

ox-LDL 经由 LOX-1 受体对 PPAR γ -LXR α -ABCA1 通路激活的作用研究

余承洁¹, 李敬达², 修志龙², 刘庆平¹

(1.辽宁省糖脂代谢重点实验室 大连大学生命科学与技术学院,辽宁省大连市 116600;

2.大连理工大学生命科学与技术学院,辽宁省大连市 116024)

[关键词] 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 氧化型低密度脂蛋白; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 肝 X 受体 α ; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1

[摘要] 目的 探讨氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)经由血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)受体对 PPAR γ -LXR α -ABCA1 通路激活的作用。方法 浓度梯度 ox-LDL(0~40 mg/L, 12 h)刺激 J774A.1 巨噬细胞,检测 LXR α 、ABCA1 的表达。构建 293T 细胞 LOX-1 过表达的 PPAR γ 双荧光素酶报告基因系统,激光共聚焦及 Western blot 检测 LOX-1 的分布与表达,双荧光素酶报告基因系统检测 PPAR γ 的转录活化情况。对 J774A.1 巨噬细胞分别进行 LOX-1 siRNA 和 PPAR γ siRNA 沉默,ox-LDL(30 mg/L, 12 h)孵育后检测 LXR α 、ABCA1 蛋白的表达。结果 ox-LDL 可显著上调 J774A.1 细胞 LXR α 和 ABCA1 的表达($P < 0.01, n = 3$)。LOX-1 过表达的 PPAR γ 双荧光素酶报告基因系统检测显示 ox-LDL 能够通过 LOX-1 增加 PPAR γ 的转录活性;对 J774A.1 巨噬细胞分别进行 LOX-1 siRNA、PPAR γ siRNA 沉默后发现,LXR α 和 ABCA1 的表达均显著降低($P < 0.01, n = 3$)。结论 ox-LDL 可通过 LOX-1 受体激活 PPAR γ 转录活性,从而上调 LXR α 、ABCA1 蛋白表达,完成 PPAR γ -LXR α -ABCA1 信号通路的激活。

[中图分类号] Q75

[文献标识码] A

Ox-LDL activate PPAR γ -LXR α -ABCA1 to transcript by LOX-1 receptor

YU Cheng-Jie¹, LI Jing-Da², XIU Zhi-Long², LIU Qing-Ping¹

(1.Key Laboratory of Glucolipid Metabolism in Liaoning Province & College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116600, China; 2.College of Life Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

[KEY WORDS] Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1; Oxidized low density lipoprotein; Peroxisome proliferators-activated receptor γ ; Liver X receptor α ; ATP-binding cassette transporter A1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on activation of PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway via lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) receptor. **Methods** The expression of liver X receptor α (LXR α) and ABCA1 was detected by stimulating J774A.1 macrophages with concentration gradient ox-LDL (0~40 mg/L, 12 h), the expression of LOX-1 was detected by laser confocal microscopy and Western blot, the transcriptional activation of peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) was detected by double luciferase reporter gene, the expression of LXR α and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) protein was detected after incubation with J774A.1 macrophages by LOX-1 siRNA and PPAR γ siRNA silencing, ox-LDL (30 mg/L, 12 h). **Results** Ox-LDL significantly up-regulated the expression of LXR α and ABCA1 in J774A.1 cells (significantly different from the cell untreated by ox-LDL as control, $P < 0.01, n = 3$). LOX-1 overexpression of PPAR γ double luciferase reporter gene system showed that ox-LDL increased the transcriptional activity of PPAR γ by LOX-1. LOX-1 siRNA and PPAR γ siRNA were treated with J774A.1 macrophages, respectively, and LXR α and ABCA1 were expressed (significantly different from the cell untreated by siRNA as control, $P < 0.01, n = 3$). **Conclusion** Ox-LDL activates PPAR γ transcriptional activity by LOX-1 receptor, thereby upregulating LXR α and ABCA1 protein expression and activating PPAR γ -

[收稿日期] 2017-02-07

[修回日期] 2017-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81270361)

[作者简介] 余承洁,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化细胞分子生物学,E-mail 为 13478916083@163.com。通讯作者刘庆平,博士,教授,研究方向为动脉粥样硬化细胞分子生物学,E-mail 为 qingpingliu40@126.com。

LXR α -ABCA1 signal pathway.

动脉粥样硬化作为心脑血管疾病的主要病理基础,已成为威胁人类健康的最主要疾病之一。其发病过程主要涉及到血管壁炎症、免疫细胞及平滑肌细胞迁移、脂类代谢紊乱等作用^[1],其中,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)驱动的巨噬细胞泡沫化是动脉粥样硬化早期发病阶段的主要特征^[2]。研究显示,随着 ox-LDL 在血管内膜空间不断积累,单核细胞趋化而来的巨噬细胞能够通过清道夫受体(scavenger receptor, SR)大量摄取 ox-LDL^[3]。此后,ox-LDL 在巨噬细胞内经过一系列的降解及酯化作用下,以胆固醇酯的形式存储于脂滴中。另一方面,巨噬细胞能够启动由三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)及载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, ApoA1)介导的胆固醇逆转运作用,将细胞内的胆固醇酯转移至高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL),进而流向肝脏进行代谢分解^[4]。在动脉粥样硬化条件下,巨噬细胞胆固醇流入与流出平衡被打破,导致胆固醇在细胞中过度积累,进而引发泡沫细胞及动脉粥样硬化斑块形成^[5]。

血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)作为 ox-LDL 的特异性受体,密切参与了巨噬细胞的泡沫化过程。研究显示,LOX-1 能够通过调节 CD36 等受体的表达,影响巨噬细胞泡沫化进程^[6]。此外,在 ox-LDL 的作用下,LOX-1 能够启动下游炎症反应相关信号通路,诱导炎症因子的分泌,最终引发血管炎症反应及动脉粥样硬化斑块形成^[7]。

过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ)是核受体超家族中的一类配体激活的核转录因子,能够调节脂质代谢,抑制巨噬细胞泡沫化,延缓动脉粥样硬化形成^[8]。PPAR γ 的激活,可启动下游肝 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α)、ABCA1 等基因的转录翻译,上调二者的蛋白表达,进而促进胆固醇逆转运作用,抑制巨噬细胞泡沫化。研究显示,PPAR γ 的活化受蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的调节^[9],同时 LOX-1 能够调节 PKC 的磷酸化^[10],暗示 LOX-1 受体与 PPAR γ 的活化可能存在着密切的调控关系,LOX-1 作为巨噬细胞表面信号分子,激活 PPAR γ -LXR α -ABCA1 信号传导,从而启动胆固醇逆转运作用尚未见详细报道。为此,本研究利用报告基因及基因沉默等手段,观察在 ox-LDL 作用下 LOX-1

与 PPAR γ 转录活化的相互关系,为研究 LOX-1 受体在胆固醇逆转运过程中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

小鼠巨噬细胞(J774A.1)和人胚肾细胞(HEK293T,简称 293T)购于 ATCC; Anti-LOX-1(ab60178)和 Anti-LXR α (ab176323)抗体购于 Abcam 公司; Anti-PPAR γ (sc-7196)和 Anti-GAPDH(sc-25778)抗体购于 Santa Cruz 公司; Anti-ABCA1(NB,400-105)抗体购于罗福斯生物制剂公司;罗丹明标记的山羊抗鼠抗体购于 Jackson 公司; β -actin(兔抗人)购于 Chemicon 公司;LRP 标记的二抗(羊抗兔 IgG)购于 KPL 公司;人 LDL(d=1 g/L)购于北京协生生物有限公司;含有人 PPAR γ 全长的 pcDNA-flag-PPAR γ 表达质粒、PPRE(PPAR 应答元件)的萤火虫荧光素酶报告基因质粒 PPRE-X3-TK-luc 和海肾荧光素酶质粒 pRL-TK 购于 Addgene 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于 Promega 公司;LOX-1 siRNA 购于吉马公司;Lipofectamin2000 和 Opti-MEM medium 购于 Invitrogen 公司;RIPA 细胞裂解液购于碧云天生物技术研究所;蛋白预染 Marker 及 BCA 蛋白浓度检测试剂盒购于 Thermo 公司;ECL 显色液购于 Advansta 公司。

1.2 ox-LDL 的制备

将 2 mg 天然 LDL 稀释于 25 mL 预热的 PBS 溶液中,混匀,加入 0.27 mL 500 μ mol/L CuSO₄·5H₂O,置于 37 $^{\circ}$ C 温箱。待氧化 8 h 后,加入 0.135 mL 200 mmol/L EDTA 终止氧化。通过透析将氧化体系中的 CuSO₄ 及 EDTA 除去,并对透析后的样品进行超滤浓缩。最后分别使用 BCA 检测试剂盒及 MDA 试剂盒对 ox-LDL 的蛋白浓度及氧化程度进行测定。当丙二醛浓度在 9.6~16.2 μ mol/L 范围内,说明氧化成功^[11]。

1.3 细胞培养及 ox-LDL 浓度梯度处理

J774A.1、293T 细胞(2.5×10^6 个细胞/25 cm²)贴壁培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中(另含 100 kIU/L 青霉素、0.1 g/L 链霉素、10 mmol/L 碳酸氢钠和 1 mmol/L 丙酮酸钠)。将处于对数生长期的 J774A.1 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板,过夜培养后加入含有相应浓度 ox-LDL 的培养基进行刺激处理。待刺激处理结束后收获细胞并使用 RIPA 细胞裂解液提取细

胞总蛋白,进行 Western blot 检测分析。

1.4 LOX-1 及 PPAR γ 在 293T 细胞中的过表达

将处于对数期的 293T 细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔板中,过夜培养待细胞生长汇合度达到 80%时,根据 Lipofectamine2000 转染试剂操作方案,将 350 ng pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 质粒及 350 ng pcDNA-flag-PPAR γ 质粒共转染入 293T 细胞中。转染 24 h 后,收集细胞并提取细胞总蛋白。通过 Western blot 对过表达进行特异性检测。

1.5 激光共聚焦观察 LOX-1 过表达

将处于对数期的 293T 细胞以 2.5×10^5 个每皿的密度接种于激光共聚焦小皿中,培养过夜后,使用 Lipofectamine2000 转染试剂,将 350 ng pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 质粒及 350 ng pcDNA-flag-PPAR γ 质粒以脂质体的方式共转染入 293T 细胞中。转染 24 h 后,使用预热的 PBS 溶液清洗细胞 4 次。使用 4%多聚甲醛固定 10 min,1%gelatin 封闭 30 min。随后,LOX-1 抗体(1:100)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用于细胞 LOX-1 的定位检测。PBS 洗 3 次后,罗丹明标记的山羊抗鼠抗体(1:100)于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。孵育结束后 PBS 洗去非特异性结合的二抗,并向小皿中加入防脱色试剂,最后于激光共聚焦显微镜下观察 LOX-1 过表达情况。

1.6 双荧光素酶报告基因系统检测 PPAR γ 转录活化

对数期生长的 293T 细胞以 1×10^5 的密度接种于 24 孔板。培养过夜后,使用 Lipofectamine2000 转染试剂将 pcDNA-flag-PPAR γ 质粒(350 ng)、PPRE-X3-TK 质粒(200 ng)、pRL-TK 质粒(100 ng)与 pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 质粒(350 ng)共转染入 293T 细胞。在研究 LOX-1 对 PPAR γ 激活影响的实验中,只将前 3 种质粒共转入 293T 细胞。细胞转染 24 h 后,使用 ox-LDL、LDL、PBS 刺激细胞 24 h。收集细胞,根据双荧光素报告基因检测试剂盒操作方案^[12],首先测定细胞中萤火虫荧光素酶的活性以确定 PPAR γ 的激活情况,终止反应后立即加入 Stop & Glo 溶液,检测海肾荧光素酶的活性以作为参比对照,检测分析 PPAR γ 的转录活性。

1.7 LOX-1 siRNA、PPAR γ siRNA 沉默实验

J774A.1 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔板中,使用 Lipofectamine2000 分别将 LOX-1 siRNA、PPAR γ siRNA、Scramble siRNA 以 100 nmol/L 的浓度转染入细胞,其中 Scramble siRNA 作为对照。转染 24 h 后,Western blot 分析 LOX-1 与 PPAR γ 的基

因沉默效率。对于研究 LOX-1 与 PPAR γ 在信号通路中相互作用的实验中,转染 24 h 后,使用 ox-LDL (30 mg/L)处理细胞 12 h,随后收集细胞并通过 Western blot 分析细胞中 LXR α 和 ABCA1 的蛋白表达。

1.8 Western blot 检测

将收集得到的细胞用预冷的 PBS 清洗 3 次,之后使用 RIPA 裂解液提取细胞全蛋白,并通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定样品中总蛋白浓度。按每孔 50 μ g 的蛋白量进行样品上样,12%SDS-PAGE 胶进行电泳分离。转膜、封闭后,4 $^{\circ}$ C 条件下孵育一抗稀释液(1:1000)过夜。TBST 缓冲液洗膜 10 min \times 3 次后,室温条件下孵育二抗稀释液(1:1000) 1 h。TBST 洗膜后,ECL 显色发光,上机拍照后,通过灰度软件对数据进行计算分析。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-way ANOVA 进行组间比较,两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 梯度浓度作用下 LXR α 、ABCA1 的表达变化

研究显示,在 ox-LDL 作用下,巨噬细胞能够启动胆固醇逆转运途径,将细胞中过多的胆固醇运送至 HDL 中,而后在肝脏中降解,在此过程中 ABCA1 发挥了关键作用。此外,LXR α 作为 ABCA1 的表达调控元件正向调节了 ABCA1 的蛋白表达。本研究观察了在 ox-LDL 作用下 LXR α 及 ABCA1 的蛋白表达情况,结果发现,不同浓度 ox-LDL 刺激 J774A.1 细胞 12 h 后,LXR α 及 ABCA1 的表达明显上调,且呈浓度依赖性。当使用 40 mg/L ox-LDL 刺激细胞时,LXR α 及 ABCA1 的表达较对照组分别升高 4.5 倍、5 倍($P < 0.01$;图 1)。

2.2 LOX-1、PPAR γ 在 293T 细胞中的过表达

由于巨噬细胞为质粒难转染型细胞,因此为了研究 LOX-1 与 PPAR γ 在细胞信号传导过程中的相互关系,选用 293T 细胞株作为平台,将 LOX-1 及 PPAR γ 的过表达载体 pcDNA-flag-PPAR γ 、pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 与 PPAR γ 报告基因载体 PPRE-X3-TK、pRL-TK 共转染入该细胞中。共转染 pcDNA-flag-PPAR γ 及 pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 质粒后,LOX-1 及 PPAR γ 的蛋白表达水平明显提高(图 2 A

和 2B),证明二者在 293T 细胞中实现了过表达。进一步的激光共聚焦结果显示,在过表达细胞株中,LOX-1 蛋白能够均匀分布于细胞膜表面(图 2C)。以

上的实验结果证明,由质粒介导的 PPAR γ 报告基因检测模型建立成功。

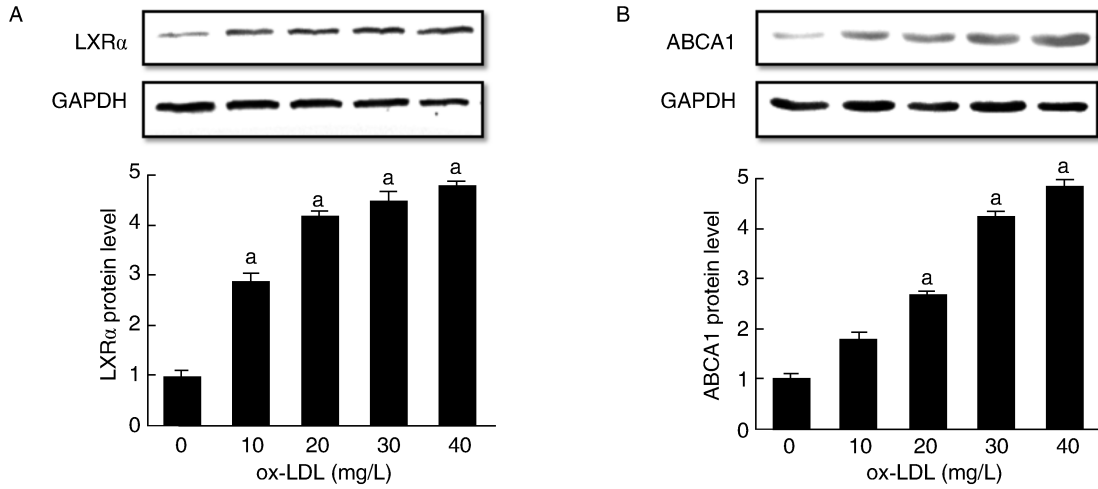


图 1. ox-LDL 梯度浓度作用下 LXR α 、ABCA1 的表达($n=3$) A 为 LXR α 的蛋白表达,B 为 ABCA1 的蛋白表达。a 为 $P<0.01$,与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 1. Expression of LXR α and ABCA1 under ox-LDL gradient concentration($n=3$)

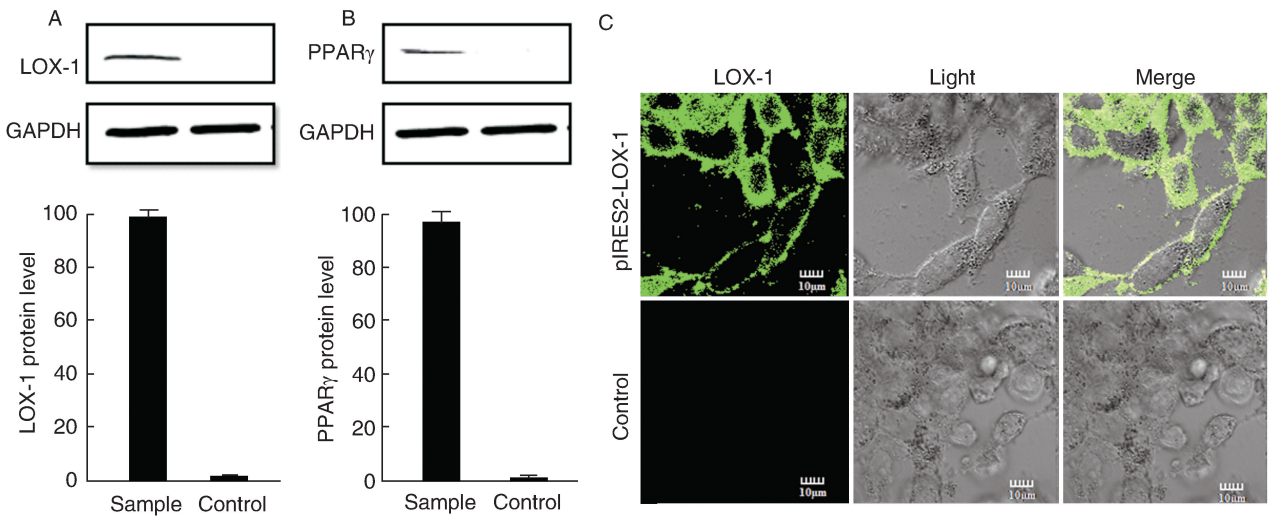


图 2. 双荧光素酶报告基因检测模型的建立($\times 600$) A 为 LOX-1 蛋白过表达,B 为 PPAR γ 蛋白过表达,C 为激光共聚焦观察 LOX-1 在细胞表面的分布及表达。

Figure 2. Establishment of dual luciferase reporter gene detection model($\times 600$)

2.3 ox-LDL 经由 LOX-1 对 PPAR γ 转录活性的影响

采用 293T 细胞建立的双荧光素酶报告基因系统,ox-LDL 刺激后检测 LOX-1 对 PPAR γ 转录活性的影响。结果显示,以 ox-LDL(30 mg/L)同 LDL 或 PBS 刺激 12 h 进行对比,ox-LDL 能明显激活 PPAR γ 转录活性(图 3A)。当 pIRES2-AcGFP1-Nuc-LOX-1 质粒未共转染的情况下,PPAR γ 转录活

性明显下降。各组对照表明,ox-LDL 是经由 LOX-1 刺激 PPAR γ 转录激活的关键因素(图 3B)。

2.4 LOX-1 siRNA 作用于巨噬细胞后 LXR α 和 ABCA1 的表达

为了进一步检测 LOX-1 在 ox-LDL 介导的 PPAR γ 激活中的作用,对 J774A.1 巨噬细胞进行 LOX-1 沉默后,30 mg/L ox-LDL 作用 12 h,Western blot 检测 LXR α 、ABCA1 蛋白表达。结果显示,LOX-

1 沉默组 LOX-1 的表达较未沉默组下调了约 80% ($P<0.01$), LXR α 的表达下调了约 70% ($P<0.01$), ABCA1 的表达下调了约 60% ($P<0.01$;图 4)。

2.5 PPAR γ siRNA 作用于巨噬细胞后 LXR α 和 ABCA1 的表达

为了进一步验证 LXR α 在 ox-LDL 介导的 PPAR γ 激活中的作用,对 J774A.1 巨噬细胞进行

PPAR γ siRNA 沉默后,30 mg/L ox-LDL 作用 12 h, Western blot 检测 LXR α 和 ABCA1 的蛋白表达。结果显示,PPAR γ 沉默后表达效率较对照组降低了 77% ($P<0.01$),LXR α 和 ABCA1 的蛋白表达较未加 PPAR γ siRNA 的对照组显著性降低,LXR α 表达量降低了约 65%,ABCA1 表达量降低了约 60% ($P<0.01$;图 5)。

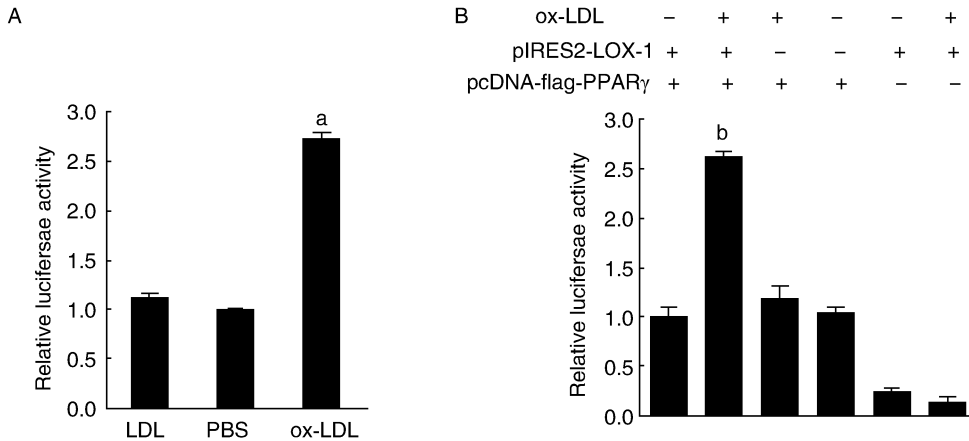


图 3. 双荧光素酶报告基因系统检测 PPAR γ 转录活性 ($n=3$) A 为 LDL、PBS 和 ox-LDL 对 PPAR γ 的转录活性的作用,B 为 ox-LDL、LOX-1 等对 PPAR γ 转录活性的作用。a 为 $P<0.01$,与 PBS 组比较;b 为 $P<0.01$,与未转染 pcDNA-flag-PPAR γ 质粒组比较。

Figure 3. Detection of PPAR γ transcribe activity by dual luciferase report gene system($n=3$)

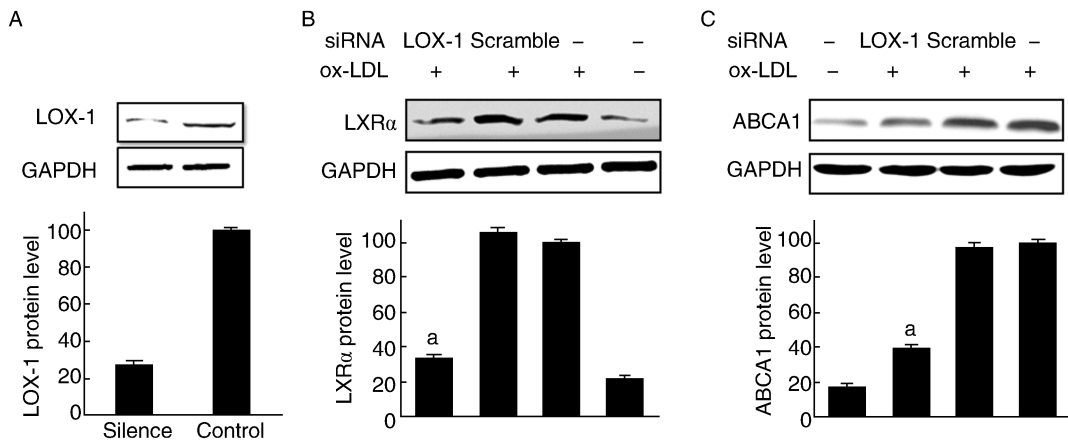


图 4. LOX-1 沉默后 LOX-1、LXR α 和 ABCA1 的蛋白表达 ($n=3$) A 为 LOX-1 蛋白表达,B 为 LXR α 蛋白表达,C 为 ABCA1 蛋白表达。a 为 $P<0.01$,与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. The protein levels of LOX-1, LXR α and ABCA1 after LOX-1 silencing($n=3$)

3 讨论

ox-LDL 被认为是致动脉粥样硬化独立的危险因素之一,主要存在于心肌梗死等患者的动静脉血栓病灶中,在病灶破裂后血液中也见分布^[13]。ox-LDL 除被血管内皮细胞摄入,导致内皮细胞功能障碍外,主要通过巨噬细胞表面的 LOX-1 等受体识别

并内吞^[14]。ox-LDL 消化产生的过量游离胆固醇会干扰巨噬细胞内脂代谢平衡,导致巨噬细胞泡沫化甚至凋亡;同时巨噬细胞表面 SR-BI 和 ABCA1 等共同作用,将胆固醇等脂质和 ApoA1 一起组装成高密度脂蛋白,将过多的胆固醇以高密度脂蛋白的形式逆转运出巨噬细胞^[5],对动脉粥样硬化引起的血管病变起保护作用。Liu 等^[15]研究 CD36 与 ABCA1

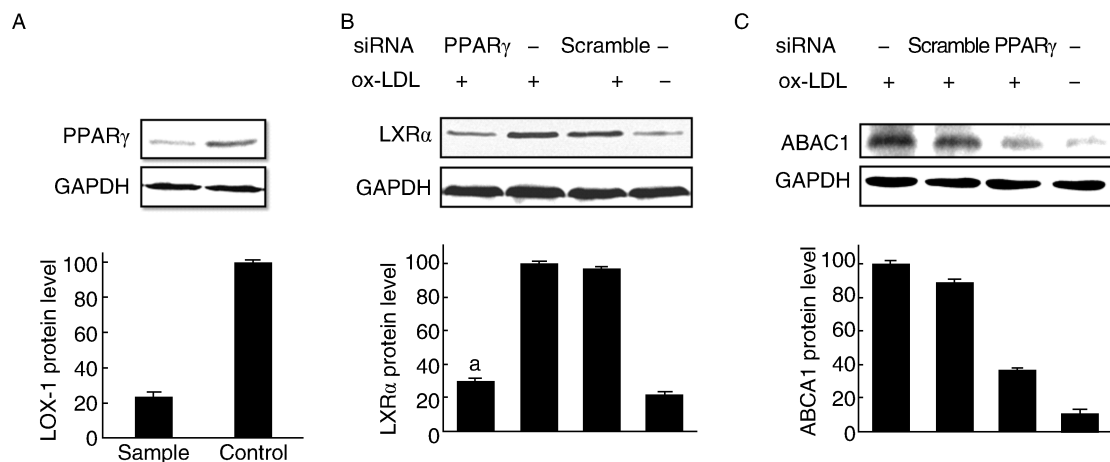


图 5. PPAR γ 沉默后 PPAR γ 、LXR α 和 ABCA1 的蛋白表达 ($n=3$) A 为 PPAR γ 的蛋白表达, B 为 LXR α 的蛋白表达, C 为 ABCA1 的蛋白表达。a 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. The protein level of PPAR γ , LXR α and ABCA1 after LOX-1 silencing ($n=3$)

在平衡巨噬细胞内胆固醇代谢时发现长时间高浓度 ox-LDL (48 h, 75 g/L) 的作用下 CD36 受体蛋白表达达到最高值, 而 ABCA1 蛋白表达则从最高值急速下降。Chistiakov 等^[16]、Luo 等^[17] 和 Yu 等^[3] 分别提到当巨噬细胞长时间摄取 ox-LDL 后, 细胞内胆固醇含量超过 50% 后造成了细胞的泡沫化作用, 此后巨噬细胞本身的 ABCA1 的表达被明显降低或削弱, 同时过度积累的游离胆固醇对细胞产生较高的毒性, 从而进一步降低 ABCA1 的表达, 引发泡沫化程度加深。因此, ABCA1 蛋白表达的强弱可能直接反映了巨噬细胞泡沫化病变的趋势。

PPAR γ 主要表达在心、肾、大肠、白色脂肪细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞等^[18]。近年研究表明, PPAR γ 的活化会减弱 CXCR7 等趋化因子受体表达^[19], 减少巨噬细胞对单核巨噬细胞的募集, 减少斑块周围局部炎症的反应强度, 对以炎症反应为病理基础的动脉粥样硬化起到保护作用^[20]。PPAR γ 在内源性脂类 (长链不饱和脂肪酸、花生酸衍生物、十八碳二烯酸等) 激活时和视黄醇类 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成二聚体, 结合到靶基因的过氧化体增殖物反应元件 (peroxisome proliferator response element, PPRE) 上, 调控 LXR α 等靶基因的转录^[21]。ABCA1 利用 ATP 水解能量, 可将游离胆固醇和磷脂逆转运出细胞, LXR α 配体激活核转录因子是 ABCA1 细胞内转录水平的重要调控者, 并通过 ApoA1 依赖途径促进细胞内游离胆固醇外流。Chawla 等^[22] 第一次将 PPAR γ /LXR α /ABCA1 联系在一起, 表明 PPAR γ /LXR α 核受体因子均可通过上调 ABCA1 表达, 激活巨噬细胞胆固醇外流途径。

以往 ox-LDL 与 LOX-1 的相关研究主要集中在其促进动脉粥样硬化作用上, 而 LOX-1 能否作为巨噬细胞表面信号分子, 激活 PPAR γ -LXR α -ABCA1 信号传导, 从而启动胆固醇逆转运途径尚未见详细报道。本研究中成功构建了 PPAR γ 报告基因检测细胞模型, 并以此为平台研究了 LOX-1 与 PPAR γ -LXR α -ABCA1 信号传导的相互关系。本研究结果显示, 在 LOX-1 存在的情况下, ox-LDL 短时间低浓度 (12 h, 30 mg/L) 刺激巨噬细胞能够明显激活 PPAR γ 的核转录活性。与之相反, LOX-1 的缺失明显抑制了该作用。为了进一步确定报告基因的结果, 本研究进行了 LOX-1 及 PPAR γ 基因沉默。结果显示, LOX-1、PPAR γ 基因沉默均能够明显抑制 LXR α 及 ABCA1 的表达。由此推测, 在 ox-LDL 短时间低浓度 (12 h, 30 mg/L) 的作用下, LOX-1 除能上调与 ox-LDL 摄取相关的清道夫受体表达外, 还可激活 PPAR γ 活性, 从而启动由 LXR α 及 ABCA1 介导的胆固醇逆转运途径, 达到平衡细胞中胆固醇含量的作用。本研究首次揭示了 LOX-1 在 ox-LDL 启动的巨噬细胞胆固醇中的作用, 为全面了解巨噬细胞脂代谢通路, 以及今后以此为靶点研究治疗动脉粥样硬化策略奠定了理论基础。

[参考文献]

- [1] Hirata N, Shim Y H, Pravdic D, et al. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1 410-422.
- [2] Abdelhamid DS, Zhang Y, Lewis DR, et al. Tartaric acid-based amphiphilic macromolecules with ether linkages exhibit enhanced repression of oxidized low density lipoprotein uptake

- [J]. *Biomaterials*, 2015, 53(6jun): 32-39.
- [3] Yu X H, Fu Y C, Zhang D W, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 424(9sep): 245-252.
- [4] Zhou L, Li C, Gao L, et al. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4 015-021.
- [5] Demina EP, Miroshnikova VV, Schwarzman AL. Role of the ABC transporters A1 and G1, key reverse cholesterol transport proteins, in atherosclerosis[J]. *Mol Biol*, 2016, 50(2): 223-230.
- [6] Shrestha E, Hussein MA, Savas JN, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 represses liver X receptor-mediated ABCA1 expression and cholesterol efflux in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(21): 1 172-184.
- [7] Sun N, Wang H, Wang L. Ghrelin inhibits oxLDL-induced inflammation in RAW264.7 mouse macrophages through down-regulation of LOX-1 expression via NF- κ B signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*, 2016, 62(2): 57-61.
- [8] Barlic J, Murphy PM. An oxidized lipid-peroxisome proliferator-activated receptor gamma-chemokine pathway in the regulation of macrophage-vascular smooth muscle cell adhesion[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(8): 269-274.
- [9] Feng J, Han J, Pearce SFA, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(5): 688-696.
- [10] Li YB, Zhang QH, Chen Z, et al. Oxidized low-density lipoprotein attenuated desmoglein 1 and desmocollin 2 expression via LOX-1/ Ca^{2+} /PKC- β signal in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(2): 380-386.
- [11] Tontonoz P, Hu E, Graves RA, et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(10): 1 224-234.
- [12] Liu Q, Kobayashi K, Furukawa J, et al. Omega-carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for beta(2)-glycoprotein I and mediate antibody-dependent uptake of oxidized LDL by macrophages[J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(9): 1 486-495.
- [13] 张鹤, 刘庆平. 氧化型低密度脂蛋白的致病性及检测方法研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(6): 633-638.
- [14] Pietro ND, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of ox-LDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis[J]. *Vasc Pharmacol*, 2016, 84(9sep): 1-7.
- [15] Liu HY, Cui HB, Chen XM, et al. Imbalanced response of ATP-binding cassette transporter A1 and CD36 expression to increased oxidized low-density lipoprotein loading contributes to the development of THP-1 derived foam cells[J]. *J Biochem*, 2014, 155(1): 35-42.
- [16] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 20(1): 17-28.
- [17] Luo DX, Cao DL, Xiong Y, et al. A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(10): 1 243-257.
- [18] Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene—a review[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2014, 9(1): 46-50.
- [19] Zhao D, Zhu Z, Li D, et al. Pioglitazone suppresses CXCR7 expression to inhibit human macrophage chemotaxis through peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *Biochemistry*, 2015, 54(45): 6 806-814.
- [20] Mangge H, Becker K, Fuchs D, et al. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease [J]. *World J Cardiol*, 2014, 6(6): 462-477.
- [21] Li D, Wang X, Ren W, et al. High expression of liver histone deacetylase 3 contributes to high-fat-diet-induced metabolic syndrome by suppressing the PPAR- γ and LXR- α -pathways in E3 rats[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 344(1-2): 69-80.
- [22] Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis [J]. *Mol Cell*, 2001, 7(1): 161-171.

(此文编辑 文玉珊)