

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.002

脂多糖通过自噬作用促进氧化低密度脂蛋白诱导的泡沫细胞的形成*

袁媛¹ 张利军² 王超¹ 郑鹏飞³ 张秀敏¹ 叶菁^{1△} 冯旭阳^{3△}

(1 第四军医大学病理学与病理生理学教研室 陕西 西安 710032; 2 唐都医院实验与检验输血科 陕西 西安 710032;

3 西京医院心脏内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究脂多糖(LPS)促进氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞形成的机制。**方法:**人源性 THP-1 细胞的培养,经 ox-LDL 诱导形成泡沫细胞。采用油红 O 染色鉴定泡沫细胞的形成,免疫荧光和 Western blot 方法检测自噬活性,观察自噬作用对泡沫细胞脂质沉积的影响。**结果:**①经形态学观察,脂多糖可以促进 ox-LDL 诱导的泡沫细胞的形成。②脂多糖可以激活自噬作用,并且自噬活性在 16h 达到最强。③脂多糖可以增强自噬激活剂雷帕霉素(Rap)的促自噬作用($P < 0.05$),并且削弱自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)的作用。④Rap 单独作用不能影响泡沫细胞中脂质的累积,然而脂多糖能够增强 Rap 的作用,显著促进脂滴在泡沫细胞中的累积($P < 0.05$);3-MA 可以抑制基础水平和脂多糖诱导后泡沫细胞中脂滴的积累。**结论:**脂多糖通过增强自噬作用促进泡沫细胞的形成。

关键词:脂多糖;自噬;泡沫细胞;ox-LDL

中图分类号:Q813, R543.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2205-05

Lipopolysaccharide Enhances ox-LDL-induced Foam Cell Formation through Autophagy*

YUAN Yuan¹, ZHANG Li-jun², WANG Chao¹, ZHENG Peng-fei³, ZHANG Xiu-min¹, YE Jing^{1△}, FENG Xu-yang^{3△}

(1 The Fourth Military Medical University, Department of Pathology, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Tangdu hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of LPS in the ox-LDL-induced foam cell formation. **Methods:** Human THP-1 cells were cultured and differentiated into foam cells by the addition of ox-LDL. The foam cell formation was evaluated by Oil red O staining. The autophagic activity was determined by immunofluorescence and Western blot analysis. **Results:** ① By observing the morphology of the foam cells, it was found LPS enhanced ox-LDL induced lipid accumulation during the foam cell formation. ② LPS induced autophagy in human macrophages-derived foam cell formation. Moreover, the time-course (0h, 8h, 16h, or 24h) experiments revealed that the percentage of cells expressing autophagosomes was maximal at 16hr after LPS stimulation. ③ Autophagic activity in human THP-1 macrophages was either stimulated with Rap or inhibited by 3-MA. LPS could augment the activity of autophagy after Rap and prevent the role of 3-MA. ④ Lipid accumulation increased by the exposure to LPS, and the increase was enhanced by Rap. In contrast, inhibition of autophagy with 3-MA prevented both the basal and the LPS-induced lipid accumulation. Rapalone did not alter the level of total cholesterol or triglyceride, while inhibition of autophagy with 3-MA decreased triglyceride in macrophages either treated with LPS or not ($P < 0.05$). **Conclusion:** LPS augments the foam cell formation through autophagy.

Key words: Lipopolysaccharide; Autophagy; Foam cell; Ox-LDL

Chinese Library Classification(CLC): Q813, R543.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2205-05

前言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是贯穿心脑血管疾病的主线,可以导致心肌梗死,心衰,外周血管疾病,中风等,是目前常见的高致病率的病种之一,发病率也逐年升高。因此,对其致病机理及防治的研究也日益成为热点^[1]。动脉粥样硬化形成过程中,血浆低密度脂蛋白(LDL)浸润进入动脉壁,通过氧化修饰成为 oxLDL。oxLDL 被巨噬细胞上的清道夫受体摄取,这

种摄取无反馈性调节,导致大量胆固醇蓄积,形成泡沫细胞。泡沫细胞堆积形成脂质条纹乃至脂质斑块,形成斑块是动脉粥样硬化发生、发展的主要病理基础和始动环节。因此,在这个过程中,泡沫细胞形成是动脉粥样硬化的核心步骤^[2-3]。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,在诱导机体免疫细胞反应中具有关键作用^[4]。有研究证实,血清中仅低浓度的脂多糖就可以作为很强的动脉粥样硬化危险因子^[5],但其诱导机制不明。有研究发现,自噬参与巨噬

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070248,81070249);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2013JQ4020)

作者简介:袁媛(1985-),女,硕士,主要研究方向:脂肪代谢研究,E-mail: yy12103034@163.com

△通讯作者:冯旭阳,电话:029-84772257, E-mail: fengxuyang@sohu.com,叶菁, E-mail: yejing@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-10)

细胞来源的泡沫细胞内胆固醇的代谢^[6]。动脉粥样硬化早期和晚期斑块泡沫细胞内均存在自噬体样双层膜机构,而且其数量与斑块的发生、发展及稳定性有直接关系^[7]。因此,自噬在泡沫细胞和动脉粥样硬化形成中有重要作用,但作用机制如何,目前仍不清楚。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

THP-1 人单核细胞株(中科院上海生化细胞所)。RPMI 1640 培养基(Gibco)、胎牛血清(杭州四季青);佛波脂(phorbol 12-Myristate 13-acetate, PMA)(Promega);脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)(sigma);氧化修饰低密度脂蛋白(oxidative modifications of LDL, ox-LDL)(广州奕源生物科技有限公司);雷帕霉素(Rapamycin, RAP)(Gene Operation);3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(sigma);脂质体 2000(Invitrogen);鼠抗酵母 Atg8 的哺乳动物同源蛋白微管相关轻链蛋白 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)单克隆抗体(abcam, 美国);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)(Santa Cruz, 美国);辣根过氧化物酶偶联兔抗小鼠 IgG 抗体(Santa Cruz, 美国);ECL 化学发光显色试剂盒(Amersham, 瑞典);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Pierce, 美国);其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 泡沫细胞诱导和鉴定 THP-1 细胞采用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,调整细胞数至 $5 \times 10^5/L$,加佛波脂(100 ng/mL)于培养液,12 孔培养板培养 24 h 后,悬浮细胞分化为贴壁生长的巨噬细胞。PBS 清洗 3 次,在巨噬细胞中加入 ox-LDL(50 mg/L)共同孵育 24~48 h,37 °C,5% CO₂,得到泡沫细胞,使用油红 O 对细胞内脂质进行染色鉴定。

1.2.2 细胞内甘油三酯和胆固醇酯含量的检测 根据上述方法处理细胞后,加入 1 mL 冰冷的 PBS 刮下全部细胞,用 1 mL PBS 洗涤培养皿,加入 4 mL 氯仿/甲醇(容积比,1:1),Folch 法^[8]抽提细胞内总脂类。采用 100 μ L 含 20 mL/L Triton

X-100 的 PBS 重新溶解脂类。完全按照甘油三酯和胆固醇酯定量检测试剂盒的说明书进行操作,测定其含量。细胞总蛋白干燥后,溶于 2 mol/L KOH,采用 Bradford 法测定总蛋白浓度。

1.2.3 免疫荧光方法检测自噬活力 利用脂质体 2000 转染 GFP 标记的自噬标志性分子微管相关轻链蛋白 LC3(GFP-LC3)质粒并通过荧光显微镜观察、定量 GFP-LC3 荧光斑,是目前应用较广泛的哺乳动物细胞自噬检测技术^[9]。

1.2.4 Western blot 检测 LC3-I 向 LC3-II 的转化 根据上述方法对巨噬细胞进行处理后,加入 100 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液并刮下细胞,100 g/L SDS-PAGE 分离蛋白,电压 100 V 转膜 1 h,50 g/L 脱脂牛奶封闭 1 h,PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,加入 1:1000 稀释的兔抗小鼠 LC3 抗体,4 °C 摇床孵育过夜,PBST 清洗 3 次,每次 5 min,加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的兔抗小鼠二抗,室温孵育 1 h,PBST 清洗 4 次,加入 ECL 发光液,压 X-Ray 片,常规显影并定影。 β -actin 作为上样量对照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,数据均采用表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.4 抗体和免疫荧光染色

抗 -Albumin (1:100) (Abcam, 美国);驴抗羊 IgG-cy3 (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 美国)。免疫荧光染色方法:DMEM 培养基冲洗细胞两次,用 1% 多聚甲醛固定,加一抗 4 °C 过夜,PBS 冲洗,加入二抗 37 °C 孵育 2 h。用 DAPI 染核。

2 结果

2.1 脂多糖促进泡沫细胞中脂滴的积累

利用人的 THP-1 细胞系,ox-LDL 和 LPS 共同孵育 24h,采用油红 O 染色观察泡沫细胞中脂质的积累。结果发现,LPS 可以显著促进 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中脂滴的积累。细胞中甘油三酯和胆固醇酯的水平与形态学结果一致(图 1)。

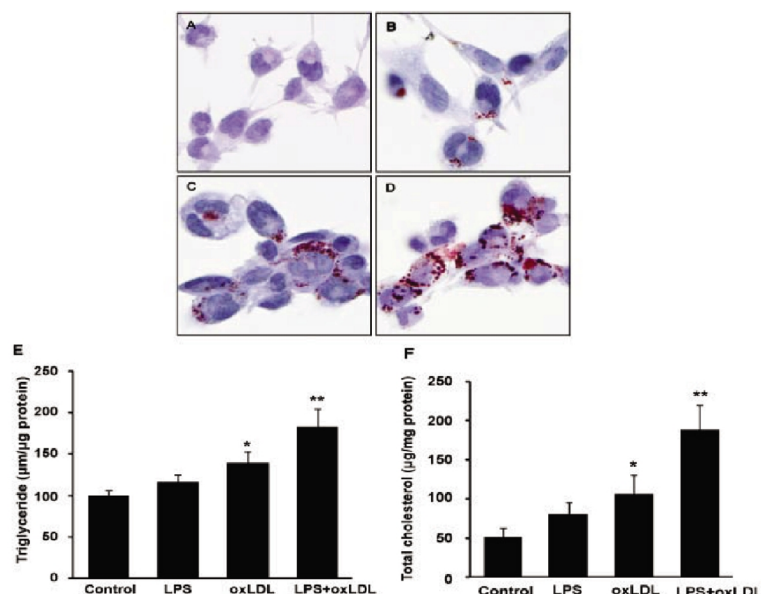


图 1 LPS 促进 ox-LDL 诱导的泡沫细胞的形成(400 $\times$)

Fig.1 LPS promotes ox-LDL induced foam cell formation(400 $\times$)

2.2 泡沫细胞形成过程中自噬活力的变化

在 LPS 诱导过程中, 我们转染了 GFP 标记的自噬标志分子微管相关轻链蛋白 LC3(GFP-LC3)质粒, 利用免疫荧光和 Western blot 方法检测了自噬活力的变化。正常生理环境下 LC3 弥散分布在胞质内, 自噬激活时转移至自噬体膜上呈斑点状。结果发现, 转染 GFP-LC3 的泡沫细胞经 LPS 刺激后, 荧光由无规则的广泛分布变成荧光斑点状, 表明自噬增强。进一步, 我们计数表达 GFP-LC3 荧光斑细胞的比例, 发现在 LPS 刺激 16h 时, 自噬活力是最强的。同时, Western blot 方法证实 LC3I 向 LC3II 的转化, 也证明泡沫细胞形成过程中自噬被激活(图 2)。

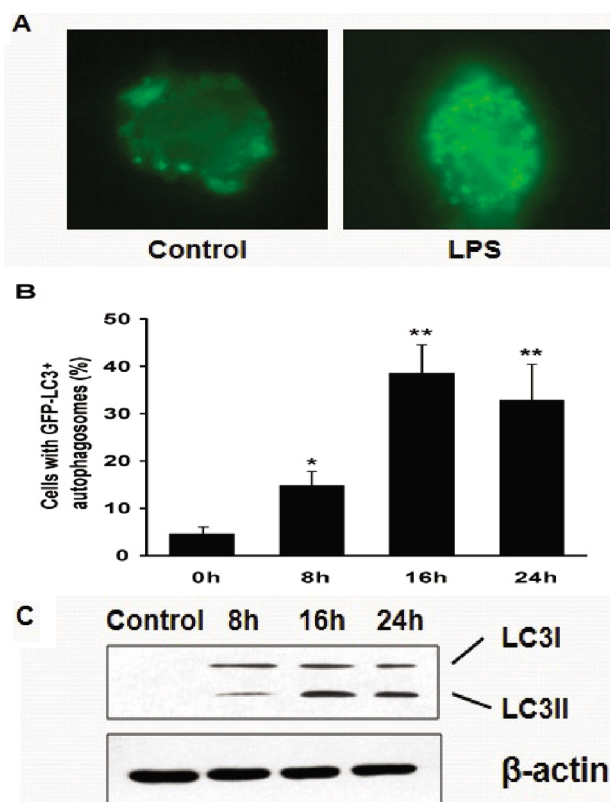


图 2 LPS 促进自噬作用

Fig.2 LPS induces autophagy

2.3 自噬活力的检测

为了确定 LPS 对泡沫细胞中自噬活力的影响, 本研究采用了自噬特异性的激活剂雷帕霉素(Rap)和抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)^[10]。泡沫细胞转染了 GFP-LC3 质粒后, 免疫荧光结果发现 LPS 能够促进自噬激活剂 Rap 对自噬的活化作用。并且, LPS 可以削弱抑制剂 3-MA 的抑制作用(图 3)。

2.4 自噬作用促进泡沫细胞中脂质的积累

为了明确自噬作用对泡沫细胞中脂滴形成的影响, 本研究利用自噬特异性激活剂 Rap 和抑制剂 3-MA 改变自噬活力, 采用油红 O 方法检测脂滴含量。实验结果表明, 自噬激活剂 Rap 单独作用不能影响泡沫细胞中脂质的累积, 然而脂多糖能够增强 Rap 的作用, 显著促进脂滴在泡沫细胞中的累积($P < 0.05$); 3-MA 可以抑制基础水平和脂多糖诱导后泡沫细胞中脂滴的积累(图 4)。

3 讨论

自噬是真核细胞特有的生命现象, 是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程^[11]。最近研究发现, 除了脂酶依赖的脂解作用外, 细胞中脂滴也是自噬作用的底物之一。在营养状态改变时, 自噬能够根据机体需要增加或减少对脂滴的降解, 从而起到调节脂代谢的作用。此外, 自噬在脂滴形成及脂肪组织分化过程中也发挥重要作用^[12]。

传统上意义上认为脂质分解动员完全归咎于脂滴相关脂肪酶的作用, 自噬依赖的脂肪分解作用往往被忽视。近年来, 自噬在脂代谢方面的调节作用越来越多的被认识^[13]。而且, 脂质自噬不仅可以通过增加脂滴中甘油三酯等的降解来直接调节其代谢过程, 也可以通过调控脂肪分化等其他途径间接作用于脂代谢。Singh 等对 ATG-7(自噬体形成的关键基因)敲除的脂肪细胞系 3T3-L1 的研究发现, 自噬作用能促进脂质的积累, 而阻断自噬, 发现甘油三酯积累减少, 脂肪细胞分化的标志物如脂肪酸合成酶、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶表达量明显下降^[14]。在特异性敲除 ATG7 的脂肪组织中发现, 白色脂肪组织的含量仅是野生型小鼠的 20%, 约 50% 的白色脂肪组织由大量小的含有多泡脂滴的脂肪细胞(棕色脂肪细胞的标记)组成, 而野生型

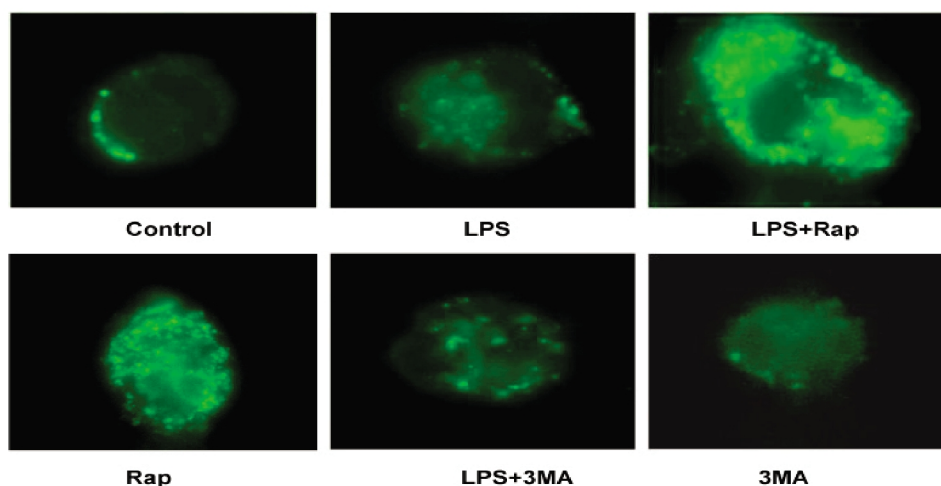


图 3 免疫荧光检测自噬活力

Fig.3 Autophagic activity is detected by fluorescence microscopy

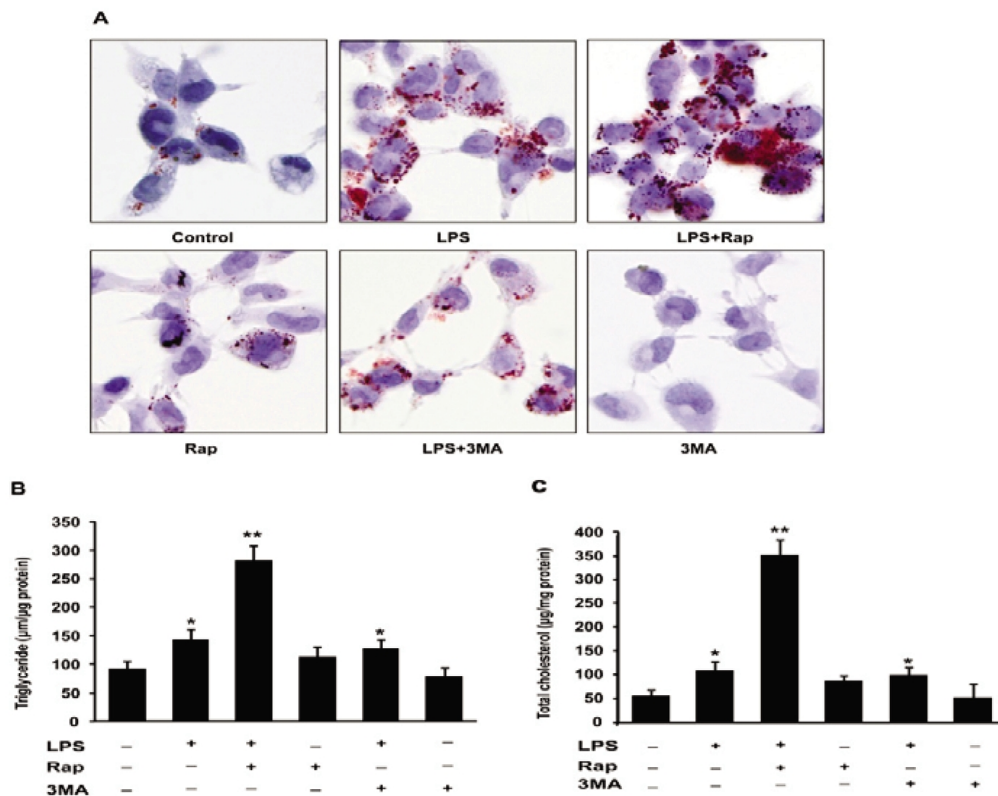


图4 自噬作用促进泡沫细胞中脂质的积累

Fig.4 Autophagy enhances lipid accumulation in foam cells

小鼠的白色脂肪则由大的单腔脂滴组成^[15]。此外,自噬还与胰岛素抵抗及胰高血糖素等有密切联系^[16],为治疗代谢综合征、肥胖、2型糖尿病开辟了一个新的途径。

自噬标志性分子微管相关轻链蛋白 LC3 作为自噬小体的特异性标志物收到广泛关注^[17,18]。本文主要采用两种方法检测了 LC3 的改变:一种是利用 GFP 标记的自噬标志性分子微管相关轻链蛋白 LC3(GFP-LC3)质粒。正常生理环境下 LC3 弥散分布在胞质内,自噬激活时转移至自噬体膜上,所以在荧光显微镜下可以观察到 GFP-LC3 在胞质内呈弥散状或在自噬体膜上呈斑点状特征^[19]。另一种方法是利用 Western blotting 方法检测 LC3-I 向 LC3II 的转化。正常细胞中,LC3 的 C 末端被加工生成 LC3-I;但当自噬被激活时,LC3-I 在泛素酶的作用下偶联生成 LC3II。根据两者的分子量大小不同,通过 SDS-PAGE 凝胶可以将 LC3-I 和 LC3II 分离开^[20,21]。

本实验利用体外诱导的 THP-1 细胞模型确定脂质自噬在动脉粥样硬化泡沫细胞形成过程中的作用,结果发现:(1)脂质自噬确实参与巨噬细胞来源的泡沫细胞的形成过程;(2)自噬作用能够促进 THP-1 源性泡沫细胞的形成本研究能够使我们深入了解泡沫细胞形成过程中脂滴的代谢特点,从自噬角度认识细胞内脂滴代谢的过程,为动脉粥样硬化泡沫细胞形成提供新的研究基础。

参考文献(References)

- [1] Wong LK. Global burden of intracranial atherosclerosis [J]. Int J Stroke, 2006, 1(3): 158-159
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Nature, 2002, 420: 868-874
- [3] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead[J]. Cell, 2001, 104: 503-516
- [4] Clarisse CP, Ludvine B, Eric B, et al. Antiinflammatory and antiatherogenic effects of the NF-κB inhibitor Acetyl-11-Keto-β-boswellic acid in LPS-challenged ApoE^{-/-} mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(2): 271-277
- [5] Hartvigsen K, Chou MY, Hansen LF, et al. The role of innate immunity in atherogenesis[J]. J Lipid Res, 2009, 50: S388-393
- [6] Ouimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase [J]. Cell Metab, 2011, 13: 655-667
- [7] Razani B, Feng C, Coleman T, et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression[J]. Cell Metab, 2012, 15: 534-544
- [8] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1): 497-509
- [9] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. Autophagy, 2008, 4: 151-175
- [10] Mei S, Gu H, Ward A, et al. p38 MAPK promotes cholesterol ester accumulation in macrophages through inhibition of macroautophagy [J]. J Bio Chem, 2012, 287: 11761-11768
- [11] Liao X, Sluimer JC, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 15 (4):545-553
- [12] Singh R, Cuervo AM. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism[J]. Int J Cell Biol. 2012, 2012: 282-294
- [13] Schrijvers DM, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in

- atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2787-2791
- [14] Singh R, Xiang Y, Wang Y, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(11): 3329-3339
- [15] Szanto I, Kahn C R. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(5): 2355-2360
- [16] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages *Cell*, 2004, 119: 753-766
- [17] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458: 1131-1135
- [18] Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, et al. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy[J]. *Science*, 2005, 307: 727-731
- [19] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 2491-2502
- [20] Matsunaga K, Saltoh T, Tabata K, et al. Two Beclin1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 385-396
- [21] Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, et al. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 322-329

(上接第 2204 页)

- [12] Ishida, M. and G.E. Moore. The role of imprinted genes in humans [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(4): 826-840
- [13] Williamson, C.M., M.D. Turner, S.T. Ball, et al. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the *Gnas* cluster[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 350-355
- [14] Williamson, C.M., S.T. Ball, W.T. Nottingham, et al. A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of *Gnas*[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 894-899
- [15] Bartolomucci, A., R. Possenti, S.K. Mahata, et al. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications [J]. *Endocr Rev*, 2011, 32(6): 755-797
- [16] Eaton, S.A., T. Hough, R. Fischer-Colbrie, et al. Maternal inheritance of the *Gnas* cluster mutation Ex1A-T affects size, implicating *NESP55* in growth[J]. *Mamm Genome*, 2013, 24(7-8): 276-285
- [17] Chang, S., L. Wang, Y. Guan, et al. Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in folate-deficient mouse embryonic stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(7): 1549-1558
- [18] Waterland, R.A. and R.L. Jirtle. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases[J]. *Nutrition*, 2004, 20(1): 63-68
- [19] Ghoshal, K., X. Li, J. Datta, et al. A folate-and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats[J]. *J Nutr*, 2006, 136(6): 1522-1527
- [20] Pogribny, I.P., A.R. Karpf, S.R. James, et al. Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet[J]. *Brain Res*, 2008, 1237: 25-34
- [21] Howell, C.Y., T.H. Bestor, F. Ding, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene [J]. *Cell*, 2001, 104(6): 829-838
- [22] Crider, K.S., T.P. Yang, R.J. Berry, et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role[J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(1): 21-38
- [23] Furness, D., M. Fenech, G. Dekker, et al. Folate, vitamin B12, vitamin B6 and homocysteine: impact on pregnancy outcome [J]. *Matern Child Nutr*, 2013, 9(2): 155-166
- [24] Lindblad, B., S. Zaman, A. Malik, et al. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005, 84(11): 1055-1061
- [25] Plagge, A., E. Gordon, W. Dean, et al. The imprinted signaling protein *XL alpha s* is required for postnatal adaptation to feeding[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(8): 818-826
- [26] Williamson, C.M., S.T. Ball, C. Dawson, et al. Uncoupling antisense-mediated silencing and DNA methylation in the imprinted *Gnas* cluster[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(3): e100134.
- [27] Williamson, C.M., J.A. Skinner, G. Kelsey, et al. Alternative non-coding splice variants of *Nespas*, an imprinted gene antisense to *Nesp* in the *Gnas* imprinting cluster[J]. *Mamm Genome*, 2002, 13(2): 74-79