

[文章编号] 1007-3949(2011)19-12-0963-06

• 实验研究 •

组织蛋白酶 L 在动脉粥样硬化病变中的表达以及对巨噬细胞脂质蓄积的影响

危当恒¹, 夏敏², 贾小英¹, 刘艳辉¹, 田国平^{1,2}

(1. 动脉硬化化学湖南省重点实验室 南华大学心血管疾病研究所, 2. 南华大学附属第二医院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 组织蛋白酶 L; 氧化型低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞

[摘要] 目的 观察组织蛋白酶 L 在动脉粥样硬化病变中的表达以及对巨噬细胞脂质蓄积的影响。方法 颈总动脉套环并饲以高脂饮食建立兔颈总动脉粥样硬化模型, 免疫组织化学方法检测斑块内组织蛋白酶 L 的表达。氧化型低密度脂蛋白孵育 RAW264.7 巨噬细胞 24 h, 逆转录聚合酶链反应、Western blot 以及荧光分光光度法检测组织蛋白酶 L 表达和活性。组织蛋白酶 L 抑制剂预处理巨噬细胞, 油红 O 染色以及高效液相色谱法观察细胞内脂质蓄积。结果 正常血管中不表达组织蛋白酶 L, 斑块内组织蛋白酶 L 高表达。巨噬细胞经不同浓度氧化型低密度脂蛋白孵育 24 h 后, 组织蛋白酶 L mRNA 的表达量在各组间无明显差异 ($P > 0.05$), 但蛋白表达量以及活性明显增加 ($P < 0.05$)。组织蛋白酶 L 抑制剂剂量依赖性抑制巨噬细胞内脂质积蓄。结论 组织蛋白酶 L 在动脉粥样硬化斑块中高表达并参与巨噬细胞脂质代谢。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Expression of Cathepsin L in Atherosclerotic Lesion and the Effect on Lipid Accumulation of Macrophage

WEI Dang-Heng¹, XIA Min², JIA Xiao-Ying¹, LIU Yan-Hui¹, and TIAN Guo-Ping^{1,2}

(1. Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & The Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Cathepsin L; Oxidized Low Density Lipoprotein; Atherosclerosis; Macrophage

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of cathepsin L (Cat L) in atherosclerotic lesion and investigate its role in lipid accumulation of macrophage. **Methods** Atherosclerosis model of rabbit carotid artery was established by using ringer of carotid artery. Immunohistochemistry was taken to examine the expression of Cat L in plaques. RAW264.7 macrophage was cultured and treated with various concentrations of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). The mRNA level, the protein expression and the activity of Cat L were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and spectrofluorimeter, respectively. The RAW264.7 macrophage was pretreated with various concentrations of Cat L inhibitor, the accumulation of cellular lipid was detected by oil red O staining and high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Cat L was highly expressed in atherosclerotic lesion, while very weak positive staining was observed in normal vascular. After treatment with oxidized low density lipoprotein, the Cat L mRNA levels were not obviously different among groups ($P > 0.05$). However, the protein expression and the activity of Cat L were increased with a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). With pretreatment of Cat L inhibitor, the deposition of lipid was inhibited responding to the inhibitor concentration. **Conclusion** Cat L was highly expressed in the atherosclerotic plaque and involved in the process of macrophage lipid metabolism.

[收稿日期] 2011-07-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30800449)和湖南省卫生厅项目(C2008-012)资助

[作者简介] 危当恒, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及其防治, 联系电话为 0734-8281297, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。夏敏, 硕士研究生, E-mail 为 dajiafengfan84@126.com。田国平, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 tianguoping@yy.net.cn。

组织蛋白酶 L (cathepsin L, Cat L) 属于木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白水解酶, 以酶原的形式储存于溶酶体中。在正常情况下, 被其它的蛋白水解酶水解或自身激活, 参与许多特殊的生理过程, 如激素原的激活、抗原呈递、组织蛋白的发育等^[1]。但在病理状态下, 大量 Cat L 释放到胞质或组织间隙, 并被激活, 降解细胞成分或细胞间质基质组分, 参与肿瘤的浸润与转移、关节炎、骨质疏松、动脉粥样硬化等慢性炎症性疾病的发生发展过程^[2-6]。

Kitamoto 等^[7]对 CatL^{-/-} LDLR^{-/-} 鼠、CatL^{+/-} LDLR^{-/-} 小鼠以及 CatL^{+/+} LDLR^{-/-} 小鼠的研究结果表明: 在喂饲高脂饮食 13 周后, 与 CatL^{+/+} LDLR^{-/-} 小鼠相比, CatL^{-/-} LDLR^{-/-} 小鼠以及 CatL^{+/-} LDLR^{-/-} 小鼠血浆总胆固醇含量明显降低, 其中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 以及乳糜微粒 (chylomicron, CM) 的含量明显降低, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块面积明显减少, 发展速度明显减缓, 脂质核心的体积明显减小, 斑块中的胶原蛋白和弹性蛋白含量明显增多, 提示 Cat L 不仅通过参与细胞外基质的降解, 还可能通过调节脂质代谢参与 As 的发生发展。本研究通过观察 Cat L 在 As 斑块的表达以及对巨噬细胞脂质蓄积的影响, 探讨 Cat L 在 As 发生发展的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

新西兰大白兔购自南华大学实验中心。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。Cat 抑制剂 (Z-FY-CHO) 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 动脉粥样硬化动物模型的建立

8 只重量为 1.9 ~ 2.5 kg 的雄性新西兰大白兔购自南华大学实验动物中心。随机分为 2 组, 每组 4 只。实验组腹腔注射戊巴比妥钠溶液 (30 mg/kg) 麻醉, 分离出左、右侧颈总动脉, 硅胶管套环于左侧颈总动脉上, 手术线固定套环, 高脂饮食 (2% 胆固醇 + 10% 的猪油) 4 周。对照组饲以普通饮食。

1.3 血脂测定

耳缘静脉采血, 酶法测定血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), Friedwald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

1.4 颈总动脉病理学观察

剥离颈总动脉, 10% 中性福尔马林固定 24 h。蒸馏水冲洗 0.5 ~ 1 h, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片 (厚度为 5 μ m), 烤片 1 h, 切片常规脱蜡入水, HE 染色, 光学显微镜下观察动脉粥样硬化斑块病变。

1.5 油红 O 染色观察斑块中脂质的蓄积

将制作好的切片用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗 3 \times 5 min; 50% 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色 10 min; 水性封片剂封片, 光学显微镜观察并摄像保存。

1.6 免疫组织化学检测斑块中组织蛋白酶 L 的表达

切片常规脱蜡、入水, 3% 过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化酶, PBS 液洗涤后加入一抗 (1: 100 稀释), 后续步骤按试剂盒操作说明进行, DAB 显色, 苏木素复染。结果判定, 棕黄色颗粒为阳性^[8]。

1.7 细胞培养

实验分为 4 组: ①对照组: 细胞于含 10% 胎牛血清基础培养基孵育 24 h; ②2 mg/L 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 组: 在细胞培养液中加入 2 mg/L ox-LDL 孵育 24 h; ③10 mg/L ox-LDL 组: 在细胞培养液中加入 10 mg/L ox-LDL 孵育 24 h; ④50 mg/L ox-LDL 组: 在细胞培养液中加入 50 mg/L ox-LDL 孵育 24 h。

1.8 逆转录聚合酶链反应检测组织蛋白酶 L mRNA 的表达

细胞总 RNA 的提取按照试剂盒说明进行。将 1 mg 总 RNA 逆转录, 取逆转录产物 1 mL 进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 循环。Cat L 上游引物为: 5'-CTGTTCCCATTTTACATGG-3', 下游引物为: 5'-TTCCAGACTCAGAATTAAGC-3'。反应结束后, 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, 凝胶成像分析系统扫描并分析 mRNA 的表达。实验重复 3 次。

1.9 Western blot 检测组织蛋白酶 L 蛋白表达

收获细胞并加入裂解缓冲液裂解细胞。15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 进行分离, 转膜。封闭液封闭, Cat L 或 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST (tris-buffered saline and tween 20) 洗 3 次; 辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, Western 印迹荧光检测试剂盒显色, 曝光于 X 光片。Labwork 凝胶图像分析系统扫描并进行图像分析。

1.10 组织蛋白酶 L 活性检测

将接近融合的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 分别加 0、2、10 及 50 mg/L 的 ox-LDL, 恒温箱中孵育 24 h, 按试剂盒说明处理细胞, 荧光分光光度计检测各组荧光值。

1.11 细胞油红 O 染色

将接近融合的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 分别加 0、2、4 及 6 mg/L 的 Cat L 抑制剂预处理 24 h, 然后加 ox-LDL 至终浓度为 50 mg/L, 孵育 24 h。PBS 液冲洗 3×5 min, 50 % 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色液染色 10 min, 苏木素衬染 5 min, 盐酸酒精分色; 水性封片剂封片, 光学显微镜观察。

1.12 细胞内脂质含量测定

0、2、4 及 6 mg/L 的 Cat L 预处理小鼠单核巨噬细胞 24 h, 50 mg/L ox-LDL 孵育 24 h。收集细胞, 超声裂解, 15% 醇溶性氢氧化钾、正己烷-异丙醇(两者溶液的体积比为 4:1), 分离脂质, 真空冷冻干燥。加入流动相震荡溶解, 超声除气 5 min, 15 000 r/min, 4℃, 离心 5 min, 收集上清液备用。

取 5 μL 样品进样, C4 反相柱, 以异丙醇: 正庚烷: 乙腈为流动相, 非梯度洗脱, 1 mL/min, 柱温 40℃, 检测波长 216 nm, 检测到第 8 min, 单位为 μg/g 蛋白^[9]。

1.13 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数比较采用方差分析, 样本均数间的多重比较采用 LST-t 检验, 由 SPSS 13.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 饮食对血脂的影响

实验组高脂高胆固醇喂养后, TC 和 LDL 迅速升高, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 而 HDLC 虽然略有升高, 但差异无显著性 ($P > 0.05, n = 4$), 对照组血脂水平无明显变化。

2.2 颈总动脉病理形态观察

HE 染色的结果表明, 左颈动脉套环 4 周并饲以高脂饮食后形成明显的动脉粥样硬化斑块, 斑块内含有大量炎性细胞和泡沫细胞, 而对照血管内表面光滑, 无动脉粥样硬化性病变形成(图 1)。

2.3 颈总动脉脂质蓄积观察

油红 O 染色血管壁内脂质, 可见动脉粥样硬化病变区有大量红染脂滴, 并且主要集中在增生的内膜, 而在对照血管内无明显的脂质蓄积(图 2)。

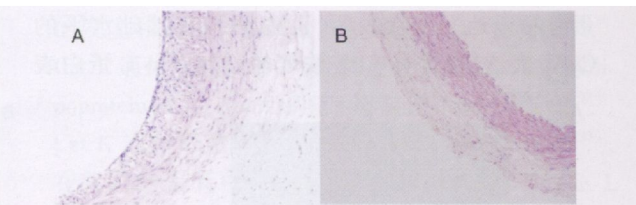


图 1. 颈总动脉套环/高脂饮食对兔颈总动脉病变的影响(×100) A 为套环组血管, B 为对照组血管。

Figure 1. Effect of ring and high fat/cholesterol diet on pathology of common carotid artery (×100)

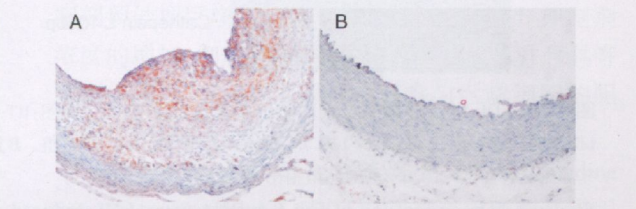


图 2. 颈总动脉套环/高脂饮食对兔颈总动脉脂质蓄积的影响(×100) A 为套环组血管, B 为对照组血管。

Figure 2. Effect of ring and high fat/cholesterol diet on lipid deposition in common carotid artery (×100)

2.4 组织蛋白酶 L 在颈总动脉的表达

免疫组织化学检测结果表明, 正常血管组织不表达 Cat L(图 3B), 但在动脉粥样硬化斑块中 Cat L 高表达, 并且主要集中在增生的内膜(图 3A)。

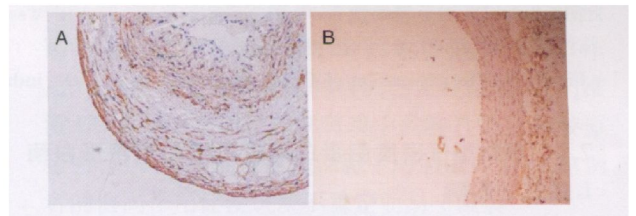


图 3. 免疫组织化学检测 Cat L 在动脉粥样硬化斑块中的表达(×100) A 为套环组血管, B 为对照组血管。

Figure 3. The expression of Cat L in atherosclerotic lesion (×100)

2.5 氧化型低密度脂蛋白对巨噬细胞组织蛋白酶 L mRNA 表达的影响

用不同浓度的 ox-LDL 处理小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 24 h, 然后用 RT-PCR 检测各组细胞中 Cat L mRNA 的表达, 结果表明, 各组间 Cat L mRNA 的表达无明显的差异 ($P > 0.05$; 图 4)。

2.6 氧化型低密度脂蛋白对巨噬细胞组织蛋白酶 L 蛋白表达的影响

用不同浓度的 ox-LDL 处理小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 24 h, Western blot 检测各组细胞中 Cat L

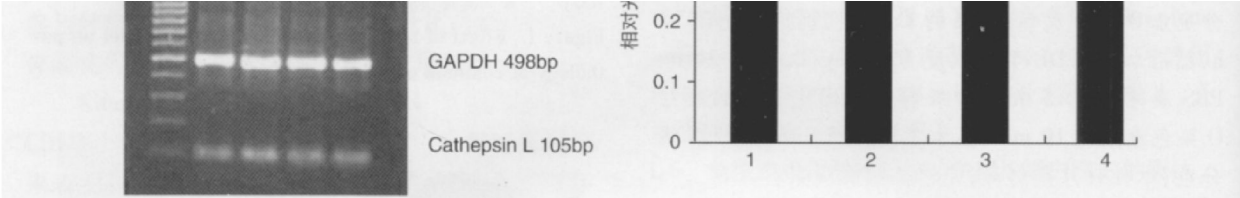


图 4. ox-LDL 对巨噬细胞 Cat L mRNA 表达的影响 A 图:RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图,泳道 1 为对照组;泳道 2 为 2 mg/L ox-LDL 组;泳道 3 为 10 mg/L ox-LDL 组;泳道 4 为 50 mg/L ox-LDL 组。B 图:ox-LDL 对巨噬细胞 Cat L mRNA 表达的影响的统计学结果,各组间差异无显著性 ($P>0.05$,与对照组相比, $n=3$)。

Figure 4. The expression of Cat L mRNA in ox-LDL induced macrophage

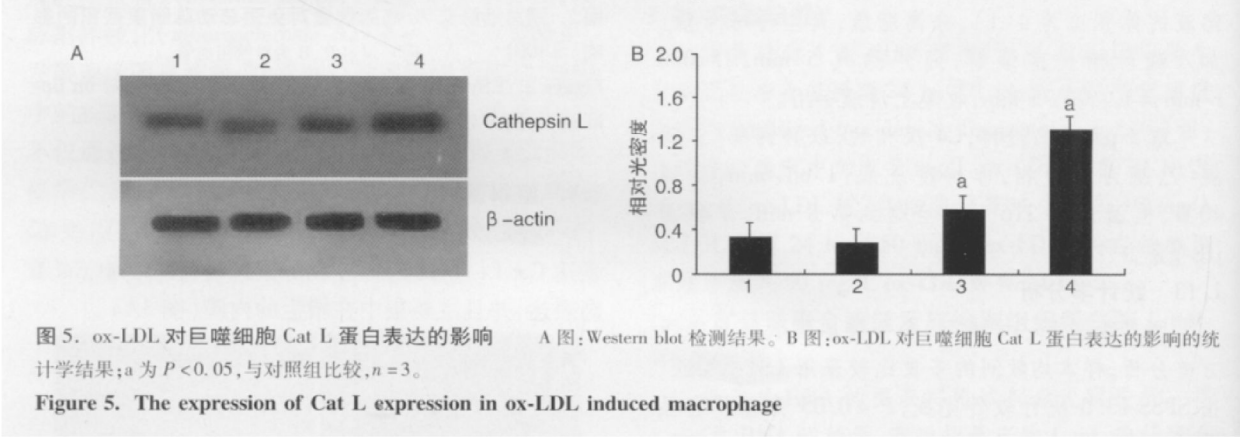


图 5. ox-LDL 对巨噬细胞 Cat L 蛋白表达的影响 A 图:Western blot 检测结果。B 图:ox-LDL 对巨噬细胞 Cat L 蛋白表达的影响的统计学结果;a 为 $P<0.05$,与对照组比较, $n=3$ 。

Figure 5. The expression of Cat L expression in ox-LDL induced macrophage

2.7 氧化型低密度脂蛋白对巨噬细胞组织蛋白酶 L 活性的影响

活性检测的结果表明,与 Cat L 的蛋白表达类似,在较低 ox-LDL 浓度下 Cat L 的活性无明显改变,但随着 ox-LDL 浓度的增加,Cat L 的活性明显增加(图 6)。

2.8 组织蛋白酶 L 抑制剂对巨噬细胞脂质蓄积的影响

油红 O 染色的结果表明,对照组(0 mg/L Cat L 抑制剂)在经 ox-LDL 孵育后,细胞内有大量的红染脂滴(图 7 A);而在 Cat L 抑制剂预处理组,随着 Cat L 抑制剂浓度的增加,细胞内红染的脂滴数量明显

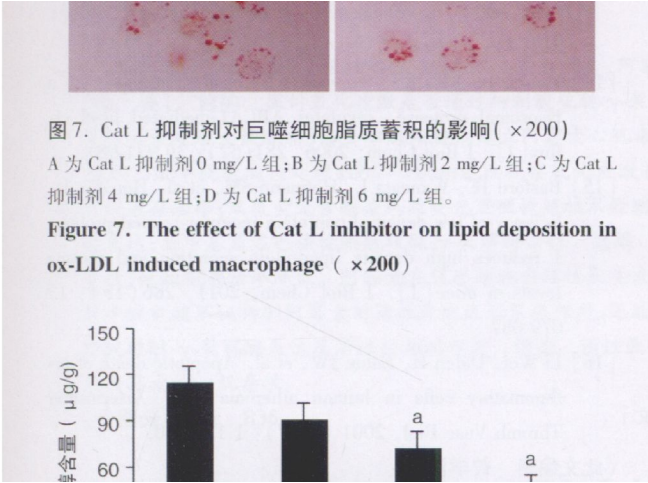


图 7. Cat L 抑制剂对巨噬细胞脂质蓄积的影响 (×200)
A 为 Cat L 抑制剂 0 mg/L 组; B 为 Cat L 抑制剂 2 mg/L 组; C 为 Cat L 抑制剂 4 mg/L 组; D 为 Cat L 抑制剂 6 mg/L 组。
Figure 7. The effect of Cat L inhibitor on lipid deposition in ox-LDL induced macrophage (×200)

及颈动脉粥样硬化斑块形成。在本实验中,我们采取颈总动脉套环的方法和高脂饮食喂养家兔 4 周后,成功建立动脉粥样硬化模型。斑块内有大量的炎性细胞和泡沫细胞存在,而对照组血管表面光滑,未见动脉粥样硬化形成。油红 O 染色发现斑块内存在大量脂质,而对照组血管未见明显脂质蓄积。免疫组化法检测发现斑块中 Cat L 高表达,而正常血管中几乎不表达,这和文献报道相一致。

研究表明,组织蛋白酶家族成员不仅仅具有内肽酶的活性,降解和更新细胞内蛋白质,降解层粘连素、胶原纤维Ⅳ、纤维连接素等细胞以及细胞间质组分,并通过调控脂质代谢过程而参与动脉粥样硬化

细胞的胆固醇代谢过程。

为了进一步验证 Cat L 参与巨噬细胞胆固醇的代谢过程,在实验中我们采用不同浓度的 Cat L 抑制剂预处理巨噬细胞,结果表明随着 Cat L 抑制剂浓度的增加,细胞内的脂质含量明显降低,并且具有浓度依赖性,进一步证明 Cat L 参与巨噬细胞的胆固醇代谢过程。

研究表明,ATP 结合盒转运子 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 通过介导磷脂和胆固醇从细胞内主动流出到 ApoA I 上形成 HDL,在细胞脂质代谢中起着非常重要的作用。并且 Cat L 家族成员 Cat D 通过调控 ABCA1 的表达调节单核细胞源性巨噬细胞胆固醇的流出^[14,15]。但 Cat L 是否通过

[1] 夏敏,田国平,危白钊. 组织蛋白酶 L 在心血管疾病中的作用研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (7): 558-560.

[2] Friedrich C. Luft. From furless to heartless-unraveling the diverse functions of cathepsin L [J]. J Mol Med, 2009, 87 (3): 225-227.

[3] Goulet B, Sansregret L, Leduv L, et al. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5 (9): 899-907.

[4] 曹新广,郭长青,李继昌,等. 原位杂交检测组织蛋白酶 L 在大肠癌中的表达 [J]. 肿瘤基础与临床, 2007, 16 (1): 9-11.

[5] 王素梅,李力,张玮,等. 血清组织蛋白酶 L 在卵巢

癌诊断及检测中的临床意义 [J]. 中国临床肿瘤, 2008, 14(3): 167-168.

[6] Sullivan S, Tosetto M, Kevsns P, et al. Localization of nuclear cathepsin L and association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2009, 125(1): 54-61.

[7] Kitamoto S, Sukhova GK, Sun J, et al. Cathepsin L deficiency reduces diet-induced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. J Biol Chem, 2006, 281(12): 8105-8112.

[8] Wang Y, Wang Y, Wang Y, et al. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells [J]. Atherosclerosis, 2006, 184(2): 302-311.

[12] Chen J, Tung CH, Mahmood U, et al. In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis [J]. Circulation, 2002, 105(23): 2766-771.

[13] Lindstedt L, Lee M, Oorni K, et al. Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. J Biol Chem, 2006, 281(12): 8105-8112.