

SCAMP2与Rab8a在小鼠原代巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇转运中的作用

林良良,潘海强,丁航,马卫列,张志珍* (广东医科大学生物化学与分子生物学教研室,广东东莞523808)

摘要:目的 探讨分泌载体膜蛋白2(SCAMP2)与GTP酶Rab8a在小鼠原代腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇转运中的相互作用。方法 8周龄雄性C57BL/6NJ小鼠提取腹腔巨噬细胞,加入50 mg/L乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)诱导48 h,建立巨噬细胞源性泡沫细胞模型;加入10 mg/L载脂蛋白A-1(apoA-1)12 h诱导泡沫细胞内胆固醇流出,用qRT-PCR、Western blot、免疫荧光检测SCAMP2、Rab8a表达,免疫共沉淀观察SCAMP2、Rab8a蛋白相互作用。结果 泡沫细胞内SCAMP2和Rab8a表达增加,且存在相互作用;apoA-1处理上调泡沫细胞中SCAMP2和Rab8a表达、相互作用及其定位。结论 SCAMP2与Rab8a可能在apoA-1诱导泡沫细胞胆固醇外流过程中起协同促进作用。

关键词:巨噬细胞;泡沫细胞;SCAMP2;Rab8a;载脂蛋白A-1

中图分类号:R 54

文献标志码:A

文章编号:2096-3610(2022)02-0132-05

Role of SCAMP2 and Rab8a in cholesterol transport of primary mouse macrophage-derived foam cells

LIN Liang-liang, PAN Hai-qiang, DING Hang, MA Wei-lie, ZHANG Zhi-zhen* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between secretory carrier membrane protein 2 (SCAMP2) and GTPase Rab8a in cholesterol transport of primary mouse peritoneal macrophage-derived foam cells. Methods The peritoneal macrophages were isolated from 8-week-old male C57BL/6NJ mice and incubated with 50 mg/L acetylated low-density lipoprotein (acLDL) for 48 h to induce foam cells. The cholesterol efflux of foam cells was induced by treatment with 10 mg/L apolipoprotein A-1 (apo A-1) for 12 h. Expression of SCAMP2 and Rab8a and their interaction were determined by qRT-PCR, Western blot, immunofluorescence and co-immunoprecipitation. Results Overexpression and interaction of SCAMP2 and Rab8a were found, and apoA-1 treatment upregulated their expression, interaction, and colocalization in foam cells. Conclusion Both SCAMP2 and Rab8a could play a synergistic role in promoting cholesterol efflux from foam cells induced by apoA-1.

Key words: macrophage; foam cell; SCAMP2; Rab8a; apolipoprotein A-1

动脉粥样硬化是心血管疾病的病理基础,其早期特征以巨噬细胞脂质代谢功能障碍导致的泡沫细胞形成为主要标志,是引发心血管疾病发生和患者死亡的主要原因^[1]。载脂蛋白A-1(apoA-1)是高密度脂蛋白的重要结构蛋白组分,在机体脂质代谢过程中具有介导泡沫细胞胆固醇外流、维持机体胆固醇稳态、抗

动脉粥样硬化的作用^[2]。研究表明,apoA-1能介导泡沫细胞内累积的胆固醇以囊泡形式胞吐至细胞外,有多种蛋白质参与该胆固醇囊泡转运过程^[3]。分泌载体膜蛋白2(SCAMP2)是一种进化上保守的含有4个跨膜区的膜整合蛋白,主要在胞内分泌囊泡及质膜上表达,以复合物形式参与胞吐/胞吐过程,在调节囊泡转运及细胞分泌过程中发挥关键作用^[4]。Ras相关蛋白(Ras-related protein)Rab8a是参与细胞膜转运和囊泡运输的调控因子^[5]。在巨噬细胞中,Rab8a参与控制细胞表面蛋白的转运和循环,如基质金属蛋白酶、腺苷三磷酸结合盒转运体A1等^[6]。然而,SCAMP2和Rab8a是否参与apoA-1介导的泡沫细胞内胆固醇囊泡转运以及它们是否具有相互作用,目前尚不清楚。

收稿日期:2022-01-07

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金自然科学基金(2020A1515 010224)

作者简介:林良良(1991—),女,在读研究生,E-mail:774889947@qq.com

通信作者:张志珍(1967—),女,博士,教授,E-mail:zzzhang@gdmu.edu.cn

我们前期从Jackson实验室引进SCAMP2基因敲除的杂合子小鼠,并成功繁殖获得同一品系的野生型C57BL/6NJ小鼠^[7]。本实验将提取野生型小鼠腹腔巨噬细胞,建立泡沫细胞模型,分析SCAMP2和Rab8a的表达情况及二者之间的相互作用。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器 荧光定量PCR仪(德国Roche公司);电泳及电转移装置(美国Bio-Rad公司);5417R高速台式离心机(德国Eppendorf公司);C400成像系统(美国Azure Biosystems公司);SYNERGY H1酶标仪(美国Biotek公司);TCS SP8共聚焦荧光显微镜(德国Zeiss公司)。

1.1.2 实验动物与材料 野生雄性C57BL/6NJ小鼠(种鼠C57BL品系的C57BL/6NJ-Scamp2^{em1J}小鼠购自美国Jackson实验室,库存号:028970)按照SPF级动物饲养标准于广东医科大学实验动物中心进行饲养繁殖。RPMI 1640培养基购自Invitrogen公司;胎牛血清购自Gibco公司;乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)购自安徽经科生物技术有限公司;apoA-1和Protein A/G磁珠购自Sigma公司;细胞总RNA抽提试剂Trizol购自Thermo Fisher公司;逆转录和定量PCR试剂盒购自Takala公司;羊抗兔SCAMP2多克隆抗体、羊抗鼠Rab8a单克隆抗体和β-tubulin抗体购自Proteintech公司;二抗及荧光二抗购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养 雄性8周龄SPF级C57BL/6NJ小鼠禁食过夜后,颈椎脱臼法处死,腹腔注射5 mL预冷的RPMI 1640培养基,按摩腹壁5 min后收集腹腔内富集的巨噬细胞。1 500 r/min离心8 min,弃上清,用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI 1640培养基重悬细胞,接种于6孔板(1.2×10⁶个细胞/孔),在37℃、5% CO₂培养箱中培养6 h,用RPMI 1640空白培养基轻轻冲洗2~3次,去除未贴壁细胞,培养板上的贴壁细胞即为实验所用的原代巨噬细胞。

1.2.2 建立泡沫细胞模型 提取的腹腔巨噬细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养12 h后,用空白培养基洗2次,加入含有50 mg/L乙酰化低密度脂蛋白(acLDL)0.2% BSA的RPMI 1640培养基孵育48 h,诱导巨噬细胞转变为泡沫细胞。

1.2.3 apoA-1处理与实验分组 巨噬细胞源性泡沫

细胞用空白培养基洗2次,用含0.2% BSA的RPMI 1640培养基平衡12 h,加入10 mg/L的apoA-1作用12 h。实验中未做任何处理的原代巨噬细胞作为对照组;加入acLDL诱导48 h转变的泡沫细胞即为acLDL组;加入apoA-1处理12 h的泡沫细胞即为apoA-1组。

1.2.4 qRT-PCR实验 上述不同处理组细胞分别用核酸提取试剂Trizol提取细胞总RNA,6孔板每孔加入1 mL Trizol进行裂解。使用Takala逆转录试剂盒,将提取的RNA逆转录为cDNA,随后用Takala试剂盒进行qPCR分析。PCR扩增程序为:95℃、30 s;95℃、5 s,60℃、30 s,循环40次;95℃、10 s、65℃、60 s、97℃、1 s。以GAPDH为内参,计算SCAMP2和Rab8a mRNA相对表达量。SCAMP2、Rab8a、GAPDH引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成,序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

名称	序列(5'→3')
SCAMP2-F	GCGACAACAGTTCTCCGCCACAC
SCAMP2-R	TCCTCCTAGTAGCGTCTGCCTCTC
Rab8a-F	AGACCAGTGCAAAGGCCAACATC
Rab8a-R	GCTGCTCCACTGTGATCTTGACTC
GAPDH-F	CACTACCGTACCTGACACCA
GAPDH-R	ATGTCGTTGTCCCACCACCT

1.2.5 Western blot实验 提取的腹腔巨噬细胞铺入6孔板(1.2×10⁶个细胞/孔),用50 mg/L acLDL处理48 h,再用10 mg/L apoA-1作用12 h,对照组不做任何处理。提取不同处理组细胞总蛋白,BCA法测定蛋白含量。用10%SDS-PAGE凝胶将等量的蛋白稀释样品进行电泳分离;电泳结束后,将凝胶中的蛋白质在4℃、110 V恒压下转移90 min至PVDF膜;5%脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入SCAMP2、Rab8a、β-tubulin一抗(1:1 000稀释),4℃孵育过夜;用1×TBST洗膜3次,每次10 min,加入相应的二抗(1:2 000稀释),室温孵育1 h;用1×TBST洗膜3次,每次10 min;采用Azure Biosystems C400成像系统进行曝光显影。

1.2.6 免疫共沉淀(Co-IP)实验 提取腹腔巨噬细胞铺入10 cm培养皿(7×10⁶个细胞),经acLDL和apoA-1处理后,加入500 μL预冷的含PMSF的RIPA(弱)蛋白裂解缓冲液,冰上裂解细胞30 min;收集细胞,12 000 r/min、4℃离心5 min,收集上清液。每组细胞的裂解产物取50 μL作为阳性对照(input组),剩余裂解产物平均分成2份,分别加入2 μg的免疫球蛋白作

为阴性对照(IgG组)和相应 SCAMP2、Rab8a、 β -tubulin 抗体(IP组),置于4℃冰箱交联。交联过夜后加入30 μ L protein A/G磁珠,常温交联2 h,再次拉下免疫复合物,用裂解缓冲液洗涤。每个样品加入30 μ L的2×SDS缓冲液,蛋白变性后进行Western blot分析。

1.2.7 免疫荧光(IF)实验 提取的腹腔巨噬细胞铺24孔板进行细胞爬片(1.5×10^5 个细胞/孔)。不同处理组的细胞用4%多聚甲醛室温固定20 min;1×PBS漂洗3次,每次5 min,加入含5%BSA的PBS缓冲液进行封闭,摇床1 h;加入SCAMP2抗体、Rab8a抗体(1:200稀释),4℃孵育过夜;1×PBS漂洗3次,每次时间5 min,加入荧光二抗(1:1 000稀释)室温孵育1 h;加DAPI染液200 μ L,室温避光1 min,洗板3次后封片,使用TCS SP8共聚焦荧光显微镜观察SCAMP2和Rab8a的定位和表达情况。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.02软件进行统计学分析,数据以均数±标准差表示,采用单因素方差分析及

LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

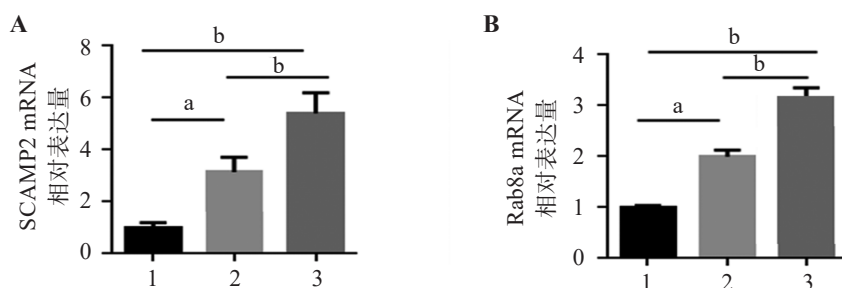
2 结果

2.1 SCAMP2和Rab8基因表达分析

与对照组相比,acLDL诱导的泡沫细胞内SCAMP2 mRNA表达增强($P < 0.01$);与acLDL组相比,apoA-1处理的泡沫细胞内SCAMP2 mRNA表达进一步升高($P < 0.01$),见图1A。用apoA-1处理泡沫细胞后Rab8a mRNA表达水平升高,与对照组和acLDL组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图1B。

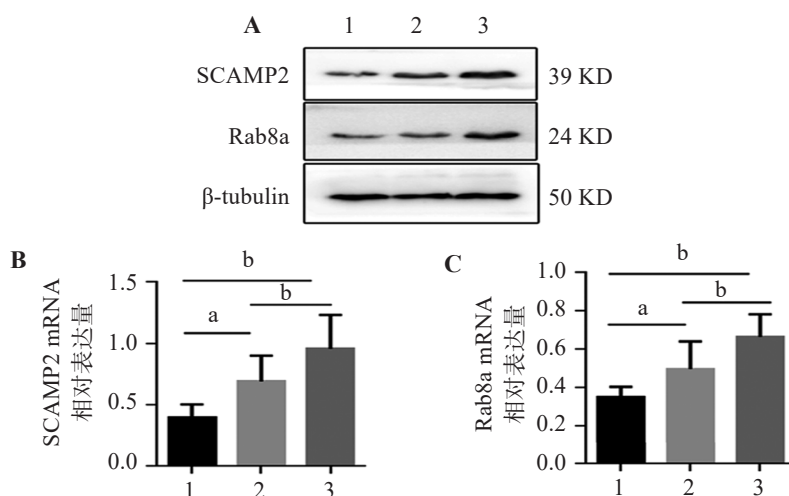
2.2 SCAMP2和Rab8a的蛋白表达分析

Western blot分析显示,apoA-1处理的泡沫细胞组SCAMP2和Rab8a的蛋白表达,与对照组和acLDL组相比均明显增强,结果见图2A。与acLDL组相比,apoA-1处理组SCAMP2蛋白表达升高了38.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2B;与acLDL组相比,apoA-1处理组Rab8a蛋白表达升高了30.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图2C。



A. SCAMP2基因mRNA的相对表达量; B. Rab8a基因mRNA的相对表达量; 1.对照组; 2.acLDL组; 3.apoA-1组; acLDL组与对照组比较: $^aP < 0.01$; apoA-1组与对照组、acLDL组比较: $^bP < 0.01$

图1 qRT-PCR检测巨噬细胞内SCAMP2和Rab8a mRNA的表达水平



A. Western blot分析不同处理组SCAMP2和Rab8a蛋白表达量; B.灰度扫描分析SCAMP2蛋白相对表达量; C.灰度扫描分析Rab8a蛋白相对表达量; 1.对照组; 2.acLDL组; 3.apoA-1组; acLDL组与对照组比较: $^aP < 0.05$; apoA-1组与对照组、acLDL组比较: $^bP < 0.05$

图2 巨噬细胞内SCAMP2和Rab8a的蛋白表达分析

2.3 SCAMP2与Rab8a在巨噬细胞内的相互作用

免疫共沉淀结果表明,内参β-tubulin在两种抗体处理的不同组细胞中表达量基本一致(图3A)。与对照组相比,acLDL诱导的泡沫细胞内SCAMP2蛋白与Rab8a蛋白形成复合物,而加入apoA-1介导泡沫细胞胆固醇外流过程中,SCAMP2蛋白与Rab8a蛋白的相互作用增强,见图3B的IP组。

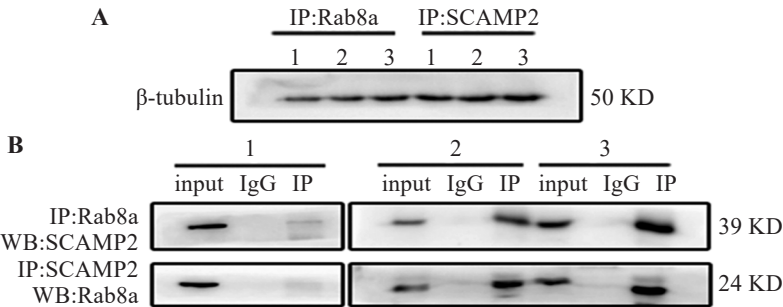
2.4 SCAMP2与Rab8a在巨噬细胞内的共定位

对不同处理组的巨噬细胞进行免疫荧光染色,结果见图4。相比于对照巨噬细胞,泡沫细胞内SCAMP2(绿色荧光)和Rab8a(红色荧光)表达均增强。当用apoA-1处理泡沫细胞介导胆固醇外流时,SCAMP2和Rab8a的荧光强度进一步增加,而且两种蛋白在细胞膜上聚集,二者在细胞质膜处的共定位(黄色荧光)表达增强。

3 讨论

分泌载体膜蛋白(SCAMPs)是高尔基体及后高

尔基体循环转运中的一类载体蛋白,调控细胞内运输和信号转导。SCAMPs家族有5个成员,即SCAMP1~5,参与细胞内囊泡的运输及细胞内物质到细胞膜表面的转运,能加速细胞膜重构,影响胞吞和胞吐融合孔的形成、稳定及扩张^[8]。SCAMP2作为分泌囊泡的标记物,早期研究发现在哺乳动物细胞中能够与磷脂酸肌醇4,5-二磷酸(PIP₂)相互作用,调节囊泡的胞吐过程^[9]。最近研究发现,SCAMP2通过其疏水性肽段CWYRPIYKAFR与PIP₂之间发生静电相互作用,可抑制胞外分泌^[10]。但SCAMP2是否参与apoA-1介导的泡沫细胞内胆固醇囊泡转运目前报道较少。为此,我们首先提取小鼠腹腔巨噬细胞,贴壁培养后加入acLDL,诱导形成巨噬细胞源性泡沫细胞。在此基础上,用apoA-1进行处理介导泡沫细胞胆固醇外流,分析SCAMP2在细胞内的表达改变。研究发现,acLDL诱导形成的泡沫细胞内SCAMP2的mRNA和蛋白水平均升高,提示SCAMP2参与了apoA-1介导的泡沫细胞胆固醇转运过程。



A. Western blot 分析不同处理组细胞裂解液中内参β-tubulin的表达; B. 分别用Rab8a抗体和SCAMP2抗体在细胞裂解液中沉淀SCAMP2和Rab8a蛋白,沉淀复合物采用Western blot方法进行检测; 1.对照组; 2. acLDL组; 3. apoA-1组

图3 SCAMP2与Rab8a在巨噬细胞内的相互作用分析

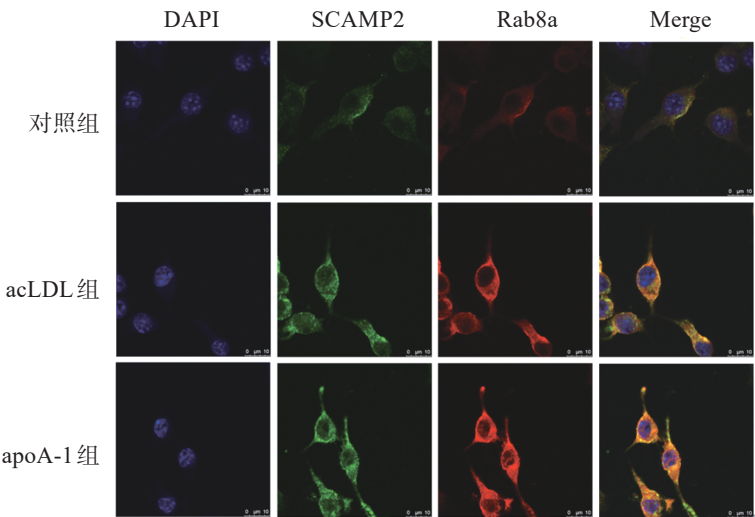


图4 SCAMP2和Rab8a在巨噬细胞内的定位观察

Ras 相关蛋白(Rab)是属于GTP酶超家族的一类单分子蛋白质,大约有70种,在细胞内囊泡运输过程中发挥重要作用^[1]。Rab GTP酶充当分子开关,由鸟嘌呤核苷酸交换因子激活后,与GDP结合的无活性Rab转变为有活性的GTP-Rab结合形式,并募集特异的效应蛋白,进而调控囊泡的形成、融合及与质膜锚定^[12]。小GTP酶Rab8在膜转运中起着重要作用,在分泌途径中,Rab8调节细胞囊泡从反面高尔基体到质膜的运输,调节囊泡与质膜的融合,控制胞吐活性^[13]。Rab8包括Rab8a和Rab8b两种亚型^[6],能调控细胞膜转运和囊泡运输过程。有研究发现Rab8a介导的胞内脂滴增大可能在帕金森发病机制中起重要作用^[14],并且Rab8a的72位磷酸化在脂滴融合和增大中发挥作用^[15]。然而,Rab8a在巨噬泡沫细胞内胆固醇囊泡运输中的作用目前研究较少。我们的实验发现,Rab8a mRNA和蛋白水平在acLDL诱导形成的泡沫细胞内升高,当用apoA-1处理后,泡沫细胞内Rab8a mRNA和蛋白水平进一步升高,提示Rab8a参与了apoA-1介导的泡沫细胞胆固醇囊泡转运过程。

为了分析SCAMP2蛋白与Rab8a蛋白在巨噬细胞内是否具有相互作用,我们分别用Rab8a抗体和SCAMP2抗体在巨噬细胞、泡沫细胞和apoA-1处理的泡沫细胞的蛋白裂解液中富集蛋白复合物,分析显示acLDL诱导的泡沫细胞内SCAMP2蛋白与Rab8a蛋白形成复合物,提示二者存在相互作用。当用apoA-1处理泡沫细胞后,SCAMP2与Rab8a的相互作用增强,说明两种蛋白以复合物形式参与了胆固醇的转运过程。为了进一步验证这一结果,我们采用免疫荧光实验分析SCAMP2蛋白和Rab8a蛋白在细胞内的表达及定位情况。与免疫共沉淀结果一致,通过激光共聚焦显微镜观察到acLDL诱导的泡沫细胞内SCAMP2的绿色荧光和Rab8a的红色荧光增强,而且二者相互作用形成复合物,出现叠加的黄色荧光。apoA-1处理泡沫细胞后,绿色荧光和红色荧光进一步增强,并且在细胞质膜处出现了更强的黄色荧光,说明两种蛋白在细胞膜上的共定位。本实验结果证实了SCAMP2与Rab8a在巨噬细胞源性泡沫细胞中具有相互作用,二者以复合物形式参与apoA-1介导的泡沫细胞内胆固醇囊泡转运,但两种蛋白之间是否具有直接相互作用及其作用的机制需进一步研究。

参考文献:

- [1] UNKART J T, ALLISON M A, ARANETA M R G, et al. Burden of peripheral artery disease on mortality and incident cardiovascular events[J]. *Am J Epidemiol*, 2020, 189(9):951-962.
- [2] AN T, ZHANG X, LI H, et al. GPR120 facilitates cholesterol efflux in macrophages through activation of AMPK signaling pathway[J]. *Febs J*, 2020, 287(23):5080-5095.
- [3] MA W, LIN M, DING H, et al. b-COP as a component of transport vesicles for HDL apolipoprotein-mediated cholesterol exocytosis[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(3):e0151767.
- [4] YUE C, XIE S, ZHONG J, et al. SCAMP2/5 as diagnostic and prognostic markers for acute myeloid leukemia[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):17012.
- [5] STYPULKOWSKI E, FENG Q, JOSEPH I, et al. Rab8 attenuates Wnt signaling and is required for mesenchymal differentiation into adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2021, 296:100488.
- [6] TONG S J, WALL A A, HUNG Y, et al. Guanine nucleotide exchange factors activate Rab8a for Toll-like receptor signalling[J]. *Small GTPases*, 2021, 12(1):27-43.
- [7] 梁钰敏, 张飞龙, 丁航, 等. SCAMP2基因敲除小鼠子代基因型的鉴定与繁殖[J]. *广东医科大学学报*, 2017, 35(6):610-613.
- [8] LAW A H, CHOW C M, JIANG L. Secretory carrier membrane proteins[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(2):269-283.
- [9] LIAO H, ELLENA J, LIU L, et al. Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(38):10909-10920.
- [10] MAO F, DUAN H, ALLAMYRADOV A, et al. Expression and prognostic analyses of SCAMPs in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(3):4096-4114.
- [11] ZHU S, BHAT S, SYAN S, et al. Rab11a-Rab8a cascade regulates the formation of tunneling nanotubes through vesicle recycling[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(19):jcs215889.
- [12] VIEWEG S, MULHOLLAND K, BRÄUNING B, et al. PINK1-dependent phosphorylation of Serine111 within the SF3 motif of Rab GTPases impairs effector interactions and LRRK2-mediated phosphorylation at Threonine72[J]. *Biochem J*, 2020, 477(9):1651-1668.
- [13] URRUTIA P J, BODALEO F, BÓRQUEZ DA, et al. Tuba activates Cdc42 during neuronal polarization downstream of the small GTPase Rab8a[J]. *J Neurosci*, 2021, 41(8):1636-1649.
- [14] WASCHBÜSCH D, PURLYTE E, KHAN A R. Dual arginine recognition of LRRK2 phosphorylated Rab GTPases[J]. *Biophys J*, 2021, 120(9):1846-1855.
- [15] YU M, ARSHAD M, WANG W, et al. LRRK2 mediated Rab8a phosphorylation promotes lipid storage[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1):34.