

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0893-03

• 实验研究 •

游离胆固醇激活未折叠蛋白反应诱导巨噬细胞凋亡

李方明^{1,2}, 郭毅^{1,2}, 孙圣刚¹, 唐冰杉², 姜昕², 李劲频¹, 王启章², 王玲², 张艳波², 黄术良²

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 湖北省武汉市 430022;

2. 暨南大学第二临床医学院神经内科, 广东省深圳市 518020)

[关键词] 内科学; 游离胆固醇; 未折叠蛋白反应; 巨噬细胞; 凋亡; 动脉粥样硬化; 内质网

[摘要] 目的 探讨游离胆固醇激活未折叠蛋白反应以及对巨噬细胞凋亡的影响。方法 取小鼠腹腔巨噬细胞进行培养, 然后分别以普通培养基、普通培养基加胆固醇乙酰转移酶抑制剂和乙酰低密度脂蛋白、普通培养基加胆固醇乙酰转移酶抑制剂和乙酰低密度脂蛋白再加胆固醇移动抑制剂分组孵育, Annexin V 和碘化丙锭双染色后流式细胞仪检测细胞凋亡, Western blot 检测下游转录因子 C/EBP 同源蛋白表达。结果 普通培养基孵育的巨噬细胞无 C/EBP 同源蛋白表达, 只有少量细胞凋亡; 而普通培养基加胆固醇乙酰转移酶抑制剂和乙酰低密度脂蛋白孵育的巨噬细胞 C/EBP 同源蛋白表达明显, 细胞凋亡也达到 21.83% ± 2.47%; 同时使用胆固醇移动抑制剂干预后, C/EBP 同源蛋白无表达, 而细胞凋亡比单纯促进游离胆固醇聚集状态孵育组显著减少。结论 过多的游离胆固醇聚集是诱导巨噬细胞凋亡的重要原因之一, 未折叠蛋白反应参与这一过程, 而特异性胆固醇移动抑制剂 U18666A 可以有效阻止游离胆固醇进入内质网激活未折叠蛋白反应诱导巨噬细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Free Cholesterol Loading of Macrophages Induces Apoptosis Involving the Unfolded Protein Response

LI Fang-Ming^{1,2}, GUO Yi^{1,2}, SUN Sheng-Gang¹, TANG Bing-Shan², JIANG Xin², LI Jinn-Pin¹, WANG Qi-Zhang^{1,2}, WANG Ling², ZHANG Yan-Bo², and HUANG Shu-Liang²

(1. Department of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022; 2. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Jinan University, Shenzhen 518020, China)

[KEY WORDS] Free Cholesterol; Unfolded Protein Response; Macrophage; Apoptosis; Atherosclerosis; Endoplasmic Reticulum

[ABSTRACT] **Aim** To explore the cellular mechanisms of free cholesterol (FC)-induced macrophage apoptosis by activating unfolded protein response (UPR). **Methods** Macrophages were harvested from the peritonea of female C57BL/6J mice, then incubated in DMEM and 1% fetal bovine serum (FBS) medium alone, or medium containing acetyl low density lipoprotein (acLDL) and compound 58035 (free cholesterol loading conditions), or medium containing acLDL and compound 58035 plus U18666A respectively. Western blot was used to determine expression of C/EBP homology protein (CHOP). The apoptosis percentages of macrophages were detected with flow cytometry (FCM) after the staining of Annexin V and propidium (PI).

Results Macrophages incubated in DMEM and 1% FBS alone had no expression of CHOP and showed very little evidence of cell apoptosis. After incubated with medium containing acLDL and compound 58035 in our cell culture model, the expression of CHOP increased notably and about 21.83% ± 2.47% apoptosis of the cells had been detected. But apoptosis was diminished markedly in free cholesterol loaded plus U18666A and also no CHOP expression had been detected. **Conclusions** Excess intracellular FC accumulation plays an important role in macrophage apoptosis, and UPR is involved in this process. But U18666A can block FC transport into endoplasmic reticulum (ER) to activate the CHOP and subsequent apoptosis.

高血脂症是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的独立危险因素, 当血液中胆固醇过多时, 巨噬细胞要吞噬脂肪粒并把它带出动脉壁, 而过多的游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 在细胞中的聚集是造成病灶

中巨噬细胞凋亡的主要因素之一^[1,2]。巨噬细胞凋亡对 As 斑块的发展、病灶的坏死、斑块的不稳定以及急性血管事件起着推动作用^[3]。目前已知的三条凋亡途径包括死亡受体途径、线粒体途径及内质网应激凋亡途径^[4,6]。其中, 内质网途径为最新发现的, 而对其研究还较少。我们以 C57BL/6J 雌性小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象, 在 FC 诱导下检测巨噬细胞凋亡、未折叠蛋白反应标志物下游转录因子 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homology protein, CHOP) 的表

[收稿日期] 2007-09-10 [修回日期] 2007-12-01

[基金项目] 广东省卫生厅资助项目 (WSTJJ20041028)

[作者简介] 李方明, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 Lifly050413@yahoo.com.cn。通讯作者郭毅, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 gzw2005@yahoo.com.cn。孙圣刚, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为帕金森病和脑血管病病金森。

达^[7], 并使用特异性胆固醇移动抑制剂 U18666A 干预来观察对细胞凋亡的影响。为研究应用阻断上述通路的药物来减少巨噬细胞凋亡, 提高斑块的稳定性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

Basal Medium Eagle (BME) 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 由 Invitrogen 公司提供; 鼠多克隆 GADD153/CHOP 抗体购于 Seajet Scientific 公司; BCA 蛋白测定试剂盒购买于江苏碧云天生物公司; Western blot 检测试剂盒 (包括 IgG 二抗) 购买于 Rockland 公司; 特异性胆固醇移动抑制剂 U18666A 由 Biomol 公司提供; 乙酰化低密度脂蛋白 (acetyl low density lipoprotein, ac-LDL) 和胆固醇乙酰转移酶抑制剂 58035 购于 Biovision 公司, 用 0.05% 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解配制成 10 g/L 的储液备用。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的收集

C57BL6/J 雌性小鼠 (购自广州中医药大学试验动物中心) 连续 3 天腹腔内注射刀豆素 A (0.5 mL PBS 中加 40 μ g 刀豆素 A) 刺激巨噬细胞产生, 分离腹腔巨噬细胞, 用含 1% FBS 的 DMEM 培养基常规培养巨噬细胞, 并进行鉴定。细胞亚汇合后进行分组, 分别使用原培养基、原培养基加入 100 mg/L 的 ac-LDL 及 10 mg/L 胆固醇乙酰转移酶抑制剂 58035 (促进 FC 聚集)^[4,5]、原培养基加入 100 mg/L ac-LDL 及 100 mg/L 胆固醇乙酰转移酶抑制剂 58035 及特异性胆固醇移动抑制剂 U18666A (70 nmol/L), 继续孵育并在不同时间点测细胞凋亡和 CHOP 表达。

1.3 细胞凋亡检测

巨噬细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI) 依据 Annexin-V-FITC 和碘化丙锭 (propidium, PI) 双标法经流式细胞仪检测。将经 PBS 液洗涤过的腹腔巨噬细胞制成细胞悬液, 分别加入 5 μ L Annexin-V 和 10 μ L PI, 室温避光 15 min, 然后加入 0.4 mL 10 \times Bending 缓冲液上流式细胞仪检测。在荧光显微镜下观察细胞形态并拍照, Annexin-V⁺/PI⁻ 细胞为凋亡细胞 (绿色荧光); Annexin-V⁺/PI⁺ 细胞为坏死细胞 (红色—橙色荧光); Annexin-V⁻/PI⁻ 为活细胞; 根据计算机显示的数据作为凋亡指数。

1.4 Western bolt 测 C/EBP 同源蛋白的表达

下游转录因子 CHOP, 是未折叠蛋白反应激活的标志物^[8], 其在内质网应激后 10~20 h 达高

峰^[6,8]。本研究分别选取 8、16 和 24 h 三个时间点检测其蛋白表达。收集细胞, 超声破碎, 常规提取蛋白质。Bradford 比色法测定蛋白质浓度。免疫印迹按试剂盒说明操作 (MaxTagTM Immunoblotting Kit, Rockland), 取等量蛋白 (100 μ g) 上样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳后转移蛋白于 PVDF 膜; 膜于含 1% BSA 的 TBST (20 mmol/L Tris, pH 7.5; 180 mmol/L NaCl; 1% Tween) 中室温下封闭 30 min, 加 TTBS 稀释的 GADD153/CHOP 多克隆抗体 (1:1000), 室温下 30 min; 用 TTBS 洗膜 5 min \times 3 次, 加 TTBS 稀释的 Streptavidin Peroxidase 标记二抗 (1:1000), 室温下 30 min, TTBS 洗膜 5 min \times 3 次, 加入 5 mL 刚配制的 DAB 溶液直到显色到最佳状态, 以上反应均在平板摇床上进行; 然后取出 PVDF 膜常温下凉干, 扫描仪扫入电脑, BandScan4.3 软件分析光密度, 与 β -actin 对比取比值。

1.5 统计学处理

数据应用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 12.0 统计软件进行统计学处理, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞凋亡

常规培养基孵育的巨噬细胞只有少量凋亡发生 (图 1A), 凋亡的巨噬细胞占 0.88% \pm 0.13%; 加入 ac-LDL 及胆固醇乙酰转移酶抑制剂 58035 孵育 10 h 后, 凋亡的巨噬细胞明显增加 (图 1B), 达到 21.83% \pm 2.47%; 而特异性胆固醇移动抑制剂 U18666A 干预的巨噬细胞凋亡细胞明显减少 (图 1C), 占 4.78% \pm 1.52% ($P < 0.01$)。

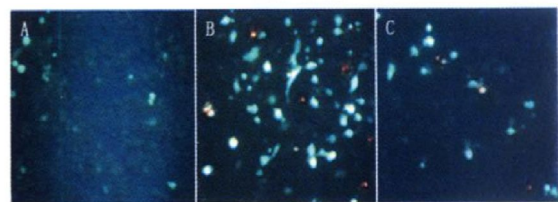


图 1. 荧光显微镜下观察巨噬细胞凋亡 ($\times 200$)

2.2 C/EBP 同源蛋白表达

常规培养基孵育的巨噬细胞中无 CHOP 表达; 而在 FC 刺激下, CHOP 表达在 8 h 明显升高 (20.83% \pm 2.90%), 16 h 达到高峰 (56.45% \pm 9.36%), 随后逐渐降低 (26.14% \pm 3.25%); 而使用 U18666A 干预后, 各时间点均未发现 CHOP 表达 (图 2)。

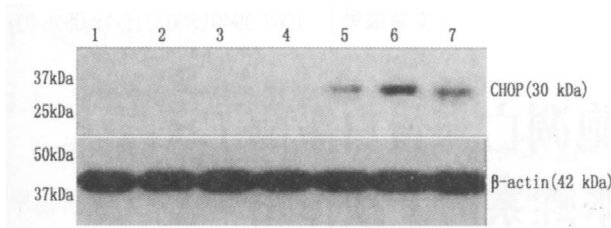


图 2. Western bolt 检测 C/EBP 同源蛋白表达 1 为普通培养基培养组, 2~ 4 分别为游离胆固醇刺激并使用 U18666A 干预 8、16 和 24 h; 5~ 7 分别为游离胆固醇刺激下培养 8、16 和 24 h。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)性血管疾病的发病机制迄今仍未完全阐明。在 As 发生过程中, 巨噬细胞源性泡沫细胞是构成粥样斑块内的重要成份^[2,3]。巨噬细胞源性泡沫细胞最终趋于死亡, 其死亡机制迄今不十分清楚。诱导巨噬细胞凋亡是使泡沫细胞趋于死亡的机制之一。研究表明, 过多的 FC 聚集是促使巨噬细胞凋亡的主要原因^[8]。

游离胆固醇(FC)诱导的巨噬细胞凋亡依赖于 FC 向内质网移动, 已证实 FC 向巨噬细胞内质网聚集可引发内质网应激, 导致内质网驻留跨膜蛋白激酶磷酸化, 激活未折叠蛋白反应, 进而激活下游转录因子 CHOP^[6,9], 而下游转录因子 CHOP 是未折叠蛋白反应激活的标志物^[8]。未折叠蛋白反应是指当内质网中未折叠或错误折叠的蛋白增多时, 应激信号能通过内质网膜传递到细胞核中, 继而引起一系列特定的靶基因转录上调和蛋白质翻译水平下调^[10,11]。由于内质网膜的胆固醇含量极低, 内质网对 FC 的异常增多极为敏感。本实验结果表明 FC 的聚集可上调 CHOP 的表达。CHOP 一方面诱导促进内质网功能恢复的基因表达, 另一方面, 当应激过重时, CHOP 将诱导细胞凋亡^[12,13]。Zinszner 等^[7]研究发现 CHOP 基因缺损鼠的肾小管上皮细胞对衣霉素的作用表现出细胞凋亡反应降低, 说明 CHOP 基因在诱导与内质网功能异常有关的细胞凋亡具有决定作用。Oyadomari 等^[14]指出胰腺 β 细胞内质网的过度负荷亦可引起内质网应激, 同时通过诱导 CHOP 蛋白表达导致胰腺 β 细胞凋亡, 而内质网内 CHOP 蛋白诱导表达的抑制或者内质网伴侣蛋白表达的增加能阻止糖尿病的发生。本实验表明, 随着 CHOP 表达的上调, 巨噬细胞的凋亡也显著增加。证实 As 过程中, 过多 FC 聚集引起内质网应激, 激活未折叠蛋白反应对巨噬细胞的凋亡起关键作用。

U18666A 是近年来发现的特异性胆固醇移动抑制剂, 它在低剂量就能有效阻止胆固醇进入内质

网^[15,16]。我们通过实验发现, 在促进 FC 聚集条件下使用 70 nmol/L 的 U18666A 干预后, 与常规培养基孵育的巨噬细胞相似, 未发现 CHOP 表达; 而巨噬细胞的凋亡虽比在促进 FC 聚集条件下明显减少, 但仍显著高于常规培养基孵育组。这说明 U18666A 可几乎完全阻止 FC 进入内质网, 激活未折叠蛋白反应, 但不能完全保护细胞。据此我们推测, 内质网途径是 FC 诱导巨噬细胞凋亡的主要途径, 但不是唯一途径。U18666A 在保护 FC 诱导巨噬细胞凋亡的特殊效果使其有望作为一种治疗 As 的新药而进入临床, 但是还需要更多的在体试验研究。

[参考文献]

- [1] Feng B, Zhang D, Kuriakose G, Devlin CM, Kockx M, Tabas I. Niemann Pick C heterozygosity confers resistance to lesion necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 423-428.
- [2] 黎健. 血脂异常导致血管内皮细胞的氧化损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 524.
- [3] 吴歆华, 张华, 吴宗贵. 巨噬细胞与动脉粥样硬化[J]. *心血管病学进展*, 2005, **26** (3): 302-306.
- [4] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (31): 23 807-813.
- [5] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (45): 42 468-476.
- [6] Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 781-792.
- [7] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum [J]. *Genes Dev*, 1998, **12** (7): 982-995.
- [8] Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, et al. Cholesterol induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor [J]. *J Cell Biol*, 2005, **171**: 61-73.
- [9] Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum [J]. *J Cell Sci*, 2000, **113** (21): 3 697-702.
- [10] Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (50): 49 047-054.
- [11] Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, et al. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C elegans development [J]. *Cell*, 2001, **107** (7): 893-903.
- [12] Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, et al. Nitric oxide induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (19): 10 845-850.
- [13] Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78 [J]. *FEBS Lett*, 2002, **514** (2-3): 122-128.
- [14] Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, et al. Targeted disruption of the CHOP gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2002, **109** (4): 525-532.
- [15] Leventhal AR, Leslie CC, Tabas I. Suppression of macrophage eicosanoid synthesis by atherogenic lipoproteins is profoundly affected by cholesterol-fatty acyl esterification and the Niemann-Pick C pathway of lipid trafficking [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (9): 8 084-092.
- [16] Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages: mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (45): 43 271-280.

(此文编辑 许雪梅)