

普伐他汀改变小鼠巨噬细胞极性发挥抗炎的机制

李全忠, 张雁, 钱宗杰, 陈华, 吴志伟, 李小励, 莫新玲

(桂林医学院附属医院心血管内科, 广西壮族自治区桂林市 541001)

[关键词] 普伐他汀; 巨噬细胞极性; TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 通过研究普伐他汀改变小鼠巨噬细胞极性而发挥抗炎作用, 探讨他汀类药物防治动脉粥样硬化的机制。**方法** 用 L929 细胞上清诱导小鼠骨髓细胞形成 M0 巨噬细胞及在此基础上以 LPS + IFN- γ 刺激, 使其形成 M1 型巨噬细胞, 然后给予 50 $\mu\text{mol/L}$ 普伐他汀钠、TLR4 特异性受体抑制剂(抑制 12 h 后) + 50 $\mu\text{mol/L}$ 普伐他汀钠进行药物干预; ELISA 测定细胞上清白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 12(IL-12) 的分泌水平; 流式细胞术测定细胞膜表面抗原 CD16/32、CD206 的表达; 荧光定量 PCR 检测 TLR4、MyD88 及 IRF5 mRNA 的表达。**结果** M1 型巨噬细胞 IL-12、CD16/32 的含量和 TLR4、MyD88、IRF5 mRNA 的表达均升高, 普伐他汀钠作用后巨噬细胞 IL-10、CD206 的含量升高, TLR4、MyD88、IRF5 mRNA 的表达降低($P < 0.05$); TLR4 特异性受体抑制剂 + 50 $\mu\text{mol/L}$ 普伐他汀钠干预与单纯性 50 $\mu\text{mol/L}$ 普伐他汀钠干预巨噬细胞相比, 影响不明显($P > 0.05$)。**结论** 普伐他汀可改变巨噬细胞极性发挥抗炎的作用, 可能通过影响 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路具有抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Study on the Mechanism of Pravastatin Changing Polarity Anti-inflammatory in Murine Macrophages

LI Quan-Zhong, ZHANG Yan, QIAN Zong-Jie, CHEN Hua, WU Zhi-Wei, LI Xiao-Li, and MO Xin-Ling

(Department of Cardiovascular, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

[KEY WORDS] Pravastatin; Macrophage Polarity; TLR4-MyD88-IRF5 Cell Signaling Pathway; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of statins to prevent and cure atherosclerosis (As) by the study of pravastatin sodium changes mouse macrophages polarity and anti-inflammatory action. **Methods** Supernatant from L929 cells was used to induce mice bone marrow cells into M0 macrophages, then it was stimulated by LPS plus IFN- γ , and make into M1 macrophages, after that it was given 50 $\mu\text{mol/L}$ pravastatin sodium, TLR4 specific receptor inhibitor for 12 h, then intervened with inhibition of 50 $\mu\text{mol/L}$ pravastatin sodium. ELISA was used to detect cells secretion factors, such as the level of IL-10 and IL-12. Flow cytometry was to detect the cell membrane surface antigen expression of CD16/32, CD206. Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was to detect the expression of TLR4, MyD88 and IRF5 mRNA. **Results** The expression of IL-12, CD16/32 and TLR4, MyD88, IRF5 mRNA in M1 macrophages were increased, but the expression of IL-10, CD206 were higher, TLR4, MyD88, and IRF5 mRNA were lower in macrophages treated by pravastatin sodium ($P < 0.05$). Compared with the 50 $\mu\text{mol/L}$ pravastatin sodium group, the effect of TLR4 specific receptor inhibitor for 12 h, then intervening with inhibition of 50 $\mu\text{mol/L}$ pravastatin sodium group was not obvious ($P > 0.05$). **Conclusions** Pravastatin sodium can change macrophage polarity which plays a role of anti-inflammatory. It may affect the TLR4-MyD88-IRF5 signaling transduction pathway, playing the effect of anti-As.

既往研究表明, 巨噬细胞是一种具有双向调节作用的免疫细胞, 具有促炎与抗炎两种作用。而巨

[收稿日期] 2014-03-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160028); 广西卫生厅重点课题(2010049; 2012006); 广西卫生厅自筹经费科研课题(Z2009051)

[作者简介] 李全忠, 博士, 主任医师, 研究方向为心血管疾病与动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 drquanzhongli@163.com。张雁, 硕士, 研究方向为血脂与冠心病。通讯作者莫新玲, 主任医师, 研究方向为心血管疾病的诊断治疗, E-mail 为 glmx11003@163.com。

噬细胞极性就是这两种极端性质。普伐他汀作为他汀类代表药,在防治动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的过程中发挥了较好的效果。越来越多的事实表明,炎症在 As 的演进过程中发挥了巨大的作用,因而 As 被认为是一种炎症性疾病^[1]。大量文献证明,Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)及其下游的髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、干扰素调节因子 5(interferon regulatory factor 5, IRF5)与炎症反应密切相关^[2],有可能在 As 的发生发展中发挥重要的作用。本课题组前期研究发现^[3],辛伐他汀能改变巨噬细胞的极性而发挥抗炎的作用。他汀类药物是否通过 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路改变巨噬细胞极性发挥抗炎进而抗 As,目前尚无这方面的相关报道。本研究以普伐他汀钠作用于体外培养的小鼠巨噬细胞,在证实普伐他汀钠改变巨噬细胞极性发挥抗炎作用的基础上,通过 TLR4 特异性受体抑制剂的干预,并相关检测,以明确普伐他汀钠是否通过 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路影响其相关基因表达,探讨他汀类药物防治 As 的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠,雌性,4~6 周龄,SPF 级,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma 公司);重组小鼠干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)(Peprotech 公司);普伐他汀钠原料药(浙江海正药业有限公司);小鼠白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素 12(interleukin-12, IL-12) ELISA 检测试剂盒(达科为生物技术有限公司);FITC 标记的大鼠抗小鼠 F4/80 抗体(Biolegend 公司);FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD16/32 抗体(Biolegend 公司);FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD206 抗体(AbD Serotec 公司);RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司);qRT-PCR 的 M-MLV 第一链合成系统(Invitrogen 公司);Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(Thermo Scientific 公司);德国 ZEISS Axiovert-40 型倒置相差显微镜;瑞士 Tecan Infinite M200 Pro 光栅型多功能酶标仪;美国 BD FACSAria III 分析分选型流式细胞仪;德国 Eppendorf AG 22331 型生物分光光度计;英国 Techne TC-512 梯度 PCR 仪;美国 ABI7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 引物序列

TLR4、MyD88、IRF5 和内参 β -actin 的引物均由 Invitrogen 公司设计合成。合成序列见表 1。

表 1. TLR4、MyD88、IRF5 及 β -actin 的引物序列

Table 1. Primer sequences of TLR4, MyD88, IRF5 and β -actin

指 标	序 列
TLR4	Forward 5'-AGACCTCAGCTTCAATGGTG-3'
	Reverse 5'-GAGACTGGTCAAGCCAAGAA-3'
MyD88	Forward 5'-TCCGGCAACTAGAACAGACAGACT-3'
	Reverse 5'-GCGGGCAGACCTTTTCTCAAT3'
IRF5	Forward 5'-AATACCCACACCTTTTGA-3'
	Reverse 5'-TTGAGATCCGGGTTGAGAT-3'
β -actin	Forward 5'-TCCGTAAGACCTCTATGCC-3'
	Reverse 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCC-3

1.4 细胞培养

改进 Vats 等^[4]的方法,颈椎脱臼处死 C57BL/6 小鼠,无菌分离股骨和胫骨,截断骨骺端,2.5 mL 注射器吸入培养基(20%胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液)对骨髓进行冲洗,收集骨髓内容物,2000 r/min 离心 10 min 后弃上清,加入含 L929 成纤维细胞上清液的培养基(20%胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液)中培养,7 天后弃去非贴壁细胞,再在无 L929 成纤维细胞上清液的培养基中进行培养,1 天后所得贴壁细胞即为骨髓来源的巨噬细胞(称为 M0 型巨噬细胞)。细胞换液后,以 LPS (2.5 μ g/L)和 IFN- γ (50 kU/L)加入含培养液的细胞培养瓶中,刺激 12 h,形成 M1 型巨噬细胞。然后分别给予 50 μ mol/L 普伐他汀钠(预实验显示此浓度较佳)、1 mg/L TLR4 特异性受体抑制剂(抑制 12 h 后)+50 μ mol/L 普伐他汀钠与贴壁细胞进行共培养。

1.5 ELISA 检测细胞因子分泌

收集各组巨噬细胞培养上清液,按照试剂盒说明操作,检测 IL-10、IL-12 的分泌。加配好的标准品,设置对照,加生物素标记的抗体混匀,37°C 温育 90 min,洗 4 次,加亲和素-HRP 标记物,37°C 温育 30 min,洗 4 次,加 TMB 显色液,37°C 显色 15 min,加终止液终止反应,10 min 内读板,450 nm 波长检测吸光度(OD 值)。

1.6 流式细胞术测定细胞膜表面抗原表达

胰蛋白酶消化贴壁细胞,计数, 5×10^5 个/管, PBS 洗 1 次,离心后弃上清,再用 100 μ L PBS 重悬细胞,分别加入 0.5 μ g FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD16/32 抗体、0.5 μ g FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD206 抗体、0.25 μ g FITC 标记的大鼠抗小鼠 F4/80 抗体及对应的同型抗体,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,2000 r/min 离心 6 min, PBS 洗 2 次,300 μ L PBS 重悬后用流式细胞仪检测。

1.7 总 RNA 提取及 RT-qPCR

提取细胞总 RNA,操作严格按照说明书进行,分别通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和生物分光光度计检测所得总 RNA 的质量和浓度。逆转录合成 cDNA:Oligo(dT)20 1 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,总 RNA 2 μ L,DEPC 水 8 μ L 混合,共 12 μ L,65 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后,迅速置于冰上冷却,短暂离心后加入 $5 \times$ 第一链合成缓冲液 4 min,0.1 mol/L DTT 2 min,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,最后加入 M-MLV 逆转录酶 1 min,37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min,70 $^{\circ}$ C 加热 15 min 终止反应。两步法扩增目的 DNA 片段:以 β -actin 为内参照, qPCR 反应混合液 9.4 min,上下游引物各 0.75 μ L,cDNA 1.5 μ L,ROX 液 0.05 μ L,去 RNA 酶水 6.35 μ L 混合,95 $^{\circ}$ C 10 min,循环 1 次;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,循环 40 次。基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的表达变化倍数。

1.8 统计学方法

多组间均数差异比较先采用方差分析,再用 S-N-K 检验进行两均数间的两两比较;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2. 巨噬细胞表型指标变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Changes of macrophage phenotype index($\bar{x} \pm s$)

分 组	CD16/32 阳性率	CD206 阳性率	IL-10 (ng/L)	IL-12 (ng/L)
M1 型巨噬细胞组	79.17% \pm 2.01%	6.86% \pm 3.11%	120 \pm 9	490 \pm 16
普伐他汀钠组	40.94% \pm 1.46% ^a	24.20% \pm 1.95% ^a	334 \pm 5 ^a	84 \pm 7 ^a
TLR4 抑制剂 + 普伐他汀钠组	39.61% \pm 2.42%	25.31% \pm 2.30%	342 \pm 11	77 \pm 6

细胞膜抗原检测; $n=10$;分泌因子检测; $n=4$ 。a 为 $P < 0.05$,与 M1 型巨噬细胞组比较。

2.3 TLR4、MyD88 及 IRF5 mRNA 的表达

普伐他汀钠组和 TLR4 抑制剂 + 普伐他汀钠组 TLR4、MyD88 及 IRF5 mRNA 的表达显著低于 M1 型巨噬细胞组($P < 0.05$);TLR4 抑制剂 + 普伐他汀钠组 TLR4、MyD88 及 IRF5 mRNA 的表达与普伐他汀钠组比较差异无显著性($P > 0.05$;图 2)。

2 结 果

2.1 原代巨噬细胞的鉴定

采集的骨髓细胞经 L929 成纤维细胞分泌的巨噬细胞集落刺激因子(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)作用,在含 L929 成纤维细胞上清液的培养基中培养 7 天后,流式细胞术检测小鼠巨噬细胞特异性标记 F4/80,显示巨噬细胞的纯度高达 91%(图 1),可用于后续实验。

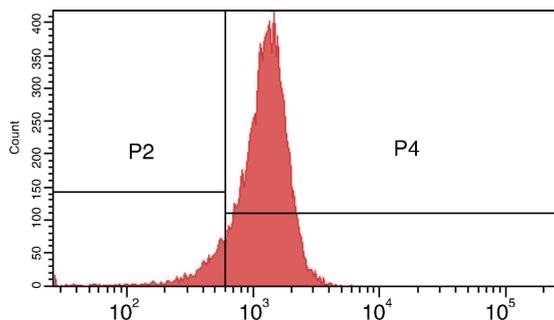


图 1. 流式细胞术检测原代培养的巨噬细胞特异性标记 F4/80
Figure 1. Flow cytometry was used to detect specific marker F4/80 of primary cultured macrophages

2.2 巨噬细胞表型指标变化

普伐他汀钠组巨噬细胞 CD16/32 的阳性表达率和 IL-12 的分泌明显低于 M1 型巨噬细胞组,而 CD206 的阳性表达率和 IL-10 的分泌明显高于 M1 型巨噬细胞组($P < 0.05$);TLR4 抑制剂 + 普伐他汀钠组 CD16/32、CD206 阳性表达率及 IL-10、IL-12 的分泌与普伐他汀钠组比较差异无显著性($P > 0.05$;表 2)。

3 讨 论

众所周知,他汀类药物是 HMG-CoA 还原酶抑制剂,被广泛用于治疗高脂血症。临床试验显示出此类药物可明显减少患者的心血管死亡率。最近的研究表明,他汀类药物对血管壁可能有除外降脂机制的其

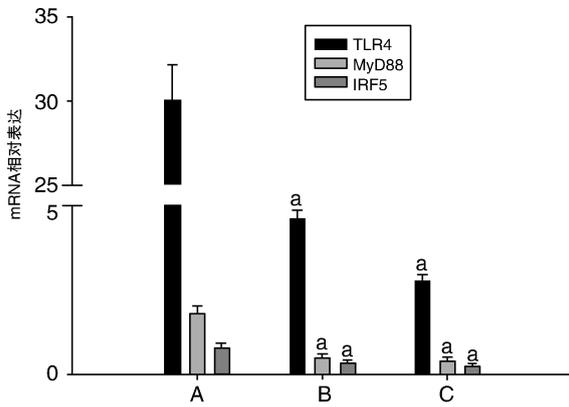


图2. RT-qPCR 检测巨噬细胞 TLR4、MyD88、IRF5 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) A 为 M1 型巨噬细胞组, B 为普伐他汀钠组, C 为 TLR4 抑制剂 + 普伐他汀钠组。a 为 $P < 0.05$, 与 M1 型巨噬细胞组比较。

Figure 2. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of macrophage TLR4, MyD88, and IRF5

它方面的有益作用,比如改善内皮细胞的功能或减少单核/巨噬细胞的促炎效应^[5],但具体机制不清。TLR4 是一种熟知的能与细菌 LPS 结合为特点的受体,通过激活促炎信号通路在固有免疫系统中扮演关键角色。实验研究发现,与单纯性载脂蛋白 E 基因敲除的小鼠相比,TLR4 与载脂蛋白 E 基因双敲除的小鼠能减少主动脉 As 早期病变区域 70% ~ 80% 的脂质沉积及泡沫巨噬细胞的形成,并明显降低炎症因子单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 的表达,反映出 TLR4 的促 As 作用^[6]。作为 TLR 信号途径的重要衔接分子,MyD88 是一种含有 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 结构域的接头蛋白^[7],在介导炎症反应中具有类似“中转站”的职能。研究显示 TLR4 能与相应配体识别并结合后与 MyD88 偶联,从而激活分子开关 IRF5 基因的表达^[8]。另有研究发现,IRF5 基因缺失的小鼠具有阻止系统性红斑狼疮发生发展的特征^[9],提示 IRF5 与炎症活动密切相关,具有促炎的效应。本研究中,采取与人的基因同源性很高的小鼠骨髓细胞作为基础细胞诱导出体外培养的巨噬细胞,用普伐他汀钠药物干预后发现, M1 型巨噬细胞 IL-12、CD16/32 的含量和 TLR4、MyD88、IRF5 mRNA 的表达均升高,普伐他汀钠作用后形成的巨噬细胞 IL-10、CD206 的含量升高,TLR4、MyD88、IRF5 mRNA 的表达降低,在前期实验的基础上进一步印证了他汀类药物具有抗炎效应,且影响 TLR4、MyD88、IRF5 的基因水平;TLR4 特异性受体抑制剂 + 普伐他汀钠药物干预与单纯性普伐他汀钠药物干预巨噬细

胞相比,影响不明显,说明普伐他汀钠作用于巨噬细胞主要是通过 TLR4 受体起作用,推测可能经 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路改变巨噬细胞的极性发挥抗炎的作用,即通过 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路是其关键的可能机制之一。

总之,本研究从细胞分子水平出发,通过检测细胞表型特征及信号通路物质的表达变化,发现他汀类药物可直接改变巨噬细胞的极性发挥抗炎的作用,且此种作用可能主要经 TLR4-MyD88-IRF5 细胞信号传导通路来实现,为临床防治 As 提供了新的依据与思路。当然,在本实验中,研究的着力点在于通过抑制上游的 TLR4 受体,来观测 TLR4-MyD88-IRF5 信号通路三种关键分子的表达情况,而中游 MyD88 及下游 IRF5 被抑制后细胞通路的此三种关键分子再如何表达,还需要做进一步研究。

[参考文献]

- [1] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 165-197.
- [2] Kim S, Jin Y, Choi Y, et al. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81 (11): 1 343-351.
- [3] 李全忠, 孙婧, 韩金杰, 等. 辛伐他汀对小鼠炎症型巨噬细胞极性的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2013, 93 (26): 2 071-074.
- [4] Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, et al. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation [J]. *Cell Metab*, 2006, 4 (1): 13-24.
- [5] Zheng C, Azcutia V, Aikawa E, et al. Statins suppress apolipoprotein C III-induced vascular endothelial cell activation and monocyte adhesion [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34 (8): 615-624.
- [6] Higashimori M, Tatro JB, Moore KJ, et al. Role of Toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31 (1): 50-57.
- [7] Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (7): 14 008-023.
- [8] Takaoka A, Yanai H, Kondo S, et al. Integral role of IRF5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors [J]. *Nature*, 2005, 434: 243-249.
- [9] Yang L, Feng D, Bi X, et al. Monocytes from IRF5^{-/-} mice have an intrinsic defect in their response to pristane-induced lupus [J]. *J Immunol*, 2012, 189 (7): 3 741-750.

(此文编辑 文玉珊)