

# Ox-LDL 对 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞自噬的影响

白洁<sup>1</sup>,孟军<sup>1</sup>,刘艳辉<sup>2</sup>,李小红<sup>2</sup>,危当恒<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属第一医院功能科;2. 南华大学心血管疾病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室,湖南衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 探讨氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)对 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞自噬的影响。 **方法** PMA 诱导 THP-1 细胞 24 h,使其分化为巨噬细胞,再分别用 0、10、20、40 或 80 mg/L 的 Ox-LDL 处理 24 h,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹技术(Western blotting)分别检测 Beclin-1 以及 LC3 的 mRNA 及蛋白表达;细胞免疫荧光检测 LC3 在细胞内的含量;MDC 染色检测自噬囊泡的形成。 **结果** 随着 Ox-LDL 浓度的增加,THP-1 源性巨噬细胞 Beclin-1 mRNA 及蛋白表达显著降低( $P < 0.05$ );LC3 mRNA 表达无明显改变( $P > 0.05$ ),但蛋白水平 LC3II/LC3I 显著降低( $P < 0.001$ );免疫荧光结果表明随着 Ox-LDL 浓度的增加,LC3II 含量降低,MDC 染色结果显示自噬囊泡随着 Ox-LDL 浓度的增加而减少。 **结论** Ox-LDL 抑制 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞自噬。

**关键词:** Ox-LDL; THP-1 巨噬细胞; 自噬

中图分类号:R543.5 文献标识码:A

## The Effect of Ox-LDL on Autophagy in PMA Induced THP-1-derived Macrophages

BAI Jie, MENG Jun, LIU Yanhui, et al

(Department of Function, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL) on autophagy in THP-1-derived macrophages induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). **Methods** After treatment with PMA for 24 h, THP-1-derived macrophages were treated with 0, 10, 20, 40 or 80 mg/L Ox-LDL for 24 h. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect Beclin 1 and LC3 mRNA and protein expression. Cell immunofluorescence was used to detect intracellular LC3II protein concentration. The autofluorescent substance monodansylcadaverine (MDC) was used to detect autophagic vacuoles (AVs). **Results** After treated with 0, 10, 20, 40 or 80 mg/L Ox-LDL for 24 h, Beclin-1 mRNA and protein expression were obviously decreased ( $P < 0.05$ ). There was no obvious change in LC3 mRNA expression ( $P > 0.05$ ). However, the ratio of LC3II/LC3I was decreased with a concentration dependent manner at the level of protein ( $P < 0.001$ ). Cell immunofluorescence showed that the intracellular LC3II concentration was decreased in response to Ox-LDL concentration. MDC staining showed that AVs had negative correlation with Ox-LDL concentration. **Conclusion** Ox-LDL inhibited PMA induced-THP-1 macrophage autophagy.

**Key words:** oxidized low density lipoprotein; THP-1 macrophage; autophagy

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是主要发生于

大、中型血管的血管病变,是环境因素与遗传因素相互作用所致的慢性炎症性过程,其主要特征为血管内皮功能紊乱、内膜下脂质沉积、平滑肌细胞及单核细胞的迁移以及泡沫细胞的形成,累及全身各个重要器官<sup>[1]</sup>。

氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)是 As 的独立危险因素,能引起血管内

收稿日期:2014-01-02

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81370378)。

作者简介:白洁,主治医师,E-mail:381104519@qq.com,通讯作者危当恒,博士,教授,研究方向:动脉粥样硬化的发病机制及其防治,E-mail:weizhonghua99@126.com。

皮细胞损伤及血管功能障碍,增大血管内皮的间隙和通透性,导致致As性脂质和炎症细胞内皮下蓄积,诱导As的形成和发展<sup>[2]</sup>。此外,受损的血管内皮细胞分泌细胞因子及炎症因子,诱导循环血液中的单核细胞粘附于内皮表面,在趋化因子作用下,跨内膜迁移,然后转化为巨噬细胞<sup>[3]</sup>。巨噬细胞通过特异受体介导的胞吞作用蓄积脂质,转变为泡沫细胞,形成As的早期病变。近年来的研究发现,As斑块中存在巨噬细胞自噬<sup>[4]</sup>。自噬是通过溶酶体系统降解长半衰期蛋白和细胞器的代谢通路,能被饥饿、细胞分化及正常生长的调节所诱导,维持细胞内结构、代谢和功能平衡<sup>[5]</sup>。本文观察了Ox-LDL对佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)诱导的THP-1巨噬细胞自噬的影响,以期为As的防治提供新的思路和策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人源性THP-1细胞购于中科院上海生物所细胞中心,1640细胞培养基购于Hyclone公司,Ox-LDL购自广州奕源生物公司,PMA购自碧云天公司,PCR引物合成于上海生工生物工程有限公司, $\beta$ -actin Mouse Monoclonal Antibody购自康为世纪公司,MAP LC3 Monoclonal Antibody购自Santa Cruz公司,Beclin-1 PolyClonal Antibody购自Datasheet公司。

### 1.2 细胞培养

THP-1细胞采用1640培养基,于37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,取对数期细胞进行实验。160 nmol/L的PMA预处理细胞24 h,诱导分化为THP-1巨噬细胞,更换培养基,不同浓度Ox-LDL(0、10、20、40、80 mg/L)孵育24 h。

### 1.3 逆转录聚合酶链反应

提取细胞总RNA,取1  $\mu$ L总RNA逆转录为cDNA,再取1  $\mu$ L cDNA进行PCR扩增,引物序列及反应条件如下:GAPDH: Forward Sequence 5'-CAAGGT-CATCCATGACAACCTTTG-3', Reverse Sequence 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'; PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 26个循环; 72℃延伸5 min, 预计扩增产物长度为496 bp。Beclin-1: Forward Sequence 5'-GGATGGATGTGGAGAAAGGCAAG-3', Reverse Sequence 5'-TGAGGACACCCAAGCAAGACC-3'; PCR

反应条件: 94℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 61℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 32个循环; 72℃延伸2 min, 预计扩增产物长度为152 bp。LC3: Forward Sequence 5'-GAGTTACCTCCCGACGCCGCA-3', Reverse Sequence 5'-TCCGCCGCTGCTTGAAGGC-3'; PCR反应条件: 94℃预变性2 min; 94℃变性30 s, 61℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 32个循环; 72℃延伸2 min, 预计扩增产物长度为181 bp。

### 1.4 Western blotting 分析

提取总蛋白,采用SDS-PAGE分离总蛋白,转移至PVDF膜,5%的脱脂牛奶室温封闭2 h。一抗于4℃孵育过夜;TBST洗15 min  $\times$  3次。相应的二抗孵育2 h, TBST洗三次,每次15 min。显影,拍照保存。Quanta One软件分析各待测蛋白条带及其对应的 $\beta$ -actin灰度值。

### 1.5 细胞免疫荧光

取对数期生长的细胞,细胞计数,  $5 \times 10^5$ 个细胞接种于24孔板,培养24 h,不同浓度Ox-LDL(0、10、20、40或80 mg/L)孵育24 h,每个浓度3个复孔。弃掉培养液,用PBS冲洗,4%多聚甲醛固定30 min,晾干;PBS漂洗3次,每次5 min;用0.5% Triton 孵育30 min, PBS漂洗2次,每次5 min; 10%的胎牛血清封闭1 h, LC3一抗4℃孵育过夜; PBS洗3次,每次5 min; 相应的CY3荧光素标记的二抗37℃孵育2 h, PBS漂洗4次,每次5 min; 5  $\mu$ g/mL DAPI染色液染色2 min, PBS洗2次,每次5 min; 抗猝灭封片剂封片,荧光显微镜下拍照保存。

### 1.6 单丹酰戊二胺(MDC)染色

不同浓度(0、10、20、40或80 mg/L)Ox-LDL孵育24 h,每个浓度3个复孔。弃掉培养液,避光状态下每孔加入500  $\mu$ L含MDC的无血清1640培养基,37℃孵育2 h,弃培养液,加入20  $\mu$ L抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜下拍照保存。

### 1.7 统计学处理

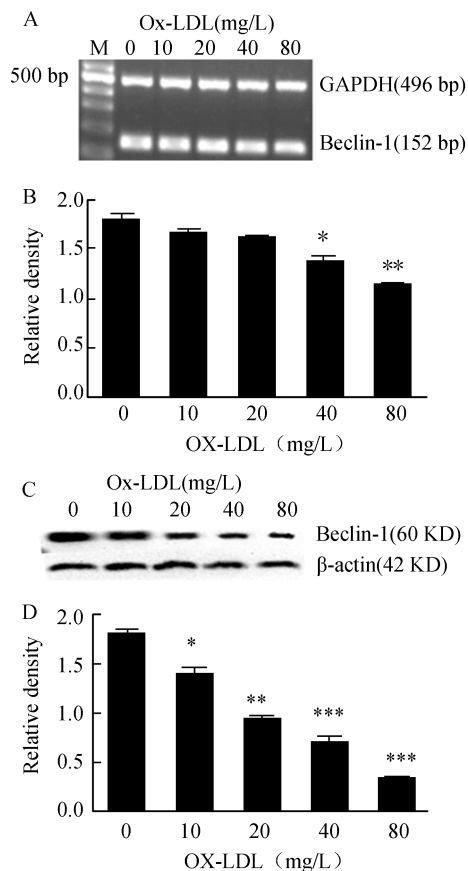
所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示,用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析,组间差异采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 Ox-LDL下调PMA诱导的THP-1巨噬细胞Beclin-1表达

160 nmol/L佛波酯诱导THP-1细胞24 h,使其

贴壁并分化为巨噬细胞,用含有 0、10、20、40 或 80 mg/L Ox-LDL 的培养液继续培养细胞 24 h,RT-PCR 和 Western blotting 分别检测 THP-1 巨噬细胞自噬标记物 Beclin-1 mRNA 和蛋白水平的表达。结果表明:40 mg/L 和 80 mg/L Ox-LDL 处理组 Beclin-1 mRNA 表达明显降低(图 1 A 和 B),而其蛋白水平随 Ox-LDL 浓度增加而降低,呈浓度依赖性(图 1 C 和 D)。

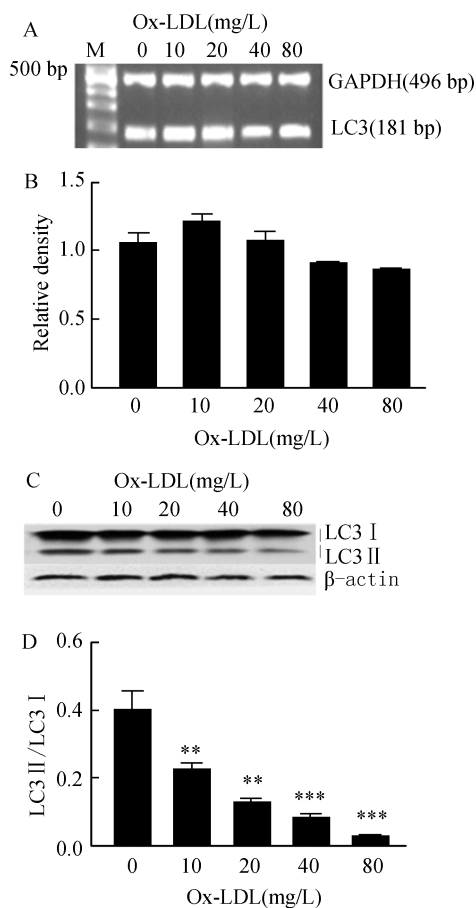


**图 1 Ox-LDL 下调 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞 Beclin-1 mRNA 和蛋白表达** A:Beclin-1 PCR 结果;B:Beclin-1 PCR 结果的统计图;C:Beclin-1 Western blotting 结果;D:Beclin-1 Western blotting 结果的统计图。M 代表 Marker,与对照组相比,\* : $P < 0.05$ ,\*\* : $P < 0.01$ ,\*\*\* : $P < 0.001$ , $n = 4$

### 2.2 Ox-LDL 下调 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞 LC3 表达

Ox-LDL 孵育 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞,与 0 mg/L 相比,10、20、40、80 mg/L Ox-LDL 处理组 LC3 的 mRNA 水平没有明显改变( $P > 0.05$ ,图 2 A 和 B);在蛋白表达水平,随着 Ox-LDL 浓度的增加 LC3 II / LC3 I 呈浓度依赖性降低( $P < 0.01$ ,图 2 C

和 D)。细胞免疫荧光显示随着 Ox-LDL 浓度的增加,LC3 II 含量明显降低(图 3)。



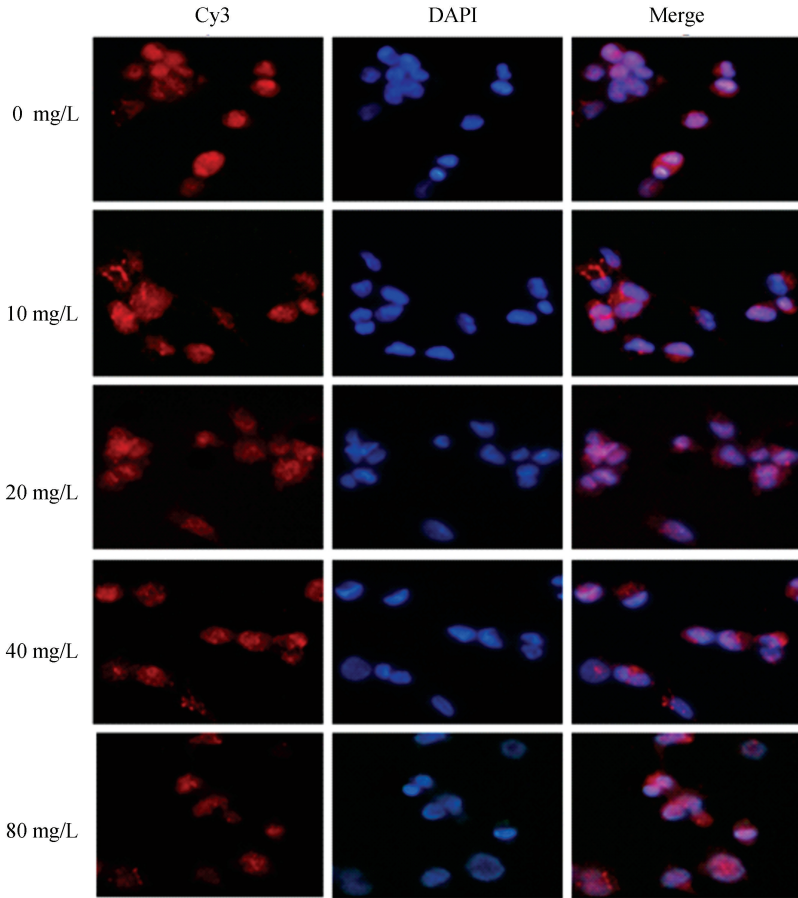
**图 2 Ox-LDL 抑制 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞 LC3 表达** A:LC3 PCR 结果;B:LC3 PCR 结果的统计图;C:LC3 Western blotting 结果;D:LC3 II / LC3 I 统计图 M 代表 Marker,与对照组相比,\*\* : $P < 0.01$ ,\*\*\* : $P < 0.001$ , $n = 4$

### 2.3 Ox-LDL 下调 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞自噬泡的形成

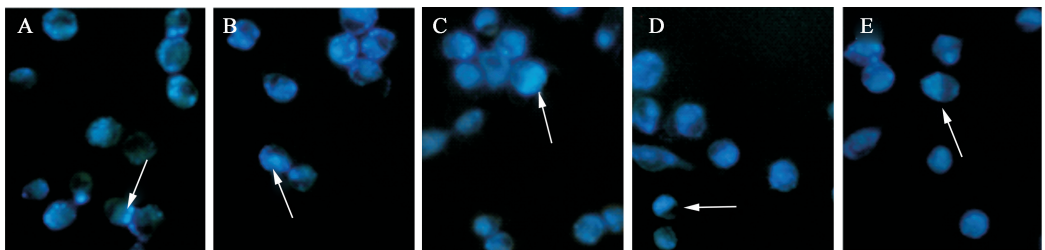
MDC 染色是检测自噬发生过程中自噬体形成的有效方法。MDC 染色显示,随着 Ox-LDL 浓度的增加,自噬泡的形成减少(图 4 A、B、C、D 和 E)。

## 3 讨论

研究表明,Ox-LDL 损伤血管内皮,致使其分泌细胞粘附分子和化学趋化分子<sup>[6]</sup>,使血液中的单核细胞结合于受损的血管内皮细胞,并跨内膜迁移,转化为巨噬细胞,吞噬并蓄积脂质,转变为泡沫细胞,形成 As 的早期病变。近期研究证明巨噬细胞自噬



**图3 Ox-LDL 降低 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞内 LC3II 含量** 不同浓度的 Ox-LDL 处理 THP-1 巨噬细胞 24 h, 细胞免疫荧光检测巨噬细胞内 LC3II 含量, 红色为 Cy3 荧光素标记的 LC3, 蓝色为 DAPI 标记的细胞核, 从图中可以看出, 随着 Ox-LDL 浓度的增加, PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞内 LC3II 含量降低



**图4 Ox-LDL 抑制 THP-1 巨噬细胞自噬囊泡的形成** A: 0 mg/L Ox-LDL 处理组; B: 10 mg/L Ox-LDL 处理组; C: 20 mg/L Ox-LDL 处理组; D: 40 mg/L Ox-LDL 处理组; E: 80 mg/L Ox-LDL 处理组

(macrophage autophagy, AP) 发生于 As 的发生发展过程<sup>[7]</sup>。自噬是细胞通过单层或双层膜内吞待降解物形成自噬体, 然后运输到溶酶体形成自噬溶酶体并进行降解, 实现细胞内大分子物质及某些细胞器的代谢更新以及细胞稳态的维持<sup>[8]</sup>。

Beclin 1 是酵母 ATG6/Vps30 的同源基因, 是一种肿瘤抑制基因, 位于人染色体 17q21 上。Beclin-1 通过 BH3 (Bcl-2 homolog 3)、卷曲螺旋结构域

(coiled-coil domain/CCD)、进化保守结构域 (evolutionarily conserved domain/ECD) 和核输出结构域参与自噬的诱导、自噬体的生成及成熟的过程<sup>[7]</sup>。LC3 是酵母 ATG8 的同源基因, 是自噬的标志性基因, 定位于自噬泡和自噬泡膜的表面, 参与自噬体的形成, 是自噬的特异性指标。Zhaorigetu 等<sup>[9]</sup>研究发现载脂蛋白 L6 (Apolipoprotein L6, ApoL6) 通过与 BH3 结构域结合并降解 Beclin-1, 促进 P62 (调节错误折叠蛋白、

功能障碍的细胞器的包裹和运输)的积累而抑制自噬。Maria 等<sup>[10]</sup>发现膜囊膜蛋白 1 (Vacuole Membrane Protein 1, VMP1) 通过与 Beclin-1 的 BH3 结构域结合, 与Ⅲ磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) hVps34 形成复合物调节自噬。Jae 等<sup>[11]</sup>研究发现抗凋亡基因 Bcl-2 和 Beclin-1 共同过表达的细胞寿命更长, 且 Beclin-1 的过表达能增加自噬标记蛋白 LC3-II 的表达, 并抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Mammalian target of rapamycin, mTOR) 活性而促进自噬体的形成。本课题组前期研究发现, Ox-LDL 通过组织蛋白酶 L 途径浓度依赖性地上调血管内皮细胞的自噬, 从而抑制 Ox-LDL 诱导的血管内皮细胞凋亡<sup>[12]</sup>。而 Dler 等<sup>[13]</sup>过氧化物酶体增殖物活化受体 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 激动剂处理人单核细胞源性的巨噬细胞, 结果表明 PPAR $\gamma$  激动剂浓度依赖性降低 Beclin 1 和 LC3 的表达, 抑制自噬。在本实验中, 不同浓度的 Ox-LDL (0、10、20、40 或 80 mg/L) 孵育 THP-1 巨噬细胞 24 h, Ox-LDL 浓度依赖性降低 Beclin-1 的表达及 LC3II/LC3I 的比值; LC3 的细胞免疫荧光也显示 Ox-LDL 浓度依赖性下调细胞内 LC3II 的含量; MDC 染色显示自噬囊泡的形成随 Ox-LDL 浓度呈负相关, 说明 Ox-LDL 浓度依赖性抑制 PMA 诱导的 THP-1 巨噬细胞的自噬。

研究表明, 在 As 早期巨噬细胞源性泡沫细胞大量聚集。在进展期 As 斑块内, 巨噬细胞的凋亡及凋亡细胞自吞不足将引发斑块破裂, 从而引发急性冠心病事件。细胞凋亡和自噬的反应机制有着共同的通道, 但它们之间的细胞开关处于一种相互排斥的状态, 自噬抑制凋亡, 可保护细胞免于发生凋亡和坏死。此外, 研究表明自噬参与脂质代谢过程: 自噬促进脂滴分解为游离胆固醇并外排; 如果自噬障碍, 脂滴就无法与溶酶体形成自噬小体, 胆固醇无法外排而继续堆积, 进一步诱导巨噬细胞的泡沫化以巨噬细胞的及凋亡和坏死, 加速 As 的进展<sup>[14]</sup>。本文作者认为 Ox-LDL 可能通过抑制巨噬细胞自噬, 从而诱导巨噬细胞凋亡和坏死以及细胞内胆固醇的蓄积, 从而促进 As 的进展。因此, 进一步明确 Ox-LDL 抑制巨噬细胞自噬的分子机制, 将可能为 As 的防治提供新的策略和新的靶点。

#### 参考文献:

[1] ROSS R. Atherosclerosis an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.

- [2] Chen HJ, Li DY, Saldeen T, et al. Transforming growth factor beta1 modulates oxidatively modified LDL-induced expression of adhesion molecules; Role of LOX-1 [J]. *Circ Res*, 2001, 89 (12): 1155-1160.
- [3] Harda SM, Kinoshita M, Kamido H, et al. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endo-thelial cells by common and unique mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (16): 968-9687.
- [4] Verheye S, Marhinet W, Kockx MM, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49 (6): 706-715.
- [5] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells [J]. *Biophys Res Commun*, 2004, 313 (2): 453-458.
- [6] 朱惠莲, 唐志红, 刘静. Ox-LDL 诱导血管内皮细胞表达 LOX-1 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26 (6): 612-616.
- [7] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression [J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15 (4): 534-544.
- [8] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2010, 6 (4): 463-477.
- [9] Zhaorigetu S, Yang Z, Toma I, et al. Apolipoprotein L6, induced in atherosclerotic lesions, promotes apoptosis and blocks Beclin 1-dependent autophagy in atherosclerotic cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (31): 273 89-98.
- [10] Molejon MI, Ropoloa, ReA L. The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1055.
- [11] Lee JS, Ha TK, Park JH, et al. Anti-cell death engineering of CHO cells: Co-overexpression of Bcl-2 for apoptosis inhibition, Beclin-1 for autophagy induction [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110 (8): 2195-207.
- [12] Wei DH, Jia XY, Liu YH. Cathepsin L stimulates autophagy and inhibits apoptosis of ox-LDL-induced endothelial cells: potential role in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31 (2): 400-406.
- [13] Mahmood DF, Jguirim-Souissi I, Khadija el-H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis and inhibits autophagy of human monocyte derived-macrophages via induction of cathepsin L: potential role in atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (33): 28858-28866.
- [14] Ro SH, Jung CH, Hahn WS, et al. Distinct functions of Ulk1 and Ulk2 in the regulation of lipid metabolism in adipocytes [J]. *Autophagy*, 2013, 9 (12): 2103-2114.