

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-03-0239-06

## 过表达死亡结构相关蛋白加剧胆固醇 $\beta$ 环糊精诱导的巨噬细胞凋亡

邱飞<sup>1</sup>, 崔淑华<sup>2</sup>, 杨冬梅<sup>1</sup>, 文娟<sup>2</sup>, 李天平<sup>2</sup>, 张燕<sup>2</sup>, 熊国祚<sup>3</sup>, 庾勤慧<sup>1,2</sup>

(1.湖南中医药大学药学院,湖南省长沙市 410208; 2.南华大学生命科学学院药物药理研究所,湖南省衡阳市 421001; 3.南华大学第二附属医院普外科,湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 死亡结构相关蛋白; 胆固醇蓄积; 巨噬细胞; 细胞凋亡

[摘要] 目的 巨噬细胞凋亡在动脉粥样斑块的发展、病灶的坏死、斑块的不稳定以及急性血管事件中起着重要的作用,因此研究死亡结构相关蛋白(Daxx)对巨噬细胞凋亡的调控作用有利于揭示新的药物靶点,为动脉粥样硬化的发生与发展提供理论依据。方法 应用脂质体 2000 将 pCDNA3.1-Daxx、pCDNA3.1 转入 RAW264.7 细胞中,418(500 mg/L)筛选 15 天后,建立过表达 Daxx 稳定细胞株,RT-PCR 和 Western blot 检测稳定细胞株内 Daxx 的转染效率。模型组和转染的细胞用胆固醇  $\beta$  环糊精(Chol:M $\beta$ CD)孵育 48 h,建立 RAW264.7 荷脂和细胞凋亡模型,运用酶荧光法检测细胞内胆固醇蓄积情况,MTT 检测细胞活性,流式细胞术观察细胞凋亡。Western blot 测定细胞内 Caspase3 蛋白的表达。结果 RT-PCR 和 Western blot 检测转染细胞内 Daxx mRNA 和蛋白明显高表达,表明稳定转染成功。在 Chol:M $\beta$ CD 的诱导下,模型组细胞内胆固醇的含量升高,细胞活性下降,凋亡数目增加。而 Daxx 高表达组可以加剧 Chol:M $\beta$ CD 诱导的胆固醇蓄积,细胞活性显著下降,凋亡细胞数目明显增加;同时, Daxx 转染细胞组 Caspase3 蛋白表达明显增高。结论 过表达 Daxx 可以加剧胆固醇  $\beta$  环糊精诱导的巨噬细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Overexpression of Fas Death Domain-associated Protein Increased Macrophage Apoptosis Induced By Cholesterol- $\beta$ -cyclodextrin

QIU Fei<sup>1</sup>, CUI Shu-Hua<sup>2</sup>, YANG Dong-Mei<sup>1</sup>, WEN Juan<sup>2</sup>, LI Tian-Ping<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, XIONG Guo-Zuo<sup>3</sup>, and TUO Qin-Hui<sup>1,2</sup>

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2.Key Laboratory for Pharmacoproteomics, School of Life Science and Technology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3.Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Fas Death Domain-associated Protein(Daxx); Cholesterol Accumulation; Macrophage Cell; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** Macrophage apoptosis plays an important role in development of atherosclerotic plaques, necrotic lesions, plaque instability and acute vascular events, so the study of the regulation of Daxx macrophage apoptosis is favorable to reveal new drug targets, providing a theoretical basis for the occurrence of atherosclerosis. **Methods** The eukaryotic vector of Daxx and pCDNA3.1 were constructed to be stably transfected into RAW264.7 cells, the mRNA and protein expressions of Daxx were used by RT-PCR and Western blot respectively. The intracellular lipid droplets and lipid levels was assayed by enzyme fluorescent analysis. The growth inhibition and apoptotic effect of RAW264.7 cells induced by Chol:M $\beta$ CD were analyzed by MTT and flow cytometric analysis. The protein expressions of caspase3 was assayed by western blotting. **Results** RT-PCR and Western blot analysis showed that the expression of Daxx was significantly in-

[收稿日期] 2015-05-25

[修回日期] 2015-08-13

[基金项目] 国家自然科学基金(31371161,30971267);湖南省高校创新平台开放基金项目(12K096);湖南省杰出青年基金(14JJ1024,2015JJ2117)

[作者简介] 邱飞,硕士研究生,研究方向为心血管药理,E-mail 为 369528295@qq.com。杨冬梅,硕士研究生,研究方向为心血管药理,E-mail 为 1607594758@qq.com。通讯作者庾勤慧,博士,硕士研究生导师,主要研究方向为心血管药理,E-mail 为 184316116@qq.com。

creased in gene-transfected RAW264.7 cells. Chol : M $\beta$ CD induced cholesterol accumulation and apoptosis in RAW264.7 cells was increased by Daxx. Caspase3 protein levels were significantly elevated in Daxx transfected cells.

**Conclusion** Daxx overexpression could increase Chol : M $\beta$ CD induced apoptosis in macrophages.

目前,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)所引起的心脑血管疾病是严重危害人类健康的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。研究表明巨噬细胞凋亡在动脉粥样斑块的发展、病灶的坏死、斑块的不稳定以及急性血管事件起着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。在 As 早期,巨噬细胞凋亡可减少病变成分而抑制病变进展,而在 As 的晚期,大量巨噬细胞凋亡造成了脂质中心区域细胞的稀少,由于泡沫化巨噬细胞凋亡后,凋亡的细胞清除不利,进而发生继发性的坏死,细胞膜完整性破坏,以脂质为主的胞浆内容物释放堆积成脂质池,从而促进斑块脂质中心的形成并扩大。因此,在 As 晚期,巨噬细胞凋亡会引起斑块的稳定性下降,促进动脉粥样硬化的发展<sup>[4-5]</sup>。

寻找调控巨噬细胞凋亡的药物靶点对防御动脉粥样硬化的发生与发展是至关重要的。我们实验室的前期研究发现在人肝癌细胞 HepG2 中,Daxx 可以影响细胞内胆固醇的蓄积代谢<sup>[6]</sup>。Daxx 是 20 世纪 90 年代末期发现的一种 Fas 死亡结构域结合蛋白,它是一种高度保守的蛋白,广泛分布于哺乳动物和人的正常组织细胞以及肿瘤细胞中<sup>[7]</sup>。Daxx 是一种多功能的核蛋白,参与调节细胞转录调控、细胞凋亡等多种生物过程<sup>[8-9]</sup>。研究证实,在 As 中,过多的胆固醇聚集是促使巨噬细胞凋亡的主要原因,因此我们在胆固醇  $\beta$  环糊精诱导巨噬细胞荷脂和凋亡的模型上,观察过表达 Daxx 对巨噬细胞的影响。为寻找调控巨噬细胞凋亡的药物靶点提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 购自中国科学院上海细胞库;高糖培养基 DMEM 购自 GIBCO 公司;新生牛血清购自四季青公司;抗体 Daxx 购自 Santa Cruz,货号为 #sc-53564;抗体 Caspase3 购自 Santa Cruz 公司,货号为 #sc-7148;Chol : M $\beta$ CD 购自 Sigma 公司;质粒 pcDNA3.1(+)/Daxx 来自南华大学万艳萍博士的友情馈赠。

### 1.2 细胞培养

RAW264.7 细胞用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,保持

细胞生长状态良好,按照细胞的生长情况换液及传代,所有实验均使用对数生长期细胞。

### 1.3 细胞转染

转染前一天将细胞消化以  $5 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种至 60 mm 培养皿,等细胞的融合度达到 70%~80% 时进行转染。溶液 1:将 10  $\mu$ L 脂质体 2000 加到 240  $\mu$ L Opti-MEM 优化培养基中稀释,指弹混匀,室温下孵育 5 min;溶液 2:将 10  $\mu$ L pcDNA3.1(+)/Daxx 加入到 240  $\mu$ L 的 Opti-MEM 优化培养基中稀释,指弹混匀,室温下孵育 5 min。然后将溶液 1 加入到溶液 2 中,指弹混匀,室温孵育 20 min。此时,用 Opti-MEM 优化培养基把待转染的细胞漂洗两次,然后每个皿加入 1.5 mL 优化培养基等待转染。孵育完成后取 500  $\mu$ L 脂质体和质粒混合液逐滴加到皿中,轻摇混匀。在 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱中培养 6 h 后;改换含有血清的培养基,在 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱中培养 24 h 后加入 500 mg/L G418 继续培养。每隔 3~5 天换液,连续筛选 14 天后,采用有限稀释法挑选单克隆细胞,经 PCR 和 Western blot 鉴定,确定转染成功的细胞株,用于后续实验。

### 1.4 细胞分组

将正常的 RAW264.7 和转染成功的细胞株进行如下分组:正常组,模型组,转染质粒 Daxx 组,转染空载体组。以上各组细胞除正常组不做任何处理外,其它各组细胞加入含有 20 mg/L Chol : M $\beta$ CD 的无血清培养基培养 48 h 后,进行相关的检测。

### 1.5 酶荧光法检测细胞内胆固醇的含量

取各个组别的对数生长期细胞,接种于直径 100 mm 的培养皿中,置于 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 培养箱中培养,待细胞长到 80%~90% 融合状态时,换用无血清培养基同步化 24 h,各组细胞经过处理后,倒掉培养基,PBS 洗 3 遍后,直接用细胞刮刀刮取细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 300  $\mu$ L 异丙醇吹打混匀,超声破碎 7~10 次,每次 10 s 裂解细胞,然后 4℃,3750 r/min 离心 7 min,取上清,用 BCA 试剂盒蛋白定量。用 7.2% 的三氯乙酸沉淀蛋白后,800 r/min 室温离心 10 min,然后吸取上清液做胆固醇的检测,以异丙醇作为内标作标准曲线,依照 LabAssay™-Cholesterol 试剂盒说明进行操作:①测量细胞内总胆固醇(TC)含量的反应体系:以 1 mL

体积进行计算,取磷酸盐缓冲液 653  $\mu\text{L}$ ,Triton X-100 穿透液 100  $\mu\text{L}$ ,胆酸钠 50  $\mu\text{L}$ ,4-羟基苯乙酸 100  $\mu\text{L}$ ,过氧化物酶 1  $\mu\text{L}$ ,胆固醇酯酶 1  $\mu\text{L}$ ,含胆固醇的上清液 80  $\mu\text{L}$ ,37℃避光孵育 30 min;②测量细胞内游离胆固醇(FC)含量的反应体系:以 1 mL 体积进行计算,磷酸盐缓冲液 654  $\mu\text{L}$ ,不加胆固醇酯酶,其余的试剂体积同上,37℃避光孵育 30 min;③把待测样品上样于比色皿中,放到荧光分光光度仪中,采用 C-18 柱,柱温 37℃,流速每分钟 1 mL,在 294 nm 的紫外光下进行检测,胆固醇按照峰面积进行定量,内标校准,以 mg/g 细胞蛋白为单位。

### 1.6 MTT 法检测细胞的活力

取对数生长期的各组细胞,以每孔  $7.5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板,100  $\mu\text{L}$ /孔,每组细胞按 6 个复孔进行接种,置于 5%  $\text{CO}_2$ ,37℃培养箱中培养。待细胞长到 70%~80%融合状态时,换用无血清培养基同步化 24 h,然后除正常组细胞外,其它各组细胞加入含有 20 mg/L Chol:M $\beta$ CD 的无血清培养基,继续培养 48 h 后,每孔加 5 g/L 的 MTT 20  $\mu\text{L}$ ,培养 4 h 后弃去培养基,每孔加入 150 mL DMSO,轻摇 10 min 混匀,用酶联免疫检测仪在波长 570 nm 处读取光密度值(OD)。按以下公式计算细胞活力:细胞活力(%)=实验组平均吸光度值/正常组平均吸光度值 $\times 100\%$ 。

### 1.7 流式细胞术检测细胞的凋亡

取各个组别的对数生长期细胞,以  $10 \times 10^7$  cells/L 的密度接种于直径 60 mm 的培养皿中,置于 5%  $\text{CO}_2$ ,37℃培养箱中培养,待细胞长到 70%~80%融合状态时,换用无血清培养基同步化 24 h,然后除正常组细胞外,其它各组细胞加入含有 20 mg/L Chol:M $\beta$ CD 的无血清培养基培养 48 h 后收集细胞。PBS 洗 3 次,胰蛋白酶消化,用含 10%FBS 的 DMEM 培养基终止消化,吹打成细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,用 2 mL PBS 洗细胞沉淀 1 次,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用残余 PBS 吹打成细胞悬液,吸入到含有 1 mL,75%冰乙醇的 EP 管中,4℃固定过夜。样品寄到北京中国中医科学院基础理论研究所进行检测。

### 1.8 RT-PCR

取各个组别的对数生长期细胞,消化接种于直径 60 mm 的培养皿中,置于 5%  $\text{CO}_2$ ,37℃培养箱中培养,待细胞长到 90%~95%融合状态时,提取总 RNA。

根据总 RNA 提试剂盒(#SK1322,上海生工公

司)说明书操作,获得总 RNA 进行定量后,按照逆转录试剂盒说明书,对 RNA 进行逆转录(cDNA 的合成),其中引物的设计是在 Pubmed 里获取人 Daxx,小鼠 GAPDH 蛋白质编码区序列(CDS),设计特异性的基因扩增引物。Daxx 引物:Forward: 5'-CGTTGACCCTGCACTATCAGA-3'; Reverse: 5'-GGC-CCTCACCAGAATCCAA-3'; GAPDH 引物:Forward: 5'-CTGGGCTACACTGAGCACCAG-3'; Reverse: 5'-CCAGCGTCAAAGGTGGAG-3'。

PCR 反应体系的组成为:2 $\times$ PCR master 12.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 1  $\mu\text{L}$ ,上下游的引物各 1  $\mu\text{L}$ (1  $\mu\text{mol/L}$ ),去离子高压水 9.5  $\mu\text{L}$ ,指弹混匀后,短速离心,按以下条件进行反应:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 55 s,进行 32 个循环,最后 72℃总延伸 2 min。

### 1.9 Western blot 检测蛋白的表达

取 90%~95%融合度生长状态良好的各组细胞,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入 RIPA 裂解液和 PMSF 的混合液(比例为 8:1)置于冰上裂解 15 min,用细胞刮刮下蛋白,4℃,13 000 r/min 离心 15 min,吸取上清至 EP 管中放到-80℃冰箱中备用。蛋白质含量用 BCA 蛋白定量的方法进行计算。然后在提取的蛋白质中加入 5 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液,沸水中煮蛋白质 10 min,使其变性,4℃保存备用。配制 8%~12%聚丙烯酰胺凝胶,进行电泳分离(积层胶 80 V,分离胶 120 V),350 mA 湿转 PVDF 膜 3 h,TBST 配制的 5%脱脂牛奶封闭液轻摇封闭 2 h,按抗体说明书的比例加入稀释的一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 15 min,按 1:1 000 的比例加入稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠二抗,37℃孵育 45 min,然后用 TBST 洗膜 4 次,每次 10~15 min,用化学发光显影法进行显影,以分析软件 AlphaImager 2200 分析产物的光密度值(灰度比值=蛋白条带光密度/内参照蛋白条带光密度 $\times 100\%$ )。

### 1.10 统计学方法

所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  来表示。用 SPSS 11.0 进行数据统计处理,组间的比较用单因素方差分析,然后用 LSD-t 检验来进行均数间的多重比较,以  $P < 0.05$  来判定差异有无显著性意义。

## 2 结 果

2.1 过表达死亡结构相关蛋白稳定细胞株的建立  
将质粒 pCDNA3.1(+)-pCDNA3.1(+)-Daxx 采



用脂质体转染法转入 RAW264.7 细胞,经 500 mg/L 的 G418 筛选两周后所形成的稳定细胞株,经 RT-PCR 法检测细胞中 Daxx mRNA 的表达(图 1A),Western blot 检测 Daxx 蛋白的表达(图 1B 和图 1C)。结果显示,转入 Daxx 质粒的 Daxx 组中 Daxx mRNA 和蛋白的表达都明显高于正常组,而转入空载体 pCDNA3.1(+ )的 vector 组中 Daxx mRNA 和蛋白的表达与正常组无显著性差异。证明在 RAW264.7 细胞中建立过表达 Daxx 稳定细胞株建立成功,符合实验需求。

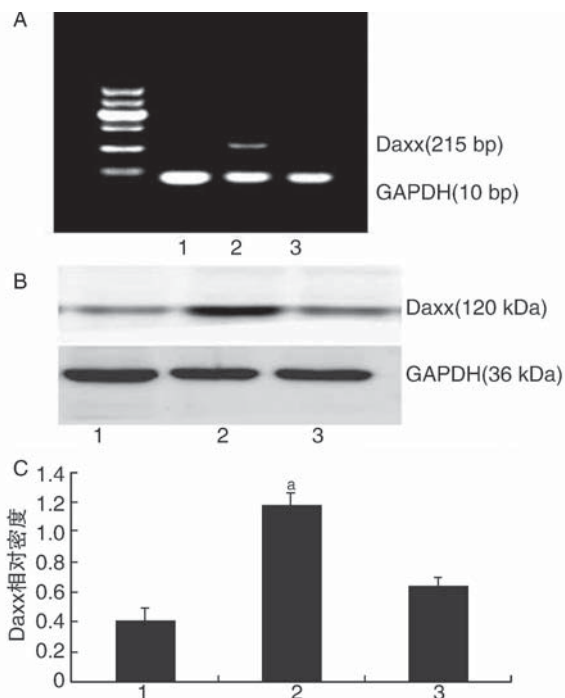


图 1. 过表达 Daxx 细胞稳定株转染效率的检测 A 为 RT-PCR 法检测 Daxx mRNA 的表达, B 为 Western-blot 检测 Daxx 蛋白的表达, C 为 Daxx 蛋白相对密度的分析。其中 1 为正常组, 2 为转染 Daxx 质粒的 Daxx 组, 3 为转染空载体的 vector 组。a 为  $P < 0.05$ , 与正常组比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )。

Figure 1. Detection of the transfection efficiency of Daxx in gene-transfected RAW264.7 cells

## 2.2 过表达死亡结构相关蛋白增加胆固醇 $\beta$ 环糊精诱导的 RAW264.7 巨噬细胞内的胆固醇含量

为了进一步确定过表达 Daxx 对 Chol : M $\beta$ CD 处理的 RAW264.7 细胞内胆固醇含量的作用,除正常细胞组外,其它各组均用 20 mg/L Chol : M $\beta$ CD 处理 48 h,用酶荧光法检测细胞内胆固醇的含量(图 2)。结果发现 Chol : M $\beta$ CD 孵育后模型组细胞内游离胆固醇明显升高,说明细胞荷脂模型建立成功。与模型组相比,转染空载体组细胞内游离胆固醇无明显差

异;而转染 Daxx 组细胞内游离胆固醇升高,差异具有显著性。说明过表达 Daxx 可以增加 Chol : M $\beta$ CD 孵育的 RAW264.7 巨噬细胞内的胆固醇含量。

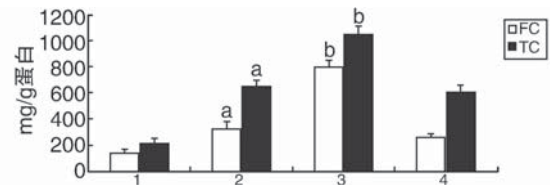


图 2. 酶荧光法检测 Daxx 对 Chol : M $\beta$ CD 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞内的胆固醇含量的影响 FC 为游离胆固醇, TC 为总胆固醇。其中 1 为正常组, 2 为模型组, 3 为转染 Daxx 质粒的 Daxx 组, 4 为转染空载体的 vector 组。a 为  $P < 0.05$ , 与正常组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )。

Figure 2. Enzyme fluorescent spectrum detection of the Daxx on Chol : M $\beta$ CD-induced cholesterol accumulation in RAW264.7 cells

## 2.3 过表达死亡结构相关蛋白加强胆固醇 $\beta$ 环糊精诱导 RAW264.7 巨噬细胞的损伤作用

为了观察过表达 Daxx 对 Chol : M $\beta$ CD 处理的细胞活性的影响,除正常组外,其它各组均采用 20 mg/L Chol : M $\beta$ CD 进行孵育 48 h, MTT 法测定 OD 值。细胞活力结果显示(图 3):与正常组细胞活性相比,模型组细胞活性明显降低,说明细胞活性模型建立成功;与模型组比,转空载体组细胞活性无统计学意义;而转染 Daxx 细胞的活性明显低于模型组。说明 Daxx 可以加强 Chol : M $\beta$ CD 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的损伤作用。

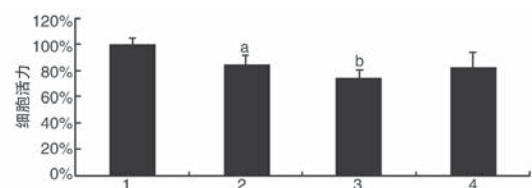


图 3. MTT 法检测 Daxx 对 Chol : M $\beta$ CD 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的活力的影响 1 为正常组, 2 为模型组, 3 为转染 Daxx 质粒的 Daxx 组, 4 为转染空载体的 vector 组。a 为  $P < 0.05$ , 与正常组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与模型组比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )。

Figure 3. The viability of Daxx on Chol : M $\beta$ CD-induced apoptosis in RAW264.7 cells assayed by MTT

## 2.4 过表达死亡结构相关蛋白促进胆固醇 $\beta$ 环糊精诱导的巨噬细胞凋亡

为了验证过表达 Daxx 对 Chol : M $\beta$ CD 处理的

细胞的凋亡的作用,除正常组外,其它各组均采用 20 mg/L Chol:M $\beta$ CD 进行孵育 48 h,用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况(图 4)。与正常组细胞比较,模型组细胞凋亡率明显升高,有统计学意义;与模型组相比,转空载体组细胞凋亡率没有明显差异;而转染 Daxx 组的细胞凋亡率升高,差异有显著性。说明 Daxx 可以促进 Chol:M $\beta$ CD 诱导的巨噬细胞的凋亡。

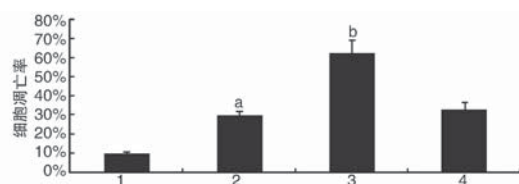


图 4. 流式细胞术观察 Daxx 对 Chol:M $\beta$ CD 诱导的巨噬细胞凋亡的影响 1 为正常组,2 为模型组,3 为转染 Daxx 质粒的 Daxx 组,4 为转染空载体的 vector 组。a 为  $P < 0.05$ ,与正常组比较; b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )。

Figure 4. The cell apoptosis of Daxx on Chol:M $\beta$ CD-induced apoptosis in RAW264.7 cells was detected by flow cytometry

## 2.5 过表达死亡结构相关蛋白对胆固醇 $\beta$ 环糊精诱导的巨噬细胞半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白 3 活化片段表达的影响

半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白 3 (cysteinyln apartate specific protease 3, Caspase3)被认为是细胞凋亡的最终执行分子,它的活化代表凋亡的进行。因此我们用 Western blot 检测了它的活化片段(17 kDa)的蛋白表达水平以评价巨噬细胞的凋亡水平。与正常组相比,模型组内 Caspase3 活化片段表达明显增加,具有显著统计学意义。与模型组相比,转染的空载体组中 Caspase3 活化片段的表达无明显差异;而 Daxx 组中的 Caspase3 活化片段的表达明显升高,具有显著性差异(图 5)。说明 Daxx 过表达明显加剧了 Chol:M $\beta$ CD 诱导的巨噬细胞凋亡。

## 3 讨论

在 As 的病变晚期,巨噬细胞凋亡会引起斑块的稳定性下降,促进动脉粥样硬化的发展。有很多诱导因素都可以诱导巨噬细胞凋亡,如肿瘤坏死因子,氧化应激,氧化低密度脂蛋白,未酯化的胆固醇等<sup>[10-13]</sup>。而在本研究中,我们以  $\beta$  环糊精和胆固醇的包合物为诱导巨噬细胞凋亡的因素,建立巨噬细胞荷脂和凋亡模型。我们观察到 Chol:M $\beta$ CD 可以

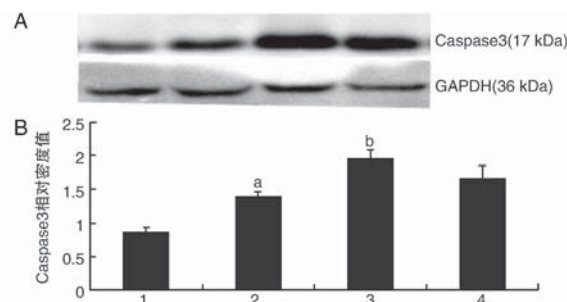


图 5. Daxx 对 Chol:M $\beta$ CD 处理的细胞内 Caspase3 蛋白表达的影响 A 为 Western blot 检测 Caspase3 蛋白的表达,B 为 Caspase3 蛋白相对密度的分析。1 为正常组,2 为模型组,3 为转染 Daxx 质粒的 Daxx 组,4 为转染空载体的 vector 组。a 为  $P < 0.05$ ,与正常组比较; b 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )。

Figure 5. The effect of Daxx on Chol:M $\beta$ CD-induced caspase3 protein expression

促进巨噬细胞胆固醇蓄积并诱导巨噬细胞凋亡。

之前的研究证实 Fas 死亡信号通路是胆固醇诱导巨噬细胞凋亡的主要途径<sup>[14]</sup>。因此,Daxx 有可能在已经提出的 Fas 介导的凋亡途径中发挥着重要作用。Daxx 是一种与 Fas 受体胞浆死亡结构域相关结合蛋白,可以介导细胞的凋亡。我们实验室前期研究发现 Daxx 介导了低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞凋亡并可能通过调节小凹蛋白的表达影响细胞内胆固醇的蓄积<sup>[15-17]</sup>,但是 Daxx 是否介导 Chol:M $\beta$ CD 诱导的巨噬细胞凋亡并不清楚。在本研究中,我们通过酶荧光法、MTT 和流式细胞术等方法发现过表达 Daxx 可以加剧 Chol:M $\beta$ CD 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞胆固醇蓄积,降低细胞活性,促进细胞凋亡。

半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白 (cysteinyln apartate specific protease, Caspases) 是细胞程序性死亡的一组关键调控因子,Caspases 的激活在细胞凋亡的执行过程中起重要作用<sup>[18]</sup>。在目前发现的 Caspase 家族成员中 Caspases3 与细胞凋亡的关系最为密切,参与多种因素诱导的细胞凋亡<sup>[19]</sup>。早在 2003 年就有人发现 Fas-FasL 诱导的 Caspase3 剪切活化是调控巨噬细胞凋亡的重要机制<sup>[20]</sup>,因此在本实验中,我们通过观察 Caspase3 的活化片段来进一步验证过表达 Daxx 对 Chol:M $\beta$ CD 诱导巨噬细胞凋亡的影响。

综上所述,我们证实了过表达 Daxx 可以加剧 Chol:M $\beta$ CD 诱导的巨噬细胞胆固醇蓄积和细胞凋亡。这为 Daxx 调控 Chol:M $\beta$ CD 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的凋亡提供了理论依据,也为 As 提供了一个可能的治疗方向。

## [参考文献]

- [1] 胡旭堂,胡海英,王志禄. 巨噬细胞及其亚型在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(7): 747-751.
- [2] Qu SL, Fan WJ, Zhang C. Mip1 overexpression protects macrophages from oxLDL-induced foam cell formation and cell apoptosis [J]. DNA Cell Biol, 2014, 33(12): 839-846.
- [3] Zhenyu Huang, Qingping Liu, Wenzhe Li. 7-Ketocholesterol Induces Cell Apoptosis by Activation of Nuclear Factor kappa B in Mouse Macrophages [J]. Acta Med, 2010, 64(2): 85-93.
- [4] 张欣, 张晓卉. 动脉粥样硬化中巨噬细胞增殖调控的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(9): 961-964.
- [5] 陈孔, 曾高峰, 唐朝克. 巨噬细胞增殖和凋亡与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(9): 965-969.
- [6] Tuo QH, Liang L, Zhu BY, et al. Effect of Daxx on cholesterol accumulation in hepatic cells [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3): 435-440.
- [7] Khaiboullina SF, Morzunov SP, Boichuk SV. Death-domain associated protein-6 (DAXX) mediated apoptosis in hantavirus infection is counter-balanced by activation of interferon-stimulated nuclear transcription factors [J]. Virology, 2013, 443(2): 338-348.
- [8] Muromoto R. Death domain-associated protein (DAXX)-mediated regulation of transcription and cell death [J]. Yakugaku Zasshi, 2012, 132(9): 979-984.
- [9] Yao ZI, Zhang Q, Li X. Death domain-associated protein 6 (Daxx) selectively represses IL-6 transcription through histone deacetylase 1 (HDAC1)-mediated histone deacetylation in macrophages [J]. J Biol Chem, 2014, 289(13): 9372-379.
- [10] Qiu H, Fan Y, Joyee AG, et al. Type I IFNs enhance susceptibility to Chlamydia muridarum lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages [J]. J Immunol, 2008, 181(3): 2092-102.
- [11] Liu B, Zhang B, Guo R. Enhancement in efferocytosis of oxidized low-density lipoprotein-induced apoptotic RAW264.7 cells through Sirt1-mediated autophagy [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(3): 523-533.
- [12] Lee HN, Surh YJ. Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(6): 759-769.
- [13] Wu C, Luan H, Zhang X. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e95452.
- [14] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway [J]. J Biol Chem, 2000, 275(31): 23807-813.
- [15] Su B, Yang YB, Tuo QH, et al. Anti-apoptotic effects of probucol are associated with downregulation of Daxx expression in THP-1 macrophage [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(1): 37-45.
- [16] HE Qing Zhi, Tuo QH. Daxx mediates oxidized low-density lipoprotein induced cholesterol accumulation and apoptosis in macrophages by upregulating caveolin-1 expression [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2010, 37(8): 881-890.
- [17] Xiong G, Li L, Tuo Q. Subcellular localization of DAXX influence ox-LDL induced apoptosis in macrophages [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(11): 7183-190.
- [18] Wu X, Deng G, Hao XA. caspase-dependent pathway is involved in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promoted apoptosis in Bacillus Calmette-Guerin infected RAW264.7 macrophages [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 5045-062.
- [19] Russe OQ, M ser CV, Kynast KL, et al. LPS inhibits caspase 3-dependent apoptosis in RAW264.7 macrophages induced by the AMPK activator AICAR [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 447(3): 520-525.
- [20] Nhan TQ. The p17 cleaved form of caspase-3 is present within viable macrophages in vitro and in atherosclerotic plaque [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(7): 1276-282.

(此文编辑 李小玲)