

阿托伐他汀对 THP-1 源性巨噬细胞自体吞噬的影响

朱亚娟, 李宗庄, 杨蕾, 戴秋艳

(上海交通大学附属第一人民医院心内科, 上海市 200080)

[关键词] 自体吞噬; 阿托伐他汀; THP-1 源性巨噬细胞; 透射电镜

[摘要] **目的** 观察阿托伐他汀对 THP-1 源性巨噬细胞自体吞噬(自噬)的影响。**方法** 用 Hank's 液代替常规培养液的饥饿诱导的方法使 THP-1 源性巨噬细胞发生自噬,在诱导自噬过程中,使细胞分别与含有低浓度(1 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)阿托伐他汀钙的培养液共同孵育,以空白组作对照,运用间接免疫荧光染色法,采用荧光显微镜观察 LC3-FITC 点状聚集情况,应用透射电镜观测各组细胞自噬的发生情况。**结果** 与对照组相比,两组含阿托伐他汀钙培养液的巨噬细胞中的自噬泡占胞质总面积均明显增多($P < 0.05$),高浓度阿托伐他汀组自噬泡占胞质总面积高于低浓度阿托伐他汀组,但无显著性差异($P = 0.079$)。**结论** 阿托伐他汀钙可以促进 THP-1 源性巨噬细胞自噬。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on the Autophagy of THP-1 Macrophages

ZHU Ya-Juan, LI Zong-Zhuang, YANG Lei, and DAI Qiu-Yan

(Department of Cardiology, Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080)

[KEY WORDS] Autophagy; Atorvastatin; THP-1 Macrophage; Transmission Electron Microscope

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of atorvastatin on the autophagy of THP-1 macrophages. **Methods**

The Hank's solution was used to induce the autophagy of THP-1 macrophages. Cells were randomized into four groups: the blank control group and atorvastatin groups; the cells were incubated with normal medium in group I, Hank's solution in group II, containing low concentration of atorvastatin (1 $\mu\text{mol/L}$) in Hank's solution in group III, containing high concentration of atorvastatin (5 $\mu\text{mol/L}$) in Hank's solution in group IV respectively. Indirect immunofluorescence was used to detect LC3-FITC dot clustering. Transmission electron microscope was used to detect the autophagy. **Result** Compared with the control group, the macrophages autophagic vacuoles of both groups of containing atorvastatin medium occupied a total area of cytoplasm increased significantly ($P < 0.05$), and the high concentration group was not increased more significantly than the low ($P = 0.079$). **Conclusion** Atorvastatin could promote the autophagy of THP-1 macrophages.

自体吞噬(autophagy, 自噬)是细胞将自身部分细胞质、细胞器包裹形成双膜包裹体,利用溶酶体系统进行一系列降解长半衰期蛋白和细胞器的过程。自体吞噬的一个显著特征是“自体吞噬泡”(autophagic vacuoles, AVs)的形成^[1]。越来越多的文献报道巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞的自噬参与了动脉粥样硬化的发生发展过程。近年来,应用他汀类药物的大规模临床试验均证实他汀类药物可减少冠心病临床事件及心血管病死亡率;他汀类药物能抑制冠状动脉粥样硬化的发生发

展,其所获得的益处与降胆固醇不成比例,提示这可能与改善内皮功能、稳定粥样斑块等调脂之外的作用有关。Crisby 等以普伐他汀治疗观察人颈动脉斑块变化,显示治疗后的形态学变化包括血管平滑肌细胞的聚集,基质金属蛋白酶活性降低,伴随着巨噬细胞数量和细胞外脂质的减少,相关细胞的凋亡率降低^[2]。他汀类药物可以通过减少泡沫细胞的细胞毒作用,减轻炎症反应稳定斑块,但其对血管壁内的巨噬细胞自噬方面的作用目前尚未见报道。本研究观察了阿托伐他汀钙对 THP-1 源性巨

[收稿日期] 2012-11-14

[作者简介] 朱亚娟,主治医师,研究方向为动脉硬化,E-mail 为 zhuyajuan@medmail.com.cn。李宗庄,硕士,副主任医师,研究方向为高血压及血管重构。通讯作者戴秋艳,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为高血压及血管重构,E-mail 为 qiuyand@yahoo.com。

噬细胞自噬的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

单核细胞株 THP-1, 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞中心。

1.2 试剂和仪器

RPMI 1640 培养基: Gibco 公司; 胎牛血清: Gibco 公司; 佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA): Sigma 公司; 抗 LC3A/B 抗体: Abcam 公司; 异硫氰酸荧光素 (fluoresceine isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔二抗: 碧云天公司; 抗荧光淬灭甘油: 碧云天公司; 4, 6-二氨基-2-苯基吲哚二盐酸 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI): Nitrogen 公司; 阿托伐他汀钙: 美国辉瑞公司惠赠。CO₂ 培养箱, 型号 Forma/371 (气套): Thermo 公司; 超净工作台 (含生物安全柜), 型号 SAFE1800: 力申公司。

1.3 THP-1 细胞培养

将单核细胞株 THP-1 接种在含 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺的 1640 培养基里, 37℃、5% CO₂、湿度恒定在 60% ~ 70% 的孵箱内培养。培养状态良好后 2 ~ 4 代用于实验。该细胞株属人类单核细胞系, 在培养液中呈簇集状悬浮生长, 倍增时间大约在 26 h 后。细胞数量控制在 10⁶ 个, 每 2 ~ 3 天换液 1 次, 每 4 ~ 5 天传代 1 次。细胞复苏后, 传至 3 ~ 5 代后用于实验。

1.4 阿托伐他汀溶液的配制

将阿托伐他汀钙原药 6.0 mg 溶于 2 mL 55℃ 甲醇中, 静置 10 min, 加磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 至总体积 10 mL, 过滤后 -70℃ 冻存, 贮存浓度为 0.5 mmol/L。另取 2 mL 甲醇, 加 PBS 至总体积 10 mL, 过滤后 -70℃ 冻存, 作为空白对照使用。

1.5 THP-1 源性巨噬细胞自噬模型的建立及实验分组

以每孔 1.0×10^6 个细胞接种到 12 孔板中, 每孔预先放置 12 mm × 15 mm 盖玻片一片, 进行细胞爬片, 160 μg/L 佛波酯下诱导细胞贴壁生长 48 h, 使之成巨噬细胞, 0.01 mmol/L PBS 洗涤 2 次, 更换培养基培养, 用于后续实验。实验中分别选用正常培养基或 Hank's 液逐级稀释上述已配好的阿托伐他汀溶液, 分别制备成低浓度 (1 μmol/L)、高浓度 (5 μmol/L) 溶液。根据溶液是否含阿托伐他汀, 分组如下: (1) 空白组: 无 Hank's 液诱导; (2) 对照组: 经过饥饿诱导;

(3) 低浓度阿托伐他汀组: 经过饥饿诱导并与低浓度阿托伐他汀 (1 μmol/L) 共同培育的实验组; (4) 高浓度阿托伐他汀组: 经过饥饿诱导并与高浓度阿托伐他汀 (5 μmol/L) 共同培育的实验组。

1.6 间接免疫荧光染色法

用预冷的 70% 甲醇 + 30% 丙酮固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 30 min, 加入 1% BSA 稀释的一抗 (1:50), 于湿盒内 4℃ 孵育过夜, PBS 洗片 2 次, 每次 5 min; 加入 1% BSA 稀释的 FITC (激发光波长为 490 nm) 标记的山羊抗兔二抗 (1:2 000) 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗片 2 次, 每次 5 min; 0.1% DAPI (激发光波长为 405 nm) 染核 1 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入抗荧光淬灭甘油封片, 荧光显微镜采集荧光图像。

1.7 电镜观察自噬体

按照上述方法分组。4 组分别计数 THP-1 细胞, 以 1.0×10^7 个细胞接种到 10 cm 培养皿中, 160 μg/L 佛波酯下诱导细胞贴壁生长 48 h, 使之成巨噬细胞, 0.01 mmol/L PBS 洗涤 2 次, 更换培养基培养, 用于后续实验。自噬诱导分化 3 h, PBS 洗涤 3 次, 吸干, 加入电镜固定液 (2% 戊二醛磷酸缓冲液), 送上海交通大学医学院电镜室观察自噬体。

1.8 自噬泡占细胞质总面积比值的测定

各组分别选取放大倍数为 2 000 倍的电镜照片 5 张, 采用 Image Tool 3.0 软件对每组电镜照片进行图像处理和分析。

1.9 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 由 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间接免疫荧光染色结果

荧光显微镜下观察, 空白组: 胞质内染色均匀, 浅淡; 对照组: 胞质内染色较空白组深, 且有少量绿色荧光点状聚集; 低浓度阿托伐他汀组: 胞质内绿色荧光聚集点较对照组明显增多; 高浓度阿托伐他汀组: 胞质内绿色荧光聚集点较对照组明显增多 (图 1)。

2.2 透射电镜观察结果

在透射电镜下发现, THP-1 源性巨噬细胞呈近似圆形, 表面见长短不一的微绒毛, 细胞质中内质网囊性膨胀, 线粒体轻度肿胀, 胞核染色质呈细颗

粒状,均匀分布。各组细胞胞质中充满了数量不等的自噬泡,为单层或双层膜包裹着的处于不同降解阶段的胞质成分或废弃的细胞器经消化降解后形

成的板层样结构,轮廓清晰可见,其中以低浓度阿托伐他汀组和高浓度阿托伐他汀组中自噬泡最多,空白组中自噬泡最少(图2)。

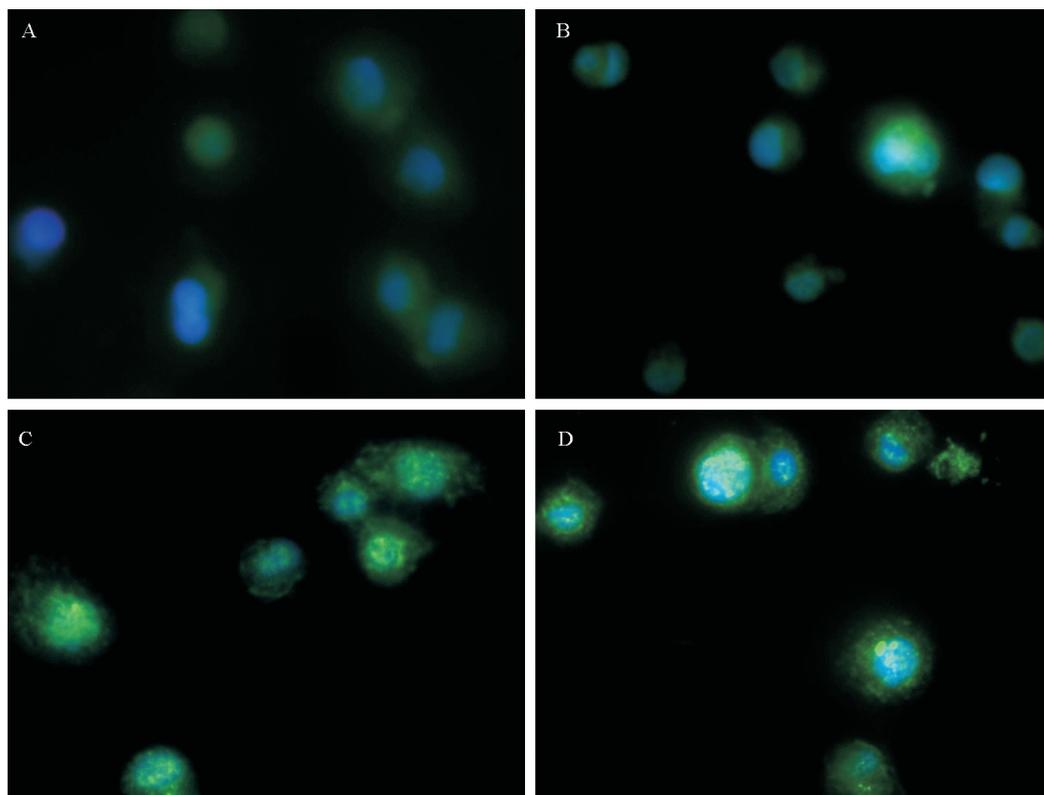


图1. 荧光显微镜下观察自噬体点状聚集 A 为空白组,B 为对照组,C 为低浓度阿托伐他汀组,D 为高浓度阿托伐他汀组。

Figure 1. Observation of point-like aggregation of autophagosome by fluorescence microscope

2.3 自噬泡占细胞质总面积的比值

与空白组相比,对照组细胞自噬泡占细胞质总面积的比值明显增加($P < 0.01$)。而与对照组相比,低浓度阿托伐他汀组、高浓度阿托伐他汀组细胞内形成的自噬泡占细胞质总面积的比值均明显增大($P < 0.05$);与低浓度阿托伐他汀组相比,高浓度阿托伐他汀组细胞内形成的自噬泡占细胞质总面积的比值增大,但无统计学差异($P = 0.079$)(表1)。

表1. 各组巨噬细胞自噬占细胞质总面积的比值($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The proportion of autophagosome to the total area of cytoplasm in every group macrophages ($\bar{x} \pm s$)

分组	平均比值
空白组	4.058% \pm 1.423%
对照组	8.096% \pm 1.354% ^a
低浓度阿托伐他汀组	10.454% \pm 2.192% ^b
高浓度阿托伐他汀组	12.356% \pm 1.259% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

血脂异常是导致多种心血管疾病的主要危险因素,积极有效地调节血脂已成为当前预防心脑血管疾病、降低病死率的重要手段之一。目前,他汀类药物是调脂治疗的一线药物。近年来临床及动物试验证实,他汀类药物不仅可以降低血脂,减少致死及非致死性心血管病事件的发生率,而且能降低血中C反应蛋白水平及金属蛋白酶活性,减少炎症反应^[3],减少白细胞浸润,降低斑块中T淋巴细胞活性,从而减轻炎症对斑块组织的损伤^[2];阿托伐他汀能显著降低高脂和免疫刺激所致动脉粥样硬化形成过程中的氧化应激反应,减少丙二醛和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的生成以及血管壁氧化型低密度脂蛋白受体1d(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1d, LOX-1d)的表达,从而显著抑制炎症反应,保护血管内皮^[4];阿托伐他汀还可减轻高胆固

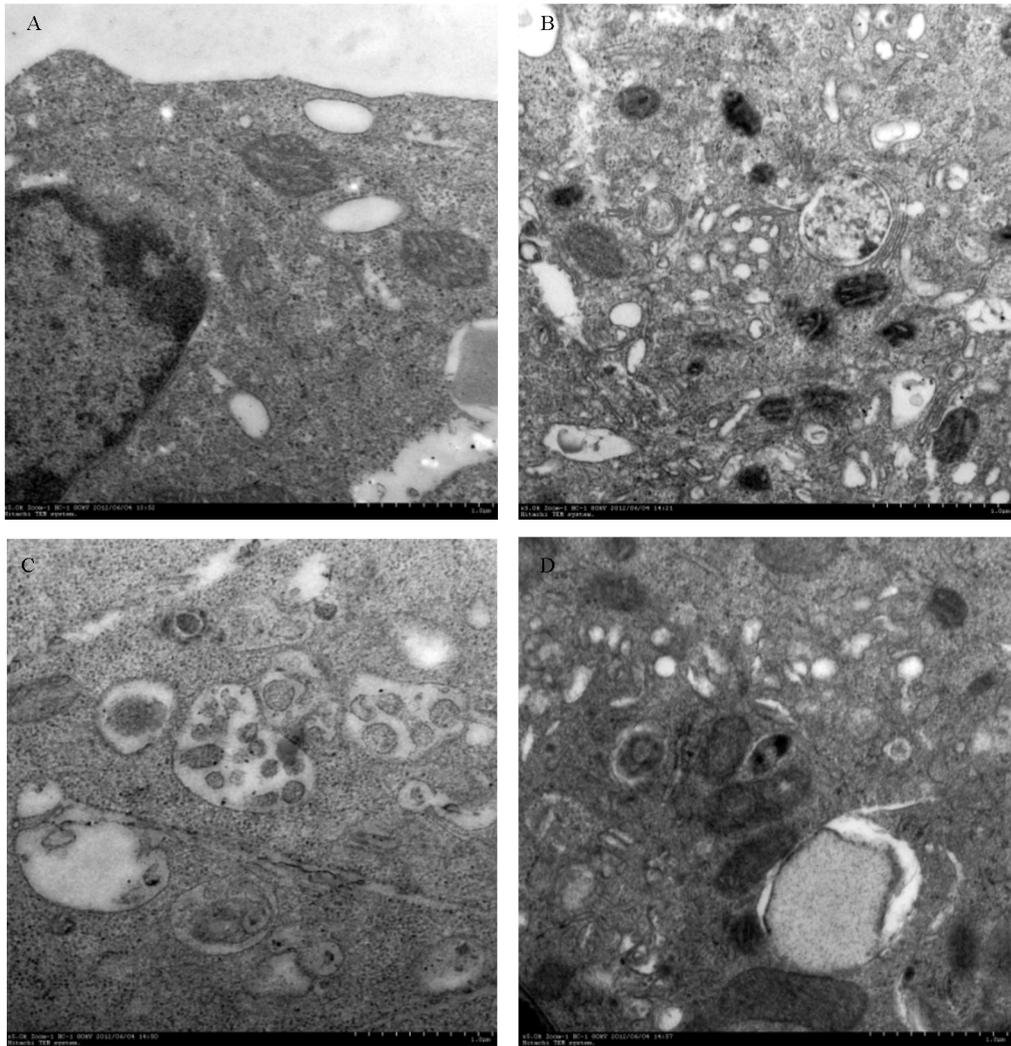


图 2. 电镜下观察自噬体 ($\times 5\ 000$) A 为空白组, 胞质中自噬泡较少; B 为对照组, 胞质内自噬泡较空白组增多; C 为低浓度阿托伐他汀组, 胞质内自噬泡个数和自噬泡所占整个胞质的面积较对照组明显增多; D 为高浓度阿托伐他汀组, 胞质内自噬泡个数和自噬泡所占整个胞质的面积较对照组明显增多。

Figure 2. Observation of autophagosome by transmission electron microscope ($\times 5\ 000$)

醇血症导致的心肌线粒体结构损伤, 升高线粒体内膜呼吸链复合物 II、IV 活性, 进而改善线粒体氧化磷酸化能力^[5]。Laufs 等人的研究发现, 他汀类药物能抑制血小板聚集、降低血小板活性, 对防止冠状动脉急性事件的发生起重要作用^[6]。这些都表明他汀类药物可以通过不同的途径起到稳定动脉粥样斑块的作用。

随着分子生物学的深入, 越来越多的文献报道巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞的自噬参与了动脉粥样硬化的发生发展过程。有人发现阿托伐他汀可以抑制血管内皮细胞自体吞噬, 推测阿托伐他汀改善血管内皮功能的机制可能与其减少血管内皮细胞的自噬有关^[7]。动脉粥样硬化是动脉内膜炎症的反应, 巨噬细胞通过分泌基质金属蛋白酶导致血管平滑肌细胞死亡, 降解细胞外

胶原纤维, 破坏纤维帽结构, 导致斑块的不稳定。在动脉粥样斑块形成早期, 通过药理方法诱导巨噬细胞自噬性死亡, 可以稳定易损斑块^[8]。Martinet 等报道了 z-VAD-fmk——一种特异的半胱天冬酶抑制剂, 可以诱导小鼠单核巨噬样细胞 J774A.1 和破骨前体细胞 RAW264.7 发生非凋亡性细胞死亡, 但不影响平滑肌细胞数量^[9]。在胆固醇喂养的兔的动脉粥样硬化形成的动脉内植入依维莫司——雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的抑制剂洗脱支架后, 可以看到血管壁内的巨噬细胞选择性的被清除, 而平滑肌细胞的数量不会改变^[10]。巨噬细胞凋亡可减少早期斑块内的细胞数量, 被认为具有稳定斑块的作用^[11]。而对于晚期斑块, 脂质核心处巨噬细胞的凋亡增多, 提示巨噬细胞凋亡与斑块脂质核心增大有关, 进而影响斑

块稳定性。Hartung 等制备了晚期动脉粥样硬化斑块模型,给予他汀类调脂治疗,观察到粥样硬化斑块中巨噬细胞炎性浸润减少和血管平滑肌细胞含量增加,而巨噬细胞凋亡明显减少,表明晚期斑块中巨噬细胞凋亡减少可能有助于斑块的稳定。上述研究突出说明过度的巨噬细胞凋亡可能为易损斑块形成的重要原凶之一^[12]。

近年来,随着对自噬研究的深入,对恶性肿瘤、神经变性疾病和病原体感染等方面有了新的认识,并逐渐成为近期的研究热点。但从自体吞噬角度来探索他汀类药物对血管壁内巨噬细胞自噬作用影响的研究尚不多。本研究观察到阿托伐他汀钙可以促进 THP-1 源性巨噬细胞自噬,随着浓度的升高,自噬作用有增强,但无统计学差异。在今后的进一步研究中如若增加多组不同的浓度组和不同的观察时间点,可能会有新的发现。根据本研究我们推测在抑制动脉粥样斑块的形成中,阿托伐他汀钙与促进血管壁内巨噬细胞自噬、减少斑块内巨噬细胞数量有一定关系。目前分子生物学家和细胞生物学家对自噬及自噬性程序性细胞死亡的认识还处于初级阶段,关于自噬现象的参与分子、信号转导过程、病理生理学意义的研究有待进一步深入。随着一个个谜团的解开,自噬的发生发展过程可受到精细调控,利用自噬机制发展的临床治疗方法可更好的为人类服务。

[参考文献]

[1] Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and intracellular surveillance: modulating MHC class II antigen presentation with stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(22): 7779-780.

[2] Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, et al. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization[J]. Circulation, 2001, 103(7): 926-933.

[3] Musial J, Undas A, Gajewski P, et al. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia [J]. Int J Cardiol, 2001, 77(2-3): 247-253.

[4] 葛金文, 刘吉勇, 朱惠斌, 等. 阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔氧化应激炎症反应的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(12): 979-983.

[5] 曲润波, 鹿育萨, 龚飞宇, 等. 阿托伐他汀对高胆固醇兔心肌线粒体能量代谢的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(10): 903-907.

[6] Laufs U, Gertz K, Huang P, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice[J]. Stroke, 2000, 31(10): 2442-449.

[7] 张圣雪, 邱龄, 肖传实, 等. 阿托伐他汀对血管内皮细胞自噬作用的影响[J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(5): 404-407.

[8] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(9): 2045-051.

[9] Martinet W, De Meyer GR, Timmermans JP, et al. Macrophages but not smooth muscle cells undergo benzyloxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp (O-Methyl)-fluoromethylketone-induced nonapoptotic cell death depending on receptor-interacting protein 1 expression: implications for the stabilization of macrophage-rich atherosclerotic plaques[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(3): 1356-364.

[10] Martinet W, Verheye S, De Meyer GR. Everolimus-induced mTOR inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy[J]. Autophagy, 2007, 3(3): 241-244.

[11] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential[J]. Circ Res, 2009, 104(3): 304-317.

[12] Hartung D, Sarai M, Petrov A, et al. Resolution of apoptosis in atherosclerotic plaque by dietary modification and statin therapy [J]. J Nucl Med, 2005, 46(12): 2051-056.

(此文编辑 曾学清)