

枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达

唐志晗, 江璐, 任重, 刘录山, 姜志胜

(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, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 枯草溶菌素转换酶 9; 巨噬细胞; 炎症因子

[摘要] 目的 观察枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达的影响。方法 应用 Lipofectamine 2000 分别转染 80 nmol/L 浓度枯草溶菌素转换酶 9 siRNAs 进 THP-1 源性巨噬细胞中, 作用 24 h 后加入 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理 24 h, 采用逆转录聚合酶链反应检测白细胞介素 1 α 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达。结果 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白刺激 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, 白细胞介素 1 α 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$), 而枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 转染组 THP-1 源性巨噬细胞白细胞介素 1 α 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α mRNA 的表达相对于氧化型低密度脂蛋白组明显降低 ($P < 0.05$)。结论 枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 能够抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达, 枯草溶菌素转换酶 9 可能参与了炎症反应的调节。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 siRNA Repressed Inflammation Factor Expression of THP-1 Macrophage Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

TANG Zhi-Han, JIANG Lu, REN Zhong, LIU Lu-Shan, and JIANG Zhi-Sheng

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

[KEY WORDS] Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9; Macrophage; Inflammation Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) siRNA on inflammatory factor expression in oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced THP-1 macrophage cells. **Methods** The siRNAs for PCSK9 were designed and synthesized, then THP-1 macrophages were transfected with 80 nmol/L PCSK9 siRNA by positive ion liposome Lipofectamine 2000 for 24 h and then a high level of ox-LDL (80 mg/L) for an additional 24 h. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to detect interleukin-1 α (IL-1 α) mRNA, interleukin-6 (IL-6) mRNA and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA. **Results** Ox-LDL increased IL-1 α mRNA, IL-6 mRNA and TNF- α mRNA expression. The expression of IL-1 α mRNA, IL-6 mRNA and TNF- α mRNA in the macrophage pretreated with PCSK9 siRNA was decreased significantly, in comparison with ox-LDL-treated group ($P < 0.05$). **Conclusion** PCSK9 siRNA can repress inflammation factor expression of THP-1 macrophage cells induced by ox-LDL. PCSK9 may be involved in adjustment for inflammation.

近年来,大量的研究表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病。动脉粥样硬化病变中不仅还有大量的脂质,而且大量的炎

症细胞浸润,并以单核/巨噬细胞和淋巴细胞的集聚为特征。动脉粥样硬化发生、发展中,这些炎症细胞可分泌大量的炎症因子,参与调节细胞的增殖或凋

[收稿日期] 2011-03-18

[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

[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。通讯作者刘录山,博士,硕士研究生导师,教授, E-mail 为 liuls2000@163.com。姜志胜,博士,博士研究生导师,教授,研究方向为动脉粥样硬化发病机制与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

亡、细胞外基质的合成或降解以及血管的重塑等过程^[1]。枯草溶菌素转换酶 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, PCSK9) 是 2003 年应用生物信息学方法和 DNA 微阵列技术发现的一个与血液胆固醇代谢调节相关的基因,除在胆固醇代谢方面起作用外,PCSK9 还与细胞凋亡和分化再生相关^[2]。我们前期研究发现 PCSK9 在兔主动脉粥样硬化斑块以及 THP-1 源性巨噬细胞中有表达^[3,4],并合成筛选了有效的 PCSK9 siRNA^[5]。但 PCSK9 在动脉粥样硬化中究竟扮演何种角色尚不清楚。本研究旨在观察 PCSK9 siRNA 对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达的影响,为阐明 PCSK9 在动脉粥样硬化中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

THP-1 细胞购自中国科学院上海细胞生物所细胞中心;RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品;ox-LDL 购自广州中山大学;Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂购自广州英韦创津公司;siRNA 由广州市锐博生物科技有限公司合成;Trizol 试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司;逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司;白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 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% CO₂ 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 nmol/L 佛波酯孵育 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞。

1.3 枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 设计制备及转染细胞

参照我们以前方法^[5],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'-GGCAGAGACUGAUCCACUU dTdT -3',反义链:3'-dTdT CCGUCUCUGACUAGGUGAA-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 μ 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。根据我们前期筛选的有效浓度^[5],应用 Lipofectamine 2000 转染 80 nmol/L 浓度 PCSK9 siRNAs 进 THP-1 源性巨噬细胞中。

1.4 荧光显微镜检测 siRNA 的转染效率

在转染 FAM-siRNA 6 h 后,先用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗涤细胞 1 ~ 2 次,洗脱残留在培养基或细胞表面的 FAM-siRNA,减少背景干扰。荧光显微镜观察,成功转染的细胞可看到 FAM 绿色荧光散在分布于细胞质中。

1.5 逆转录-聚合酶链反应分析白细胞介素 1、白细胞介素 6 及肿瘤坏死因子 α 表达

根据我们前期 PCSK9 siRNA 有效浓度筛选结果^[5],选取 80 nmol/L 浓度 PCSK9 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后,ox-LDL 处理 24 h。设置空白对照组 (未加 ox-LDL),阴性转染组 (未加 ox-LDL),80 mg/L ox-LDL 处理组,80 nmol/L siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组。按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录成 cDNA,再进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 循环扩增。IL-1 α 的引物序列:上游 5'-AGTAGCAACCAACGGGAA-3',下游 5'-CATCTTGGGCAGTCACATA-3',PCR 扩增产物长度为 374 bp。IL-6 的引物序列:上游 5'-ACATTGCCGAAGAGCC-3',下游 5'-GTAGTGAG-GAACAAG-CCAGAG-3',PCR 扩增产物长度为 234 bp。TNF- α 的引物序列:上游 5'-CTGCCTGCTG-CACTTTGGAG-3',下游 5'-TGGTAGGAGACGGCGA-TGC-3',PCR 扩增产物长度为 348 bp。磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的引物序列:上游 5'-CAAGGTCATCCAT-GACAACTTTG-3',下游 5'-GTCCACCACCCTGTTGC-TGTAG-3',PCR 扩增产物长度为 496 bp。取逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳中电泳,反应产物加样量均为 10 μ L,内参的加样量为 2 μ L,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析,以各组的基因与内参照基因吸光度的比值来比较待测基因的 mRNA 表达差异。

1.6 统计学处理

实验所得数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS 15.0 进行统计处理,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 判定有无统计学意义。

2 结果

2.1 荧光标记的 siRNA 转染结果鉴定

在转染荧光标记的 siRNA (FAM-siRNA) 6 h 后用荧光显微镜检测, 与同一视野下光学显微镜观察结果 (图片 1A) 对照, 荧光显微镜下可见发绿色荧光的细胞 (图 1B), 表示 siRNA 已成功转染入细胞内, 有较高的转染效率。

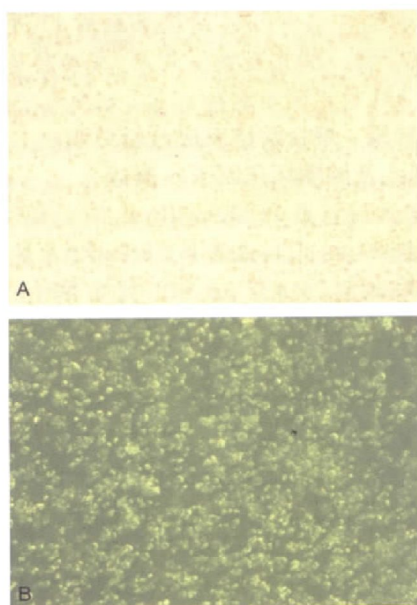


图 1. THP-1 源性巨噬细胞转染 FAM-siRNA 6 h 后同一视野镜下观察 ($\times 100$) A 为光学显微镜观察结果, B 为荧光显微镜观察结果。

Figure 1. THP-1 macrophages transfected with FAM-siRNA 6 h through immunofluorescence assay ($\times 100$)

2.2 枯草溶菌素转氨酶 9 siRNA 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞白细胞介素 1 α mRNA 表达的影响

逆转录-聚合酶链反应结果显示, 80 mg/L ox-LDL 处理组 IL-1 α mRNA 表达与对照组相比明显增加 ($P < 0.05$), 而 80 nmol/L PCSK9 siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组 IL-1 α mRNA 表达无明显增加, 但与 80 mg/L ox-LDL 处理组相比, 明显减少, 有显著性差异 ($P < 0.05$; 图 2)。

2.3 枯草溶菌素转氨酶 9 siRNA 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 IL-6 mRNA 表达的影响

80 mg/L ox-LDL 刺激 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, IL-6 mRNA 表达明显上调, 而 80 nmol/L PC-

SK9 siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组与 80 mg/L ox-LDL 处理组相比, IL-6 mRNA 表达明显减少, 有显著性差异 ($P < 0.05$; 图 3)。

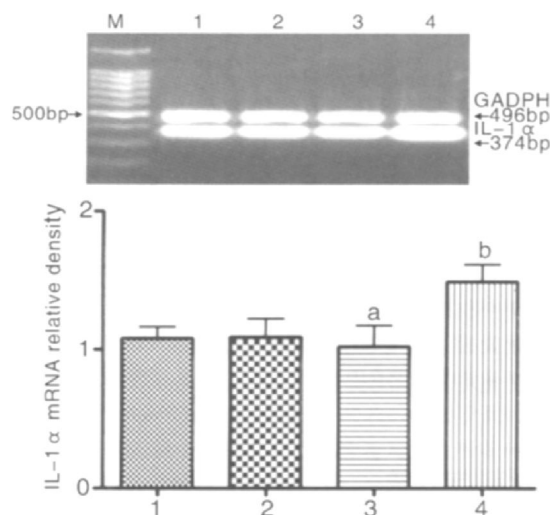


图 2. PCSK9 siRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 IL-1 α mRNA 表达的影响 1 为空白对照组 (未加 ox-LDL), 2 为阴性对照组 (未加 ox-LDL), 3 为 80 nmol/L siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组, 4 为 80 mg/L ox-LDL 处理组。a 为 $P < 0.05$, 3 与 4 相比; b 为 $P < 0.05$, 4 与 1 相比, $n = 3$ 。

Figure 2. Effects of PCSK9 siRNA on IL-1 α mRNA in THP-1 macrophages induced by ox-LDL

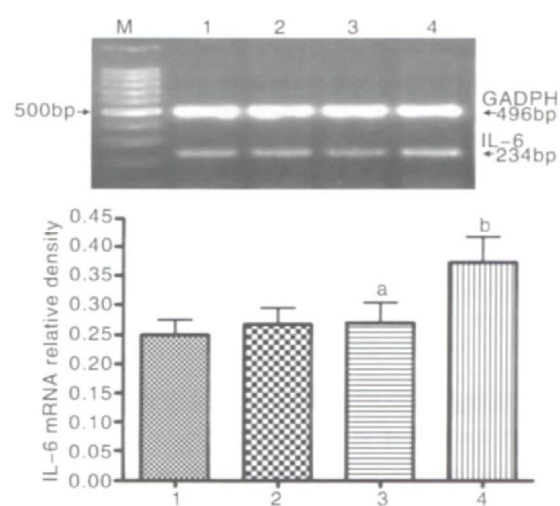


图 3. PCSK9 siRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 IL-6 mRNA 表达的影响 1 为空白对照组 (未加 ox-LDL), 2 为阴性对照组 (未加 ox-LDL), 3 为 80 nmol/L siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组, 4 为 80 mg/L ox-LDL 处理组。a 为 $P < 0.05$, 3 与 4 相比; b 为 $P < 0.05$, 4 与 1 相比, $n = 3$ 。

Figure 3. Effects of PCSK9 siRNA on IL-6 mRNA in THP-1 macrophages induced by ox-LDL

2.4 枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞肿瘤坏死因子 α mRNA 表达的影响

正常情况下,巨噬细胞低水平表达 TNF- α 。80 mg/L ox-LDL 刺激 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, TNF- α mRNA 表达增加。而 80 nmol/L PCSK9 siRNA 能抑制 ox-LDL 诱导的 TNF- α mRNA 表达 ($P < 0.05$; 图 4)。

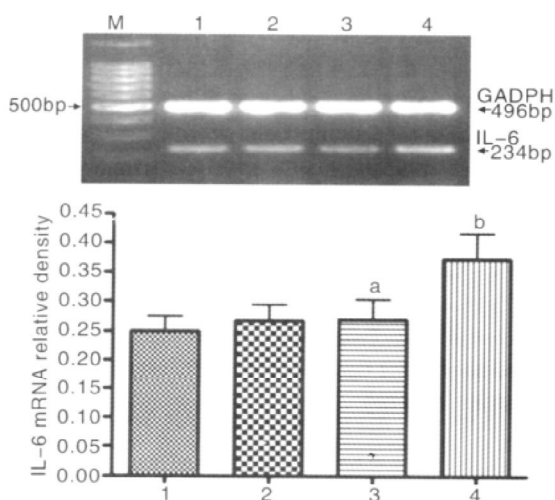


图 4. PCSK9 siRNA 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α mRNA 表达的影响 1 为空白对照组 (未加 ox-LDL), 2 为阴性对照组 (未加 ox-LDL), 3 为 80 nmol/L siRNA + 80 mg/L ox-LDL 处理组, 4 为 80 mg/L ox-LDL 处理组。a 为 $P < 0.05$, 3 与 4 相比; b 为 $P < 0.05$, 4 与 1 相比, $n = 3$ 。

Figure 4. Effects of PCSK9 siRNA on TNF- α mRNA in THP-1 macrophages induced by ox-LDL

3 讨论

目前对 PCSK9 生物学功能的研究主要集中在 PCSK9 对肝细胞脂质代谢的调节^[6], PCSK9 通过靶向作用低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 溶酶体降解途径, 在蛋白质水平降解 LDLR, 影响血脂水平, 但其确切机制仍在研究中^[6,7]。近几年发现, 除 LDLR 外, 极低密度脂蛋白受体 (very low density lipoprotein receptor, VLDLR) 和载脂蛋白 E 受体 2 (apolipoprotein E receptor 2, ApoER2) 也是 PCSK9 的底物^[8]。然而, PCSK9 的脂质代谢调节作用不足以解释其所有的生物学效应, PCSK9 作为一种分泌的前蛋白转化酶应该还具有其他的一些生物学功能。

2010 年 Lan H 等^[9] 通过基因微阵列分析研究

证实 PCSK9 除影响脂质代谢调节通路之外, 还发现一些新的途径可能受 PCSK9 的调节, 这些途径包括蛋白泛素化、细胞周期、炎症和应激反应。其中一些与炎症相关的基因表达如 IL-17B、LCK、TNFR Superfamily, Member 3 及 MKK6 等处于 PCSK9 基因的下游调控之列。功能获得型突变 D374Y-PCSK9 基因分析也表明 PCSK9 调节 LDL 时出现某些特殊炎症反应, 可能与 p38MAPK 信号通路有关^[10]。Feingold^[11] 将内毒素注射入小鼠体内, 刺激炎症反应的发生, 发现 LDLR 水平下降, 但是相应的 PCSK9 mRNA 水平却没有减少, 进一步检测 PCSK9 表达, 发现在注射后的 4 h 和 38 h, 肝细胞 PCSK9 mRNA 的表达分别增加了 2.5 倍和 12.5 倍, 肾脏 PCSK9 mRNA 水平也增加了 3 倍, 除了内毒素, 其它引起炎症的物质, 如酵母聚糖、松节油等也都能刺激肝脏 PCSK9 的表达。

在我们前期研究中, 发现 PCSK9 在兔主动脉粥样硬化斑块以及 THP-1 源性巨噬细胞中均有表达。临床研究表明, As 发病相关的多个危险因素如高脂血症、糖尿病、高血压、吸烟、肥胖等均与炎症反应密切相关。高脂血症可诱导全身性和局部炎症反应发生, 在一些高脂饮食动物模型中, TNF- α 、IL-1 和 IL-6 的表达都比正常饮食组有明显的增加。在本实验中, 80 mg/L ox-LDL 刺激 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, 炎症因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达明显增加, 而 PCSK9 siRNA 能明显抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子的表达, 提示 PCSK9 参与了炎症反应, 但其具体作用机制如何呢?

Hampton EN 等^[12] 通过晶体学研究发现, PCSK9 羧基末端和抵抗素羧基末端结构高度相似, 并提出 PCSK9 和抵抗素可能分享或竞争同一受体, 令人感兴趣的是抵抗素也具有促炎的特性。2010 年, Tarkowski A 等^[13] 研究发现抵抗素与细胞膜表面受体—Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 结合, 通过 MyD88 依赖性信号转导通路, 发挥其促炎作用, 而抵抗素与 TLR4 结合部位正是其羧基末端。我们推测 PCSK9 具有促炎作用, 由 TLR4 介导, 依赖 MyD88 的核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 和丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路可能是 PCSK9 激活靶细胞启动炎症反应的重要途径, 即 PCSK9 与巨噬细胞等靶细胞的 TLR4 结合后, 活化 NF- κ B 和 MAPK 通路传递信号分子, 进而诱导炎症细胞释放炎症因子, 介导炎症反应。但这一推测还有待进一步实验证明。

[参考文献]

- [1] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2009; 92-99.
- [2] 谢 闵, 潘利红, 杨 琼, 等. PCSK9 基因在脂质代谢和神经系统中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(1): 6-10.
- [3] 唐志晗, 刘录山, 彭 娟, 等. NARC-1 蛋白在新西兰兔动脉粥样硬化病变中的表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(6): 439-443.
- [4] 刘录山, 程艳丽, 谢 闵, 等. LDL、ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9、LDLR 表达的影响研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(5): 540-547.
- [5] 刘录山, 谢 闵, 姜志胜, 等. PCSK9 siRNA 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.
- [6] Yamamoto T, Lu C, Ryan RO. A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor [J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 5 464-470.
- [7] Benjannet S, Saavedra YG, Hamelin J, et al. Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: Evidence for additional processing events [J]. J Biol Chem, 2010, 285(52): 40 965-978.
- [8] Poirier S, Mayer G, Benjannet S, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2 [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2 363-372.
- [9] Lan H, Pang L, Smith MM, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) affects gene expression pathways beyond cholesterol metabolism in liver cells [J]. J Cell Physiol, 2010, 224(1): 273-281.
- [10] Ranheim T, Mattingsdal M, Lindvall JM, et al. Genome-wide expression analysis of cells expressing gain of function mutant D374Y-PCSK9 [J]. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 459-467.
- [11] Feingold KR, Moser AH, Shigenaga JK, et al. Inflammation stimulates the expression of PCSK9 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(2): 341-344.
- [12] Hampton EN, Knuth MW, Li J, et al. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(37): 14 604-609.
- [13] Tarkowski A, Bjersing J, Shestakov A, et al. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4 [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6B): 1 419-431.

(此文编辑 曾学清)