

氧化型低密度脂蛋白下调 Rab4 表达 诱导人脐静脉内皮细胞自噬

占凡, 刘厂辉

(南华大学附属第一医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; Rab4; 血管内皮细胞; 自噬

[摘要] **目的** 探讨 Rab4 对氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞自噬的影响及其作用机制。**方法** 不同浓度氧化型低密度脂蛋白孵育人脐静脉内皮细胞 24 h, Western blot 检测 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 表达, 逆转录-聚合酶链反应及 Western blot 检测 Rab4 mRNA 及蛋白表达。75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 Rab4 基因转染人脐静脉内皮细胞 (siRNA 或 Rab4 质粒转染) 24 h, Western blot 检测 Rab4、Beclin-1、LC3 蛋白的表达。**结果** 氧化型低密度脂蛋白孵育人脐静脉内皮细胞 24 h 后, Beclin-1 蛋白表达以及 LC3 II/LC3 I 比值明显增加, 而 Rab4 mRNA 以及蛋白的表达明显降低 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。Rab4 siRNA 进一步增加氧化型低密度脂蛋白诱导的 Beclin-1 蛋白表达量以及 LC3 II/LC3 I 比值 ($P < 0.05$), 而 Rab4 质粒转染则下调氧化型低密度脂蛋白诱导的 Beclin-1 蛋白表达以及 LC3 II/LC3 I 比值增加 ($P < 0.05$)。**结论** 氧化型低密度脂蛋白通过下调 Rab4 表达诱导血管内皮细胞自噬。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Oxidized Low Density Lipoprotein Induces Human Vascular Umbilical Vein Endothelial Cells Autophagy via Down-regulation of Rab4 Expression

ZHAN Fan, and LIU Chang-Hui

(Cardiovascular Department, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Rab4; Vascular Endothelial Cell; Autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on human vascular umbilical vein endothelial cell (HUVEC) autophagy and its mechanism. **Methods** After treatment with ox-LDL for 24 h, Western blot was used to detect the protein expression of Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3); Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect Rab4 mRNA and protein expression. After transfection with Rab4 siRNA and Rab4 plasmid, Western blot was used to measure the protein levels of Rab4, Beclin-1 and LC3 induced by 75 mg/L ox-LDL. **Results** After treatment with ox-LDL for 24 h, the protein expression of Beclin-1 and the ratio of LC3 II/LC3 I were increased. The levels of Rab4 mRNA and protein were obviously decreased with a concentration-dependent manner. When transfection with Rab4 siRNA, the protein level of Beclin-1 and the ratio of LC3 II/LC3 I induced by ox-LDL were further increased. When transfection with Rab4 plasmid, the increased protein level of Beclin-1 and the ratio of LC3 II/LC3 I induced by ox-LDL were attenuated. **Conclusion** ox-LDL increased HUVEC autophagy via down-regulation of Rab4 expression.

自噬 (autophagy) 是细胞将自身胞内非正确折叠、损伤、衰老或非功能性蛋白质及细胞器形成自噬溶酶体, 消化降解其包裹的内容物过程^[1]。自噬在真核生物中高度保守, 正常情况下细胞内维持较低水平的自噬, 但是在应激、饥饿、暴露于有害物质

等胁迫条件下自噬激活, 并在细胞清除废物、结构重建以及生长发育过程中发挥重要作用。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的独立危险因素^[2]。最近研究表明经 ox-LDL 孵育后, 血管

[收稿日期] 2013-04-06

[作者简介] 占凡, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 zhanfan2007@hotmail.com。刘厂辉, 博士, 主任医师, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 liuchanghuidaoshi@163.com。

内皮细胞自噬水平增加,从而减轻 ox-LDL 对血管内皮细胞的损伤,但其作用过程和调节机制并不清楚^[3]。

先前的研究表明,细胞内蛋白质合成后的转运及分选过程受到 Rab 蛋白家族及其效应分子的调节,Rab 蛋白在“内质网-高尔基体”转运途径中起着重要的作用。Rab4 可参与早期内吞体的形成及定位,Rab5 调节笼形蛋白 (clathrin) 衣被小泡在质膜和早期内吞体间的转运,Rab7 则参与晚期内吞体的形成。本实验将探讨 ox-LDL 对血管内皮细胞 Rab4 表达的影响,并进一步探讨 Rab4 在 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞自噬过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

Rab4 siRNA、siRNA 转染试剂盒购自 Santa Cruz 公司;逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自 Fermentas 公司;微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、Beclin-1、Rab4 多克隆抗体均购自 Proteintech 公司;人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 购自中南大学湘雅医学院细胞中心。

1.2 细胞培养与实验分组

HUVEC 用 DMEM 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱。ox-LDL 处理 HUVEC 实验分为 4 组:0 mg/L ox-LDL 组、25 mg/L ox-LDL 组、50 mg/L ox-LDL 组、75 mg/L ox-LDL 组。Rab4 基因转染实验分为 6 组:空白对照组:0 mg/L ox-LDL;对照组:75 mg/L ox-LDL;对照 siRNA 组:75 mg/L ox-LDL + siRNA;Rab4 siRNA 组:75 mg/L ox-LDL + Rab4 siRNA;对照质粒组:75 mg/L ox-LDL + 质粒;Rab4 质粒组:75 mg/L ox-LDL + Rab4 质粒。

1.3 逆转录-聚合酶链反应检测 Rab4 的 mRNA 表达

按通用型 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA;再取 1 μL cDNA 进行 PCR 扩增。磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物序列:正义链 5'-CAAGGT-CATCCATGACAACCTTTG-3',反义链 5'-GTCCACCAC-CCTGTTGCTGTAG-3',扩增片段长度 496 bp;Rab4 引物序列:正义链 5'-CCATGTCCGAAACCTACGAT-3',反义链 5'-ATGTTCTGGCTCGCTAGCAT-3',扩增片段

长度 343 bp。扩增产物利用凝胶成像系统分析。

1.4 Western blot 分析

提取总蛋白,二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白质定量;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离,转膜,封闭;Rab4、Beclin-1 及 LC3 一抗分别孵育,4℃孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;然后加入相应的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,显色;Labwork 凝胶图像分析系统对条带进行扫描、分析。

1.5 Rab4 siRNA 转染

HUVEC 传代接种于 6 孔板,37℃培养箱培养至 80% 融合,按转染试剂盒操作说明书进行转染,24 h 后,提取细胞总 RNA 或总蛋白或 MDC 染色。

1.6 Rab4 质粒转染

HUVEC 传代接种于 24 孔板,按照脂质体 Lipofectamine 2000 (Invivogen 公司) 说明书转染 HUVEC。混和质粒 DNA 和脂质体,每孔细胞中加入 1 mL 含 Lipofectin-DNA 复合物的培养基,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后,完全培养液终止转染,再置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h;加入含 G418 的培养液培养,筛选、挑取单克隆培养,扩增。

1.7 统计学处理

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 *t* 检验等统计学分析方法,运用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,*P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 HUVEC 自噬的影响

Beclin-1 是哺乳动物参与自噬的特异性基因,在自噬前体复合物的形成中发挥着重要作用。自噬发生后,LC3 I 经泛素样加工修饰形成 LC3 II,LC3 II/LC3 I 反映细胞自噬状况。0、25、50、75 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 24 h,Western blot 检测 HUVEC Beclin-1 表达及 LC3 II/LC3 I 比值。结果显示,随着 ox-LDL 浓度的增加,Beclin-1 表达 (图 1B) 及 LC3 II/LC3 I 比值 (图 1C) 呈浓度依赖性增加 (*P* < 0.05),说明 ox-LDL 呈浓度依赖性地上调 HUVEC 自噬 (图 1)。

2.2 ox-LDL 对 HUVEC Rab4 mRNA 表达的影响

0、25、50、75 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 24 h,RT-PCR 检测 HUVEC Rab4 mRNA 表达情况。结果显示,ox-LDL 呈剂量依赖性下调 Rab4 mRNA 表达,75 mg/L

L 组 Rab4 mRNA 下降最为显著 ($P < 0.05$; 图 2)。

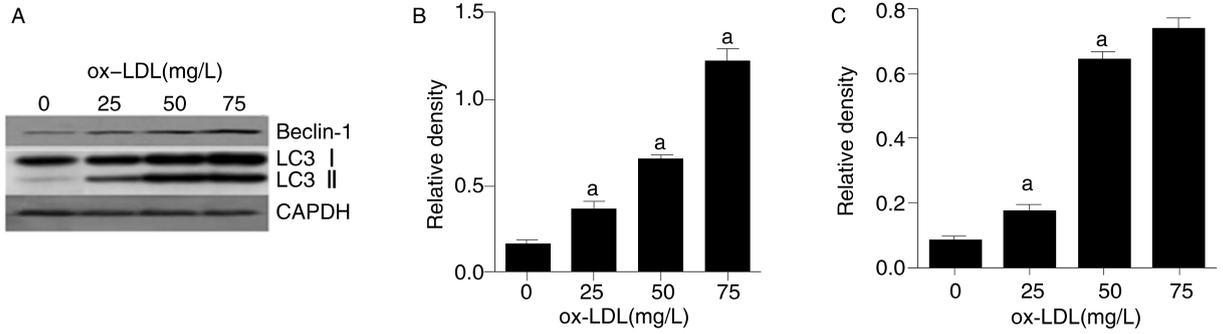


图 1. Beclin-1 蛋白表达及 LC3 II/LC3 I 比值随 ox-LDL 处理浓度增加而明显增加 A 为 Western blot 检测 Beclin-1 和 LC3 的表达; B 为 Beclin-1 蛋白表达的半定量分析; C 为 LC3 II/LC3 I 比值的半定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较; $n = 3$ 。

Figure 1. The expression of Beclin-1 and the ratio of LC3 II/LC3 I were increased with ox-LDL concentration

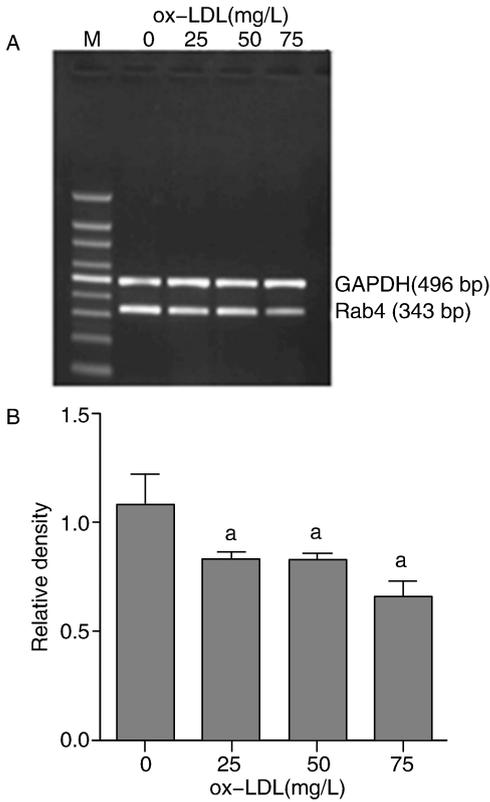


图 2. Rab4 mRNA 表达随 ox-LDL 处理浓度增加而明显降低 A 为 RT-PCR 检测 Rab4 mRNA 表达; B 为 Rab4 mRNA 表达的半定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较; $n = 3$ 。

Figure 2. Rab4 mRNA expression was decreased with ox-LDL concentration

2.3 ox-LDL 对 HUVEC Rab4 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果表明, 正常 HUVEC 有较高水平的 Rab4 表达。ox-LDL 孵育 24 h 后, 随着 ox-LDL 浓度增加, Rab4 蛋白表达明显降低(图 3)。

2.4 Rab4 siRNA 对 HUVEC Rab4 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明, 对照 siRNA 对 HUVEC

的 Rab4 蛋白表达无明显影响, 而当用 Rab4 siRNA 处理后, Rab4 蛋白表达量明显降低(图 4)。

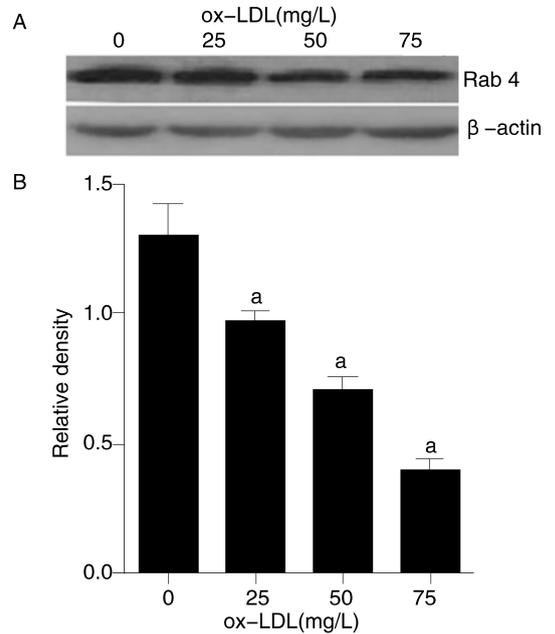


图 3. Rab4 蛋白表达随 ox-LDL 处理浓度增加而明显降低 A 为 Western blot 检测 Rab4 蛋白表达; B 为 Rab4 蛋白表达的半定量分析。a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较; $n = 3$ 。

Figure 3. Rab4 protein expression was decreased with ox-LDL concentration

2.5 Rab4 质粒转染对 HUVEC Rab4 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明, 空白质粒对 HUVEC 的 Rab4 蛋白表达无明显影响, 而当用 Rab4 质粒后, Rab4 蛋白表达量明显增加(图 5)。

2.6 Rab4 对 HUVEC Beclin-1 及 LC3 表达的影响

75 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h, Western blot

结果表明,Rab4 siRNA 处理 HUVEC 后,与对照组相比,自噬标记蛋白 Beclin-1 及 LC3II/LC3I 比值明显增加($P < 0.05$),而对照 siRNA 对血管内皮细胞 Beclin-1 及 LC3II/LC3I 比值无明显影响。Rab4 转染 HUVEC 后,自噬标记蛋白 Beclin-1 及 LC3II/LC3I 比值明显减少,而空白质粒组无明显影响($P < 0.05$)(图 6)。

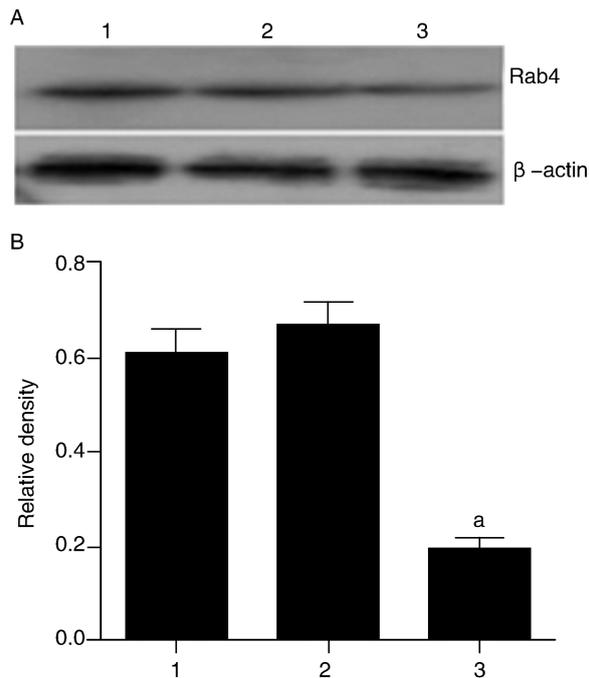


图 4. Rab4 siRNA 降低 HUVEC 的 Rab4 蛋白表达 A 为 Western blot 检测 Rab4 蛋白表达;B 为 Rab4 蛋白表达的半定量分析。1 为对照组,2 为对照 siRNA 组,3 为 Rab4 siRNA 组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较; $n = 3$ 。

Figure 4. Rab4 siRNA decreased the expression of Rab4 protein

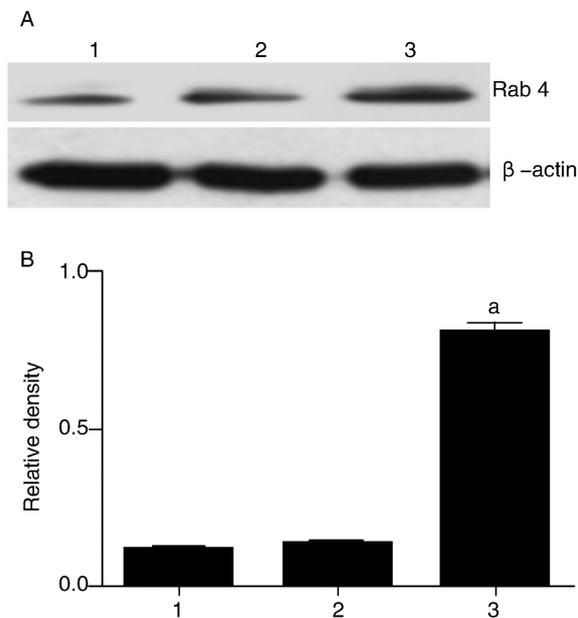


图 5. Rab4 转染上调 HUVEC 的 Rab4 蛋白表达 A 为 Western blot 检测 Rab4 蛋白表达;B 为 Rab4 蛋白表达的半定量分析。1 为对照组,2 为对照质粒组,3 为 Rab4 质粒组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较; $n = 3$ 。

Figure 5. Rab4 transfection increased the expression of Rab4 protein

3 讨论

动脉粥样硬化的发病涉及炎症反应、脂质代谢失调及氧化应激等多种病理生理机制。近来,研究发现淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)降解产生的 β 淀粉样蛋白能抑制一氧化氮产生以及氧化应激增加,导致内皮细胞损伤和炎症反

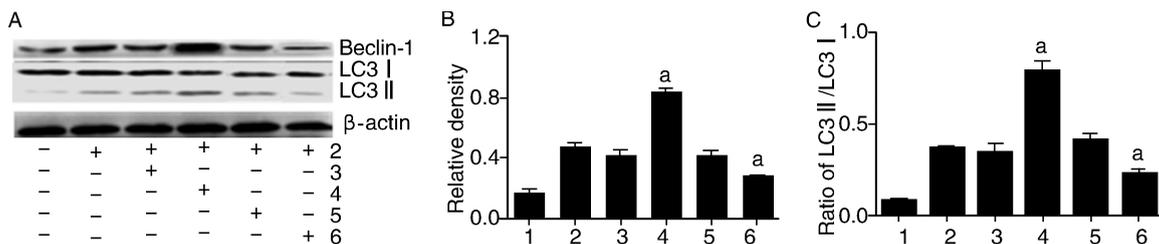


图 6. Rab4 对 HUVEC 自噬的影响 A 为 Western blot 检测 Beclin-1 和 LC3 的表达;B 为 Beclin-1 蛋白表达的半定量分析;C 为 LC3 II/LC3 I 比值的半定量分析。1 为空白对照组,2 为对照组,3 为对照 siRNA 组,4 为 Rab4 siRNA 组,5 为对照质粒组,6 为 Rab4 质粒组。a 为 $P < 0.05$,与对照组比较; $n = 3$ 。

Figure 6. The effect of Rab4 on HUVEC autophagy

应,诱导动脉粥样硬化形成和发展,因此有学者认为“动脉粥样硬化是一种蛋白质调控障碍性疾病”[4,5]。

氧化型低密度脂蛋白是诱导 As 形成和发展的

独立危险因素^[6],一方面,ox-LDL 刺激内皮细胞和单核细胞/巨噬细胞分泌多种炎症因子、趋化因子及黏附分子,从而增强单核细胞和 T 淋巴细胞黏附及向内膜下移行;另一方面,ox-LDL 诱导产生大量

的活性氧,介导细胞内 DNA、蛋白质、脂膜的损伤,导致细胞生存能力降低。在本实验中,ox-LDL 浓度依赖性地上调血管内皮细胞的 Beclin-1 表达以及 LC3 II/LC3 I 比值,表明 ox-LDL 浓度依赖性地上调血管内皮细胞的自噬。

Rab 是鸟苷三磷酸酶的 Ras 超家族成员之一,与胞内蛋白在各细胞器之间的运输有关。当蛋白质在核糖体中合成后,被输送到内质网,再到高尔基体,经过翻译后的修饰,被运输到特定的细胞器或细胞膜上,从而发挥其生物学效应。研究发现,Rab 蛋白的表达异常与肿瘤细胞的增殖和恶变密切相关。Rab25 和 Rab5a 在乳腺癌和卵巢癌中过表达,上调肿瘤细胞的克隆形成、增殖力、生存力和侵袭性^[7,8];Rab23 在萎缩性胃炎、原发性胃癌以及肝癌组织高表达;Rab4 通过调节前组织蛋白酶 L (procathepsin L) 调控黑色素瘤的转移和侵袭^[9]。近来的研究发现,Rab7b 可以通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号途径调控脂多糖诱导的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、一氧化氮、干扰素 β (interferon- β , IFN- β) 以及裂素激活蛋白激酶等的表达,在巨噬细胞 TLR 信号转导中起重要作用^[10]。新近研究表明,Rab 蛋白与细胞的自噬以及凋亡过程密切相关,例如 Rab7b 参与饥饿诱导的自噬,抑制 Rab25 促进卵巢癌细胞的自噬并抑制其增殖^[11]。我们的研究发现,ox-LDL 下调 Rab4 mRNA 以及蛋白的表达,并且采用 Rab4 siRNA 沉默 Rab4 表达后,进一步上调 ox-LDL 所致的血管内皮细胞自噬。而转染 Rab4 质粒后,ox-LDL 诱导的血管内皮细胞自噬降低。我们推测,由于 Rab4 蛋白表达量降低,“核糖体-高尔基体”转运通路受阻,在核糖体合成的蛋白质不能有效转移至高尔基体加工运输,导致功能障碍的蛋白质分子在细胞内堆积,诱导和促进血管内皮细胞的自噬,以减少对内皮细胞的毒性以及对细胞的不利影响,从而抑制内皮细胞的凋亡和坏死,有利于内皮细胞的存活。

此外,刘维燕等^[12]对乳腺癌的研究表明,Rab4 表达在 E 钙粘素 (E-cadherin) 高表达组中显著高于 E 钙粘素低表达组,Rab4 与 E 钙粘素的表达存在正相关。Kachhap 等^[13]对前列腺癌细胞的研究发现,Rab4 促进 E 钙粘素进入内体并循环到细胞膜,从而避免进入晚期内体而被降解。而 ox-LDL 下调血管内皮细胞 E 钙粘素的表达从而增加血管内皮的通透性是动脉粥样硬化发生发展的核心环节^[14]。在该实验中我们证实 ox-LDL 明显下调 Rab4 的表达,因此我们推测 ox-LDL 下调 E 钙粘素的表达可能是通过下调

Rab4 的表达,而抑制 E 钙粘素进入内体并循环到细胞膜,从而被自噬性降解,但具体的作用及分子机制还有待于进一步探讨和证实。

[参考文献]

- [1] Koren I, Kimchi A. Cell biology: Promoting tumorigenesis by suppressing autophagy[J]. *Science*, 2012, 338(6109): 889-890.
- [2] 郭玉松,任艺虹,王琦,等. 普罗布考联合阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者血清 PON1 和 ox-LDL 水平的影响[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2012, 4(2): 49-51.
- [3] 张艳林,曹勇军,尤寿江,等. 自噬对氧化低密度脂蛋白损伤内皮细胞的保护作用[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(39): 792-796.
- [4] d'Uscio LV, Das P, Santhanam AV, et al. Activation of PPAR δ prevents endothelial dysfunction induced by overexpression of amyloid- β precursor protein [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(3): 504-512.
- [5] Kokjohn TA, Van Vickle GD, Maarouf CL, et al. Chemical characterization of pro-inflammatory amyloid-beta peptides in human atherosclerotic lesions and platelets[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(11): 1508-514.
- [6] 杨立斌,刁增利,李海涛. 代谢综合征患者氧化型低密度脂蛋白与颈动脉硬化的相关性[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2011, 3(2): 112-114.
- [7] Agarwal R, Jurisica I, Mills GB, et al. The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer[J]. *Traffic*, 2009, 10(11): 1561-568.
- [8] Zhao Z, Liu XF, Wu HC, et al. Rab5a overexpression promoting ovarian cancer cell proliferation may be associated with APPL1-related epidermal growth factor signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(6): 1454-462.
- [9] Barbarin A, Frade R. Procathepsin L secretion, which triggers tumour progression, is regulated by Rab4a in human melanoma cells [J]. *Biochem J*, 2011, 437(1): 97-107.
- [10] Wang Y, Chen T, Han C, et al. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4 [J]. *Blood*, 2007, 110(3): 962-971.
- [11] Liu Y, Tao X, Jia L, et al. Knockdown of RAB25 promotes autophagy and inhibits cell growth in ovarian cancer cells[J]. *Mol Med Report*, 2012, 6(5): 1006-012.
- [12] 刘维燕,陈前,江道文,等. Rab4a 在乳腺肿瘤的表达及其与表皮生长因子受体-2 和上皮钙黏蛋白表达的关系[J]. *外科理论与实践*, 2011, 16(4): 380-383.
- [13] Kachhap SK, Faith D, Qian DZ, et al. The N-Myc down regulated gene1 (NDRG1) is a Rab4a effector involved in vesicular recycling of E-cadherin[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e844.
- [14] Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, et al. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and down-regulated VE-cadherin on endothelial junctions[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 194(2): 9-17.