

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.016.html>

辛伐他汀抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡

彭雪¹, 李允允¹, 靳梦醒¹, 黄大可², 黄保军¹

摘要 目的 探讨辛伐他汀在氧化低密度脂蛋白(oxLDL)诱导巨噬细胞焦亡中的作用及机制。方法 oxLDL 作用于 J774A.1 小鼠巨噬细胞,采用乳酸脱氢酶(LDH)释放试剂盒检测 LDH 的释放,荧光显微镜观察吖啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)的染色情况来判断焦亡细胞膜的完整性;Western blot 检测 LC3-II/I、caspase-1 与白介素-1 β (IL-1 β)的蛋白表达情况;分别加入辛伐他汀、3-甲基腺嘌呤(3-MA)自噬阻断剂等药物后,检测上述实验结果的变化情况。结果 在 oxLDL 诱导的巨噬细胞脂质聚集的过程中,辛伐他汀药物有保护膜完整性的作用,并且显著减少 LDH 的释放,AO/EB 荧光染色结果可观察到橘红色荧光(EB)所占比例显著降低,并抑制 caspase-1 的激活和 IL-1 β 的分泌。然而,当巨噬细胞的自噬过程被 3-MA 所阻断时,Western blot 结果显示 LC3-II/I 的表达下调,caspase-1 的活性和成熟的 IL-1 β 分泌增加;同时 LDH 实验和染色实验结果也显示,LDH 释放增多、AO/EB 染色中橘红色荧光增加,表明 oxLDL 诱导的巨噬细胞膜的损伤进一步加重。结论 辛伐他汀可抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡,可能与增强 oxLDL 诱导的巨噬细胞自噬有关。

关键词 焦亡;辛伐他汀;氧化低密度脂蛋白;自噬

中图分类号 R 392.5; R 543.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1654-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.016

在动脉粥样硬化的形成过程中,巨噬细胞经过吞噬氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL),最终导致脂质沉积和巨噬细胞发生泡沫样改变^[1]。细胞焦亡是程序性细胞死亡方式,取决于 caspase-1 的活化并且伴随着大量炎症因子的产生^[2]。oxLDL 在巨噬细胞内的聚集可导致 NOD 样受体蛋白 3(nucleotide-binding domain, leucine-rich-repeat-containing family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎症小体和 caspase-1 的活化,引

起细胞焦亡并进一步促进动脉粥样硬化的发展^[3]。

他汀类药物可以减少细胞内胆固醇的水平^[4]。在动脉粥样硬化的过程中,他汀类药物还可以降低炎症反应和氧化应激反应,从而阻碍血栓的形成^[5]。在 oxLDL 作用的巨噬细胞中,辛伐他汀可以增强细胞自噬,从而减轻脂质在巨噬细胞内的聚集。但其对 oxLDL 诱导巨噬焦亡的影响及相关途径尚不明确。该实验旨在探讨辛伐他汀对 oxLDL 诱导巨噬细胞焦亡的影响及可能的作用机制,为其在动脉粥样硬化的临床应用提供新的思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 实验细胞为小鼠单核巨噬细胞 J774A.1,该细胞株源于武汉大学细胞库,并应用高糖细胞培养液,在适宜的条件下进行培养。

1.2 主要试剂 oxLDL 购自广州奕源生物公司;DMEM 购自赛默飞生物化学制品有限公司;辛伐他汀购自浙江天航生物科技公司;吖啶橙/溴化乙锭(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB)染料购自上海源叶生物科技有限公司;一抗兔抗鼠 LC3-II/I 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购自原坪皓生物技术有限公司;一抗兔抗小鼠 caspase-1、IL-1 β 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 LDH 释放的检测 在 96 孔细胞培养板中接种一定数量的细胞,等到细胞数量达到一定程度时,去除已消耗的培养液,PBS 多次清洗后添加新的培养液进行培养。在规定的检测时间,重新更换培养液,按照规定步骤依次加入 LDH 释放试剂和其它试剂,混匀继续培养。到达既定的时间后收集细胞,离心后抽取 120 μ l 上清液,放置仪器上进行样品测定。

1.3.2 AO/EB 复染 把细胞接种至细胞培养板中,每孔 2 ml 细胞培养液进行培养。等到细胞达到合适的密度,加入不同浓度的药物继续培养;之后离

2017-05-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:30972791)

作者单位: 安徽医科大学¹ 免疫学教研室、² 基础医学院综合实验室, 合肥 230032

作者简介: 彭雪,女,硕士研究生;

黄保军,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: huang-baojun516@163.com

心收集细胞,用 PBS 洗涤重悬细胞后;在上悬液细胞中分别加 AO 和 EB 等量染料 10 μL ,待染色液充分混合后,立即封片,放置荧光显微镜下检测。

1.3.3 Western blot 法 在 6 孔板中接种 J774A.1 细胞,加入 oxLDL 和辛伐他汀。另外,在 oxLDL 和辛伐他汀的基础上再加入 3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制剂。到达既定的时间后收集细胞,裂解提取细胞总蛋白。通过酶标仪测定其浓度。根据所测蛋白的大小,配置一定比例的分离胶。把蛋白样本与 $5\times$ 上样缓冲液按比例混匀。在上样之前,需点动离心混匀后加到加样孔中,确保每孔中有一定的蛋白总量。电泳转膜后,用牛奶室温封闭 2 h,加入一抗(LC3-II / I、IL-1 β 和 caspase-1 抗体)室温下孵育 2 h,用 PBST 洗涤;加入对应的辣根过氧化物酶标记的二抗,轻轻摇晃 1 h 后再次洗涤;应用数码凝胶图像分析系统进行曝光观察,用于后期定量分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表式,组间比较采用 t 检验,所有实验重复 3 次以上。各时间点数据间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡

2.1.1 LDH 释放试验的结果 与正常细胞组比较,加入 oxLDL 后,LDH 的释放显著升高,达到 $(62.40 \pm 7.32)\%$; 分别应用不同浓度(0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$) 辛伐他汀,LDH 的检测结果显示无明显变化;而在 oxLDL 的基础上加入辛伐他汀后,LDH 释放呈下降趋势,其中加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀减少趋势最为明显,达到 $(37.33 \pm 4.82)\%$,差异有统计学意义($F = 70.22, P < 0.05$)。见图 1A。

2.1.2 AO/EB 染色结果 在应用 oxLDL 后,EB 橘红色荧光显著上升;与正常细胞组相比,加入不同浓度辛伐他汀(0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$) 后,EB 的荧光无明显变化;而在 oxLDL 的基础上加入辛伐他汀后,EB 橘红色荧光所占的比例呈减少的趋势。见图 1B。

2.2 3-MA 阻断辛伐他汀对 oxLDL 诱导的巨噬细胞自噬的增强作用 在 oxLDL 及 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理的 J774A.1 细胞中,在 3-MA 的作用下,LC3-II / I 的表达明显下降至 $(0.32 \pm 4.65)\%$,差异有统计学意义($F = 224.05, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 3-MA 阻断自噬对辛伐他汀抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡影响

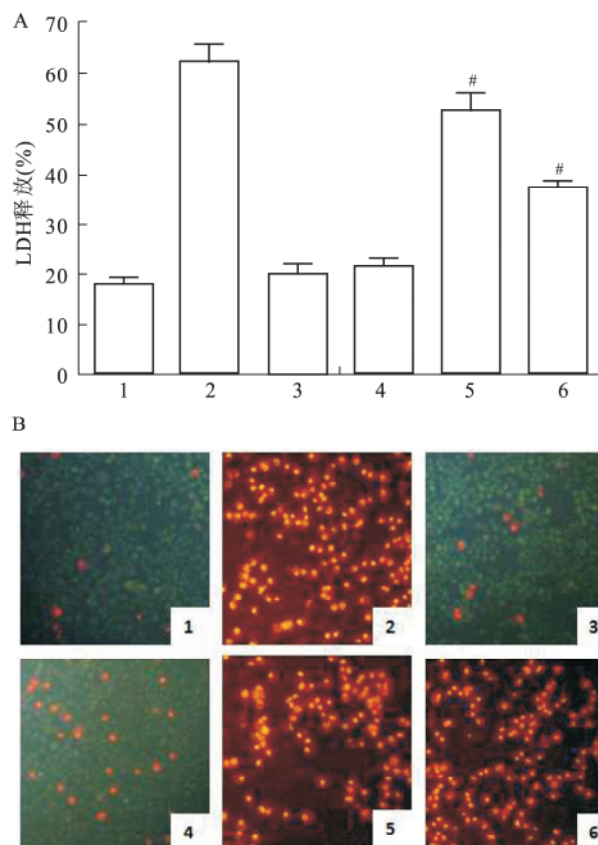


图1 LDH 的释放和 AO/EB 复染情况

A: LDH 的释放; B: AO / EB 复染 $\times 400$; 1: 对照组; 2: oxLDL; 3: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀; 4: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀; 5: oxLDL + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀; 6: oxLDL + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀; 与 oxLDL 比较: $^{\#}P < 0.05$

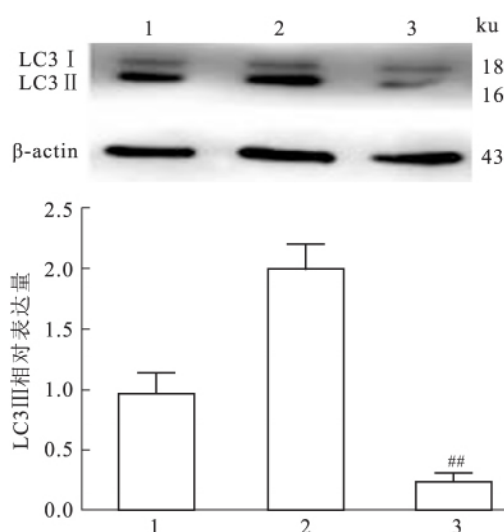


图2 3-MA 作用巨噬细胞 LC3-II / I 的表达

1: oxLDL; 2: oxLDL + 辛伐他汀; 3: oxLDL + 辛伐他汀 + 3-MA; 与 oxLDL + 辛伐他汀比较: $^{##}P < 0.01$

2.3.1 3-MA 作用后 LDH 释放检测结果 正常细

胞组加入 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀后, LDH 的释放降低; 与辛伐他汀的基础上加入 3-MA 后, 检测到的 LDH 释放量显著升高, 达到 $(62.41 \pm 7.32)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 154.83, P < 0.01$)。见图 3A。

2.3.2 3-MA 作用后 AO/EB 复染情况 为了明确辛伐他汀在自噬被阻断后对焦亡的影响, 本研究对 AO/EB 复染结果进行了量化分析, 在 1 000 个细胞中计算橘红色 EB 荧光在全部荧光中所占的比例。正常细胞中加入 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀后, EB 的荧光比例降低; 与辛伐他汀的基础上加入 3-MA, 橘红色 EB 荧光所占总荧光的比例明显升高, 达到 $(85.02 \pm 5.01)\%$, 差异有统计学意义 ($F = 142.64, P < 0.01$)。见图 3B、C。

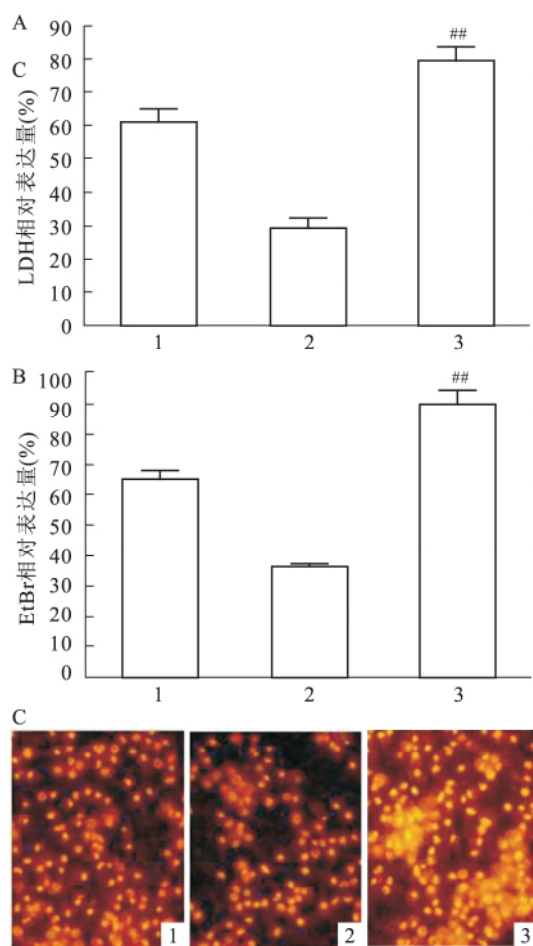


图3 3-MA 作用巨噬细胞 LDH 的释放和 AO/EB 复染情况

A: LDH 的释放; B: AO / EB 复染量化分析; C: AO / EB 复染 $\times 400$; 1: oxLDL; 2: oxLDL + 辛伐他汀; 3: oxLDL + 辛伐他汀 + 3-MA; 与 oxLDL + 辛伐他汀比较: $^{##}P < 0.01$

2.3.3 3-MA 作用后巨噬细胞 caspase-1 活化和 IL-1 β 成熟的结果 Caspase-1 本身不具有活性, 主要以 pro-caspase-1 的形式存在。只有通过活化裂解才

能生成有活性的 cleaved caspase-1。另外, 具有活性的 cleaved caspase-1 还可以通过促进 IL-1 β 的分泌使细胞发生炎症反应。正常细胞中加入 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀后, cleaved caspase-1 和成熟 IL-1 β 表达均减弱; 另外再加入 3-MA 后, cleaved caspase-1 和 IL-1 β 表达呈增加的趋势。见图 4A、B。

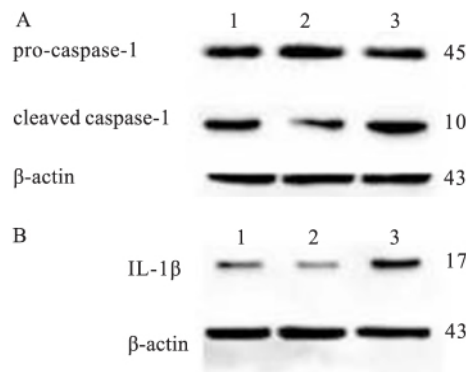


图4 3-MA 对巨噬细胞 caspase-1 和 IL-1 β 表达的影响

A: caspase-1 的表达; B: IL-1 β 的表达; 1: oxLDL; 2: oxLDL + 辛伐他汀; 3: oxLDL + 辛伐他汀 + 3-MA

3 讨论

与凋亡和坏死不同, 细胞焦亡是一种新的炎症性细胞死亡形式。其伴随着细胞内容物的释放及大量促炎因子的生成, 其主要特征包括 caspase-1 依赖的细胞溶解和炎症因子的产生^[8]。有文献^[9]报道, 焦亡在动脉粥样硬化和感染等疾病中发挥着至关重要的作用。过去一直认为在 oxLDL 作用下的巨噬细胞所表现出的特征是凋亡, 然而近期有研究^[10]显示, 在 oxLDL 处理的巨噬细胞中, 观察到如膜完整性的破坏、炎症反应、细胞器的损伤等特征, 而这些特征在细胞凋亡中却是不存在的。当细胞膜结构被破坏以后, 细胞质内的 LDH 释放到细胞外。通过检测培养液中胞质内的 LDH 活性, 可以判断细胞膜的完整性, 继而了解细胞焦亡的发生情况。AO 可以穿过结构完好的细胞膜, 在一定的激发光下显示绿色的荧光。而 EB 只能从受损的细胞膜通过, 荧光显微镜下显示橘红色的荧光。通过 AO / EB 染色观察, 可以检测了解细胞膜的完整性, 进一步判断细胞焦亡的发生。本研究通过对 LDH 释放的检测和 AO / EB 染色, 结果表明 oxLDL 可以导致巨噬细胞膜完整性的损伤; 同时 cleaved caspase-1 和 IL-1 β 的检测结果也证实了 oxLDL 可以诱导巨噬细胞发生 caspase-1 依赖的细胞焦亡。

辛伐他汀是一种高效的降脂药物,广泛用于动脉粥样硬化的治疗。研究^[8]显示,辛伐他汀还可以增强 oxLDL 介导的巨噬细胞自噬。然而,辛伐他汀对 oxLDL 诱导巨噬细胞焦亡的影响仍不清楚。本研究中通过实验证实辛伐他汀能有效缓解 oxLDL 诱导的巨噬细胞膜的损伤,并阻碍 caspase-1 的活化和 IL-1 β 的产生。实验结果表明,辛伐他汀在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡过程中发挥抑制作用。

自噬与焦亡之间存在相互关系。有研究^[9]显示,活性氧的产生与线粒体自噬密切相关,细胞通过选择性降解发生氧化损伤的线粒体,可以减轻活性氧引起的细胞损伤。另外,活性氧也可通过增加氧化应激激活 NLRP3 炎症体和 caspase-1-IL 1 β 信号从而引起细胞焦亡^[10]。本研究前期显示辛伐他汀可以增强 oxLDL 诱导的巨噬细胞自噬。然而,这是否与辛伐他汀抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡有关,目前尚不清楚。3-MA 是一种被广泛应用的自噬抑制剂,可有效的阻断自噬体的形成,抑制细胞内蛋白的降解。为此,本研究应用 3-MA 阻断自噬后,观察辛伐他汀对 oxLDL 诱导巨噬细胞焦亡过程的影响。结果表明:在 3-MA 处理巨噬细胞后,自噬被有效阻断;在此背景下,caspase-1 的活化和随后的 IL-1 β 的分泌进一步增加,LDH 水平和 EB 橘红色荧光比例也相应增加。即在 3-MA 干预下,oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡的过程中,辛伐他汀的抑制作用被阻断。因此,辛伐他汀可能通过增强巨噬细胞自噬,抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞焦亡。

综上所述,在 oxLDL 作用的巨噬细胞基础上,辛伐他汀可能通过增强巨噬细胞自噬,调节活性氧的产生和 NLRP3 的活化,从而抑制 caspase-1 依赖的细胞焦亡。

参考文献

- [1] Stancel N, Chen C C, Ke L Y, et al. Interplay between CRP, atherogenic LDL, and lox-1 and its potential role in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Clin Chem, 2016, 62(2): 320-7.
- [2] Lin J, Shou X, Mao X, et al. Oxidized low density lipoprotein induced caspase-1 mediated pyroptotic cell death in macrophages: implication in lesion instability [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62148.
- [3] Abe J, Berk B C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease [J]. Trends Cardiovasc Med, 1998, 8(2): 59-64.
- [4] Maron D J, Fazio S, Linton M F. Current perspectives on statins [J]. Circulation, 2000, 101(2): 207-13.
- [5] Storino Farina M, Rojano Rada J, Molina Garrido A, et al. Statins and atherosclerosis: the role of epigenetics [J]. Medwave, 2015, 15(10): e6324.
- [6] Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L, et al. Pyroptosis—a cell death modality of its kind [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(3): 627-30.
- [7] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(11): 2255-64.
- [8] Liao X, Sluimer J C, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-53.
- [9] Martens S, Nakamura S, Yoshimori T. Phospholipids in autophagosome formation and fusion [J]. J Mol Biol, 2016, 428(24): 4819-27.
- [10] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(5): 615-21.
- [11] Gurung P, Lukens J R, Kanneganti T D. Mitochondria: diversity in the regulation of the NLRP3 inflammasome [J]. Trends Mol Med, 2015, 21(3): 193-201.

Simvastatin inhibits the oxidized LDL-induced macrophages pyroptosis

Peng Xue, Li Yunyun, Jin Mengxing, et al

(Dept of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of simvastatin on oxLDL induced macrophages pyroptosis. **Methods**

OxLDL treated J774A.1 mouse macrophages. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining method and LDH release assay was used to observe the membrane integrity; Western blot was used to detect the expression of LC3-II/I, caspase-1 and interleukin(IL)-1 β , compared with the group after treatment with simvastatin and 3-methyladenine (3-MA). **Results** Simvastatin could protect the plasma membrane integrity and inhibit the activation of caspase-1 and the maturation of IL-1 β during the process of lipid accumulation in macrophages induced by oxLDL. LDH release decreased and AO/EB staining showed orange fluorescence reduce. However, when the autophagy of macrophage was blocked by 3-MA, Western blot showed that the expression of LC3-II/I was down-regu-

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.017.html>

骨保护素-聚乳酸羟基乙酸缓释微球的制备及体外释药性能研究

刘华杰¹, 李亚磊¹, 魏 娇², 冯小琼¹, 马璞玉¹, 吴豪阳¹

摘要 目的 以聚乳酸羟基乙酸(PLGA)为载体构建载有骨保护素(OPG)的微球,筛选出缓释效果最佳的制备条件,并研究载药微球的体外释放特性。方法 采用复乳溶剂挥发法,以不同的搅拌速度、聚乙烯醇(PVA)浓度、PLGA浓度制备 OPG-PLGA 微球并测定其载药量和包封率,通过正交试验优化制备条件;以磷酸盐缓冲液作为释放介质考察载药微球的体外释放特性。结果 以 PLGA 聚合物浓度 400 mg/ml、搅拌速度 400 r/min、PVA 浓度 2% 为条件制备的载药微球具有最优的载药量和包封率,分别为 6.21×10^{-7} 和 75.10%,体外释药试验显示微球持续释放时间达到 30 d,具有良好缓释效果。结论 采用优化条件制备的 OPG-PLGA 微球具有较高的包封率和载药量,同时具有良好的缓释效果,为用于拔牙位点保存术的缓释药物研究提供了基础。

关键词 骨保护素; 聚乳酸羟基乙酸; 载药量; 包封率; 制备工艺

中图分类号 R 944; R 782.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1658-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.017

牙槽骨骨质和骨量是种植体植入后长期稳定的基础,但患牙拔除后常出现缺牙区骨组织吸收^[1]。破骨细胞活化成熟对骨吸收有重要作用,而破骨细胞的分化依赖其细胞表面的核因子 κ B 受体激活剂(receptor activator of nuclear factor κ B, RANK)与成骨细胞分泌的核因子 κ B 受体激活剂配体(RANK

ligand, RANKL)相结合。大量研究^[2-4]显示,骨保护素(osteoprotegerin, OPG)作为 RANKL 的诱骗受体,可竞争性的与 RANK 结合,从而抑制破骨细胞的成熟和功能,达到阻断骨吸收的作用。目前,应用 OPG 治疗骨质疏松、高钙血症已进入临床试验阶段^[5],但局部用于拔牙位点保存容易因药物流失快导致未达到有效浓度^[6]。

聚乳酸羟基乙酸(poly lactic acid glycolic acid, PLGA)等可降解聚合物在生物医学领域的应用为制备蛋白缓释制剂提供了有效载体^[7]。PLGA 是由乳酸和羟基乙酸按照特定比例聚合生成的高分子材料,具有理想的生物相容性及可调节的溶胀性和生物降解性^[8],已通过美国 FDA 认证并应用于临床。因此该实验采用 PLGA 作为药物载体,运用复乳-溶剂挥发法制备 OPG-PLGA 微球,通过对微球相关性质的评价,确定最佳的制备工艺,为后续的试验及将来临床应用于拔牙位点保存术提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及仪器 OPG(以色列 Prospecc 公司); PLGA 共聚物(分子量 30 000, LA:GA=50:50, 济南岱罡生物工程有限公司); 聚乙烯醇(汕头西陇化工有限公司); 二氯甲烷(分析纯, 天津化学试剂有限公司); 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); J2-21 型高速离心机(美国 Beckman 公司); FDU-1100 型冷冻干燥机(日本 EYELA 公司); SHZ-88 型水浴恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂)。

1.2 方法

2017-06-02 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201303096)

作者单位: ¹ 郑州大学第一附属医院口腔种植科, 郑州 450052

² 四川大学华西口腔医院粘膜科, 成都 610041

作者简介: 刘华杰, 男, 硕士研究生;

吴豪阳, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: why67@zzu.edu.cn

lated, the activity of caspase-1 and the secretion of mature IL-1 β increased. Furthermore, the results of LDH release increased and AO/EB staining orange fluorescence increase indicated that the damage of macrophage cell membrane induced by oxLDL is significantly worse after 3-MA treatments. **Conclusion** Simvastatin inhibit the oxLDL-induced macrophages pyroptosis, which may be associated with enhanced oxLDL-induced macrophage autophagy.

Key words pyroptosis; simvastatin; oxLDL; autophagy