

[文章编号] 1007-3949(2011)19-01-0029-05

• 实验研究 •

PCSK9-siRNA在抗 ox-LDL诱导的 THP-1源性巨噬细胞凋亡中对 Bax、Bcl-2表达的影响

唐志晗, 武春艳, 任重, 刘录山, 姜志胜

(1. 南华大学心血管病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 枯草溶菌素转换酶 9 巨噬细胞; 细胞凋亡; Bax/Bcl-2

[摘要] 目的 研究 PCSK9 siRNA 在抗 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡中对 Bax、Bcl-2 表达的影响。方法 用不同浓度 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间, 免疫印迹法检测 Bax、Bcl-2 表达变化。应用 Lipofectamine 2000 分别转染 30、50 nmol/L 和 80 nmol/L PCSK9 siRNA 进入 THP-1 源性巨噬细胞中, 作用 24 h 后加入 ox-LDL 处理 48 h, 免疫印迹法分析细胞 Bax、Bcl-2 表达, Hoechst 33258 染色观察形态评价细胞凋亡。结果 随着 ox-LDL 浓度的增加, Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白表达下调, 呈浓度依赖性, 80 μ g/mL ox-LDL 处理组作用最为明显; 80 μ g/mL ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间后, Bax 蛋白表达上调, 而 Bcl-2 蛋白表达下调, 呈时间依赖性, 48 h 处理组作用最为明显; PCSK9 siRNA 能明显下调 Bax 蛋白表达, 上调 Bcl-2 蛋白表达, 且均呈浓度依赖性; Hoechst 33258 染色显示, PCSK9 siRNA 转染组细胞凋亡明显减少。结论 PCSK9 siRNA 在抗 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡中下调促凋亡蛋白 Bax 表达, 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of PCSK9 siRNA on Bax, Bcl-2 Expression in THP-1 Derived Macrophages Apoptosis Induced by ox-LDL

TANG ZhiHan, WU ChunYan, REN Zhong, LIU Lu-Shan, and JIANG ZhiSheng

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin Type 9 Macrophages Cell Apoptosis Bax/Bcl-2

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of PCSK9 siRNA on Bax, Bcl-2 expression in THP-1 derived macrophages apoptosis induced by ox-LDL. **Methods** Cells were incubated with varied concentrations of ox-LDL for different time.

Western blot were conducted to detect the expression of Bax and Bcl-2. The siRNAs for PCSK9 were designed and synthesized, then THP-1 macrophages were transfected with PCSK9 siRNA (30, 50, 80 nmol/L) for 24 h and then a high level of ox-LDL (80 μ g/mL) for an additional 48-hr. Bax, Bcl-2 protein levels were measured by Western blot and apoptosis was measured with Hoechst 33258 staining. **Results** ox-LDL (20, 40, 60, 80 μ g/mL) increased Bax expression in a dose-dependent manner, but inversely decreased Bcl-2 expression. Furthermore, 80 μ g/mL ox-LDL increased Bax expression in a time-dependent manner, but inversely decreased Bcl-2 expression. However, PCSK9 siRNA attenuated ox-LDL-induced up-regulation of Bax, down-regulation of Bcl-2, and THP-1 cell apoptosis in a dose-dependent manner.

Conclusion The effect of PCSK9-siRNA against ox-LDL-induced THP-1 cell apoptosis is associated with down-regulating of Bax and up-regulating of Bcl-2.

[收稿日期] 2010-10-05

[基金项目] 湖南省应用基础研究计划重点项目 (2008FJ2006), 湖南省科技厅计划项目 (2009TP4057-2, 2010TP4008-2), 湖南省教育厅重点科研项目 (10A105) 及湖南省高校科技创新团队支持计划资助项目。

[作者简介] 唐志晗, 硕士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 tangzhihan98@yahoo.com.cn。武春艳, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治。通讯作者刘录山, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 liuls2000@163.com。通讯作者姜志胜, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导细胞凋亡是动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 发生发展的重要机制, 深入研究 ox-LDL 诱导细胞凋亡的机制具有重要的意义。前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin / kexin type 9 PCSK9) 是新发现的一个与血液胆固醇代谢调节相关的基因, PCSK9 编码神经细胞凋亡调节转化酶 1 蛋白 (neural apoptosis regulated convertase 1, NARC-1), 该基因属于蛋白转化酶家族^[1]。目前也有研究发现 PCSK9 可能与神经细胞凋亡相关^[2]。本课题组的前期研究工作发现, PCSK9 在 THP-1 源性巨噬细胞中有表达, 应用 RNA 干扰技术抑制 PCSK9 表达能明显抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡^[3], 结果表明巨噬细胞的凋亡与 PCSK9 可能存在某种相关性, 但 PCSK9 影响巨噬细胞凋亡的分子机制尚不清楚。为此, 本研究以 THP-1 源性巨噬细胞为研究对象, 运用 RNA 干扰技术将 PCSK9 基因沉默, 观察其对凋亡调节蛋白 Bax/Bcl-2 的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

THP-1 细胞购自中科院上海细胞生物所细胞中心; RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品; Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂购自广州英韦创津公司; siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成; Bcl-2 和 Bax 抗体购自博士德生物公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国联科生物公司; Hoechst33258 荧光染色试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 低密度脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。按照以前的方法制备低密度脂蛋白, 用超速离心法制备 LDL (密度为 $1.019 \sim 1.063 \times 10^3$ g/L), 用 $10 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白, 采用 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定修饰程度, 过滤除菌, 4°C 保存备用。

1.3 细胞培养

THP-1 细胞用含有 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液, 在 37°C , 5% CO_2 培养箱中静置培养。培养基中加 HEPES 10 mmol/L , 在每次实验前用 160 mmol/L 佛波酯孵育 24 h 使其诱导分化成巨噬细胞。

1.4 Western blotting

各实验组实验终点时收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入悬浮细胞裂解液裂解细胞, 置于冰上 20 min 后, 于 4°C , $10\,000 \text{ g}$ 离心 10 min 小心吸出上清液, 用

BCA 法进行蛋白质定量, 取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质泳道加入等体积 $5 \times \text{SDS}$ 凝胶加样缓冲液, 煮沸使蛋白变性。 80 V 积层胶, 120 V 分离胶, 电泳分离蛋白质, 80 mA 1 h 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶 4°C 封闭 12 h 加入一抗, 4°C 8 h TBST 洗膜 15 min 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h TBST 洗膜 15 min 然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光, 显示于 X 光片, 显影, 定影后进行图像分析。

1.5 PCSK9 siRNA 设计制备及转染细胞

在 GenBank 中查到人 PCSK9 mRNA 序列 (编号 NM-174936), 并设计 PCSK9 siRNA, 其序列经序列相似性软件比对不与任何已知基因有同源性, PCSK9 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司合成并进行荧光标记, PCSK9 siRNA 正义链: $5' \text{---} \text{GGCAGAGACUGAUCCACUU dTdT} \text{---} 3'$, 反义链: $3' \text{---} \text{dTdT CCGUCUCUGACUAGGUGAA} \text{---} 5'$; 阴性对照 siRNA 由该公司提供。siRNA 成品为已退火的冻干粉, 使用前用稀释缓冲液将其溶解成 $20 \mu\text{mol/L}$ 的工作母液。所有 siRNA 均经过变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 去除未配对单链。

参照文献 [3] 方法及 PCSK9 siRNAs 有效浓度筛选结果, 应用 Lipofectamine 2000 分别转染 30、50 nmol/L 和 80 nmol/L 浓度 PCSK9 siRNAs 进 THP-1 源性巨噬细胞中。

1.6 Hoechst33258 染色

THP-1 源性巨噬细胞在每次实验前换无血清培养基培养 12 h 后, 将细胞接种于 6 孔板内, 各实验组按要求给以不同处理因素作用一定时间后, 加入固定液于 4°C 固定细胞 10 min 去除固定液, 用 PBS 冲洗两遍, Hoechst33258 染色液染色 10 min 水冲净晾干, 以紫外光 340 nm 波长激发, 荧光显微镜下观察, 摄片。在凋亡细胞中, 细胞膜对 Hoechst33258 的通透性增高, 并且由于染色体高度浓缩, Hoechst33258 与之结合增强, 染色呈强蓝色荧光, 而正常细胞只呈微弱荧光, 死细胞则不被染色, 由此可检测出细胞凋亡。

1.7 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 15.0 进行统计处理, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞中凋亡调节蛋白 Bax, Bcl-2 表达的影响

分别用 0、20、40、60 $\mu\text{g/mL}$ 和 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-

LDL处理 THP-1 源性巨噬细胞 48 h 蛋白表达结果显示促凋亡蛋白 Bax 表达呈浓度依赖性上调 (图 1 A), 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达呈浓度依赖性下调 (图 1B), Bax/Bcl-2 蛋白比值则呈浓度依赖性上调 (图 1C), 以 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组效果最为明显, 选此浓度作为后续实验的有效剂量。

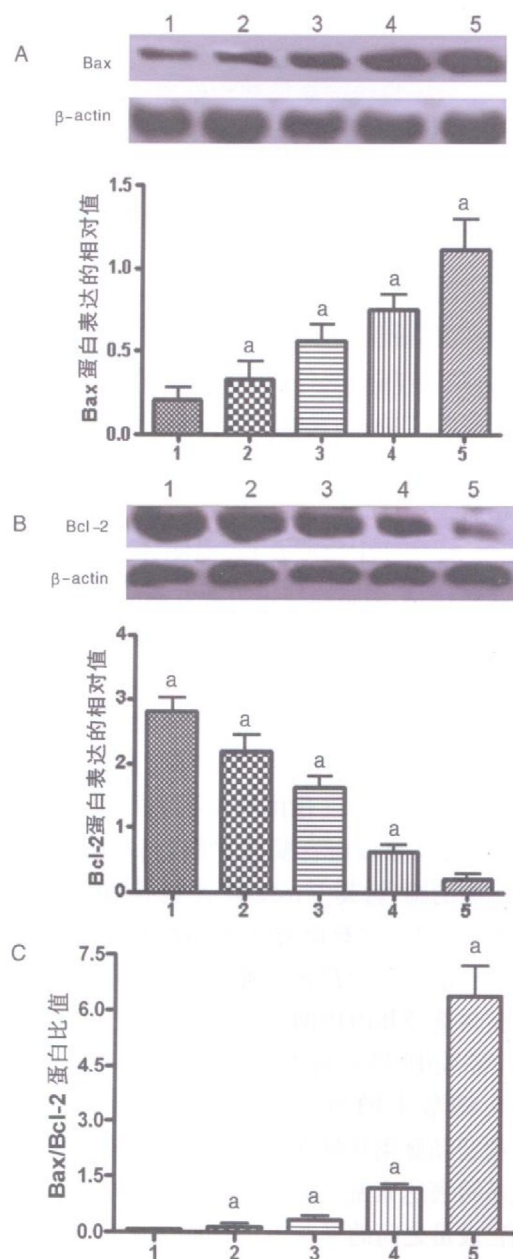


图 1 不同浓度 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 20 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组, 3 为 40 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组, 4 为 60 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组, 5 为 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组; a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比, $n = 3$ 。

Figure 1 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in THP-1-derived macrophages treated with varied concentrations of ox-LDL

用 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞

0, 6, 12, 24, 48 h Western blot 检测蛋白表达结果显示 Bax 蛋白表达呈时间依赖性上调 (图 2 A), 而 Bcl-2 蛋白表达呈时间依赖性下调 (图 2 B), Bax/Bcl-2 蛋白比值呈浓度依赖性上调 (图 2 C), 以 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 48 h 效果最为明显, 因此选此时间点用于后续实验。

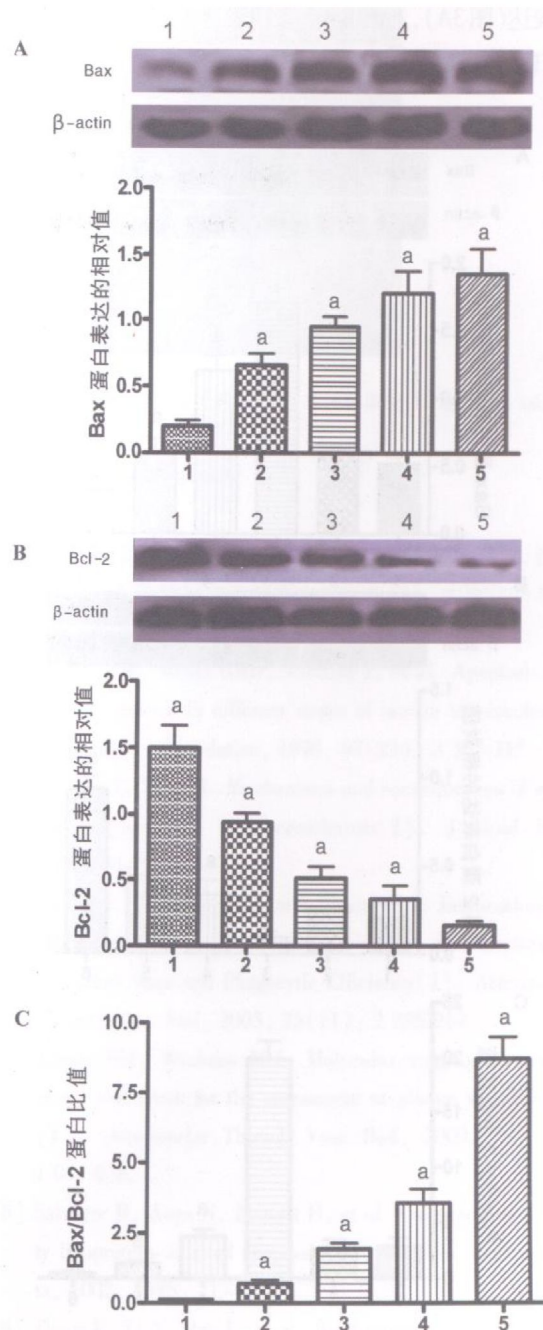


图 2 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 1 为空白对照组, 2 为 6 h 处理组, 3 为 12 h 处理组, 4 为 24 h 处理组, 5 为 48 h 处理组, a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比, $n = 3$ 。

Figure 2 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in THP-1-derived macrophages treated with 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL at different times

2.2 PCSK9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

用 30、50 nmol/L 和 80 nmol/L 浓度 PCSK9 sRNA 转染进 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, 再加入 80 μ g/mL ox-LDL 处理 48 h 检测其对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。Western blot 结果显示 PCSK9 sRNA 能明显下调 Bax 蛋白表达 (图 3A), 上调 Bcl-2 蛋白表达 (图 3B), Bax/Bcl-2 蛋白比值也逐渐减少 (图 3C), 且均呈浓度依赖性。

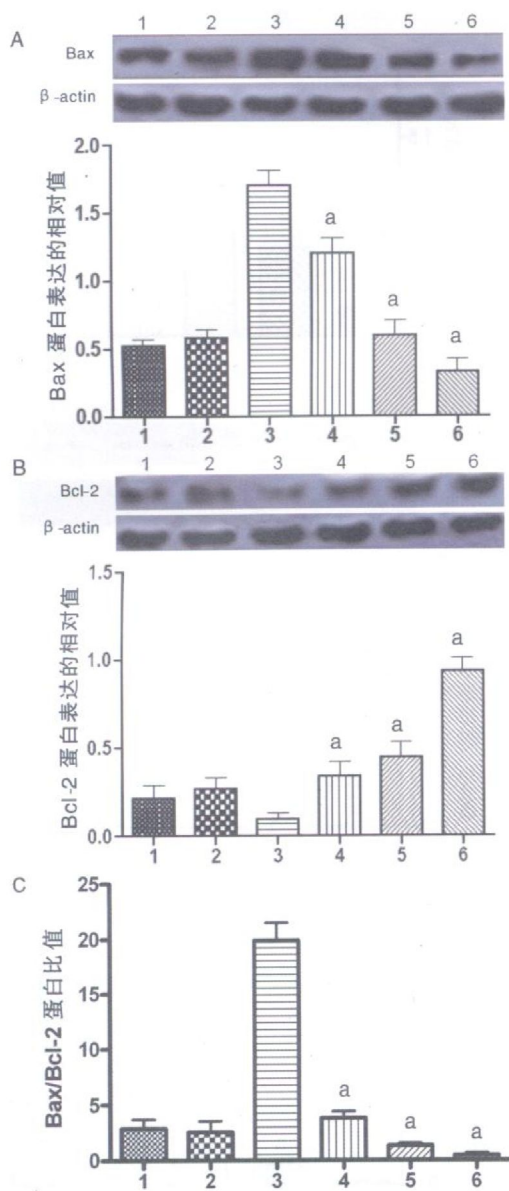


图 3 不同浓度 PCSK9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 1 为空白对照组, 2 为单独转染组, 3 为 80 μ g/mL ox-LDL 处理组, 4 为 30 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 μ g/mL ox-LDL 处理组, 5 为 50 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 μ g/mL ox-LDL 处理组, 6 为 80 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 μ g/mL ox-LDL 处理组; a 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 处理组相比, $n = 3$ 。

Figure 3 Effect of PCSK9 sRNA on Bax Bcl-2 expression in THP-1 derived macrophages apoptosis induced by ox-LDL

2.3 PCSK9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响

设置空白对照组 (未加 ox-LDL), 单独转染组 (未加 ox-LDL), 80 μ g/mL ox-LDL 处理组, 80 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 μ g/mL ox-LDL 处理组, 作用 48 h 后, 采用 Hoechst33258 染色, 荧光显微镜观察细胞核形态, 结果如图 4 所示, 与空白对照组相比, 80 μ g/mL ox-LDL 处理组出现细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞, 凋亡形态较明显, 而转染 80 nmol/L PCSK9 sRNA 后再用 80 μ g/mL ox-LDL 处理组凋亡则不明显。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种与细胞凋亡密切相关的病理过程, 在 As 病变的各个时期都存在细胞凋亡^[4]。巨噬细胞凋亡是 As 发生中最重要的机制之一^[5,6]。大量研究发现: 在 As 病变晚期阶段, 大量的巨噬细胞凋亡后, 一方面释放细胞内脂质进入坏死脂质核心, 促进 As 病变中脂质蓄积, 促使 As 病变的进展; 另一方面, 凋亡细胞碎片得不到有效清除, 从而通过所谓的凋亡后巨噬细胞坏死激发炎症反应, 促使临近细胞的进一步损伤, 促使斑块进展, 最终导致斑块破裂, 并释放大量的组织因子, 导致斑块破裂后血栓的形成, 临床上出现急性冠状动脉综合征的表现^[5-7]。

诸多动脉粥样硬化的危险因素 (如 ox-LDL、感染等) 都可以导致血管壁内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞的凋亡, 其中 ox-LDL 是诱导细胞凋亡的最主要因素^[5,8]。已有研究证实, ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡途径至少存在 3 种^[5,8]: 线粒体凋亡途径, 死亡受体途径和内质网应激介导的细胞凋亡途径。而 Bcl 家族中, 既有抗凋亡基因, 也有促凋亡基因, 是凋亡调节中的另外的一个重要因素, Salvayre 等^[8]报道动脉粥样硬化斑块中 ox-LDL 可诱发凋亡相关基因表达紊乱, 通过促使 Bcl-2 家族促凋亡和抗凋亡成员之间的平衡点向细胞凋亡方向移位, 从而导致凋亡失衡。Edward 等^[9]也发现 Bcl-2 在 As 病变晚期斑块中明显抑制巨噬细胞的凋亡, 对斑块稳定性起保护作用。

前期研究已证实 PCSK9 sRNA 可抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡, 其是否是通过直接影响凋亡相关基因表达而调节 ox-LDL 诱导的细胞凋亡呢? 本实验采用不同浓度的 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞凋亡, 发现随着 ox-LDL 处理浓度的增加, Bax 蛋白质表达上调, Bcl-2 蛋白质表达下调, Bax/Bcl-2

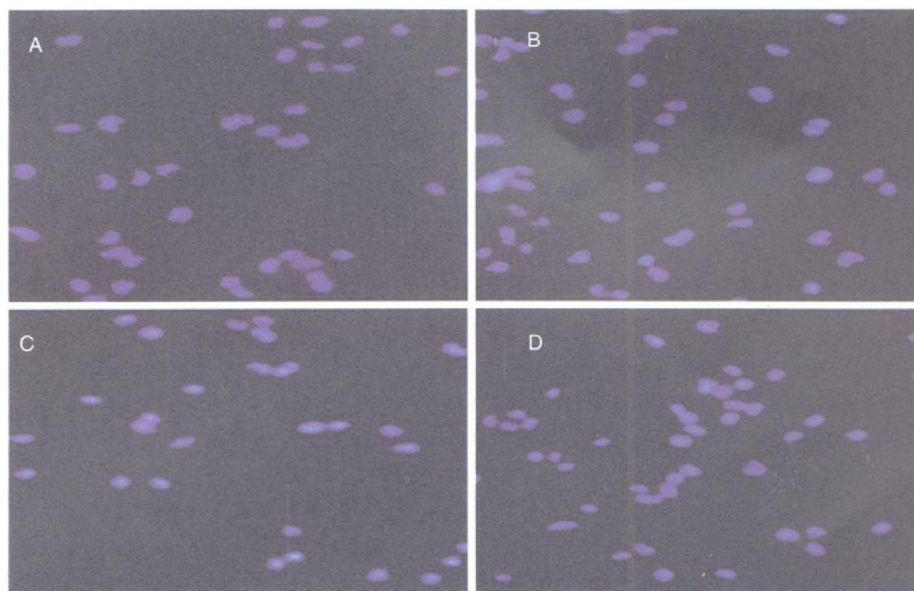


图 4 PCSK9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响 A 为空白对照组, B 为单独转染组, C 为 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组, D 为 80 nmol/L PCSK9 sRNA + 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理组。

Figure 4 Effect of PCSK9 sRNA on ox-LDL-induced THP-1-derived macrophage apoptosis

蛋白比值也呈浓度依赖性上调。本次实验选取 80 $\mu\text{g/mL}$ ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间, 发现 Bax 蛋白质的表达呈时间依赖性上调, 而 Bcl-2 蛋白质表达呈时间依赖性下调, Bax/Bcl-2 蛋白比值呈浓度依赖性上调。而用不同浓度的 PCSK9sRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞后, 可以抑制这种效果, 发现 PCSK9sRNA 呈浓度依赖性下调 Bax 蛋白质的表达, 上调 Bcl-2 蛋白质表达, 同时 Bax/Bcl-2 蛋白比值呈浓度依赖性下调。Hoechst33258 染色结果也显示 PCSK9sRNA 转染组凋亡细胞较 ox-LDL 处理组明显减少。以上结果提示 PCSK9 是 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡的重要正向调节基因, 抑制 PCSK9 表达可以抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡, 其机制与下调促凋亡蛋白 Bax 表达, 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达有关。

参考文献

- [1] Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(3): 928-933.
- [2] Bingham B, Shen R, Kotnis S, et al. Proapoptotic effects of NARC 1 (= pcsk9), the gene encoding a novel serine proteinase [J]. *Cytometry A*, 2006, 69(11): 1123-131.
- [3] 刘录山, 谢 闯, 姜志胜, 等. pcsk9 sRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(3): 323-330.
- [4] Kockx MM, Meyer GRD, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques [J]. *Circulation*, 1998, 97(23): 2307-315.
- [5] Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: S382-387.
- [6] 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): 2255-264.
- [7] Laufer EM, Winkens MH. Molecular imaging of macrophage cell death for the assessment of plaque vulnerability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1031-038.
- [8] Salvayre R, Auge N, Benoist H, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585: 213-221.
- [9] Thorp E, Li Y, Bao L, et al. Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice lacking macrophage Bcl-2 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2): 169-172.

(此文编辑 李小玲)