, WU Y, HU Z B, LV L L, et al. Activation of mTORC1 disrupted LDL receptor pathway: a potential new mechanism for the progression of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 61: 8-19.
- [19] CHENG C, RU P, GENG F, LIU J, YOO J Y, WU X, et al. Glucose-mediated N-glycosylation of SCAP is essential for SREBP-1 activation and tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28: 569-581.