

## CSE/H<sub>2</sub>S 通过 KLF6 拮抗 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症反应

薛峰<sup>1</sup>, 杜从阔<sup>1</sup>, 全慧<sup>1</sup>, 姜珊<sup>1</sup>, 陈然<sup>1</sup>, 范小芳<sup>1</sup>, 龚永生<sup>1</sup>, 耿彬<sup>1,2</sup>

(1.温州医科大学低氧研究所,浙江省温州市 325035;2.中国医学科学院阜外医院高血压中心,北京市 100037)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 内皮细胞; 胱硫醚  $\gamma$  裂解酶; 硫化氢; Krüppel 样因子 6

[摘要] **目的** 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞炎症反应,促进单核巨噬细胞黏附是动脉粥样硬化发生的重要病理生理机制。硫化氢(H<sub>2</sub>S)是新型气体信号分子,可拮抗动脉粥样硬化并抑制内皮细胞炎症反应。本研究以 Krüppel 样因子(KLF)家族为切入点,探究 KLF6 在 H<sub>2</sub>S 拮抗 ox-LDL 诱导内皮细胞炎症反应中的调节机制。**方法** 以人主动脉内皮细胞(HAEC)为研究对象,观察 ox-LDL 对 HAEC 内源性胱硫醚  $\gamma$  裂解酶(CSE)/H<sub>2</sub>S 系统及内皮细胞炎症反应的影响。实时定量 PCR 检测外源性给予 H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 对 KLF 家族及炎症因子表达的改变,进一步采用 siRNA 干扰 KLF6 观察其对内皮细胞炎症反应、单核细胞黏附的影响。同时采用染色质免疫共沉淀(ChIP)技术观察 H<sub>2</sub>S 供体对 KLF6 转录活性的影响。**结果** Western blot 检测及 H<sub>2</sub>S 荧光探针细胞内染色发现,ox-LDL 可以呈时间及剂量依赖性下调 CSE 表达以及内皮细胞 H<sub>2</sub>S 的产生。实时定量 PCR 检测发现,ox-LDL 抑制 KLF6 表达而上调 KLF10 表达,H<sub>2</sub>S 处理后则上调 KLF6 表达,抑制 KLF10 表达。Western blot 证实 NaHS 或过表达 CSE 均可显著上调 KLF6 蛋白表达。NaHS 处理显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症因子 ICAM-1、VCAM-1 的表达水平和单核细胞对内皮细胞的黏附,敲低 KLF6 则阻断 NaHS 的抑炎效应。ChIP 结果也显示,ox-LDL 促进 KLF6 与 CXCL2、IL-8 以及自噬基因 ATG7 启动子区的结合,NaHS 处理或过表达 CSE 均可显著抑制 KLF6 的 DNA 结合活性。**结论** ox-LDL 下调内皮细胞 CSE/H<sub>2</sub>S 系统,H<sub>2</sub>S 供体或增加内源性 CSE 可通过 KLF6 这一转录因子拮抗 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症反应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## CSE/H<sub>2</sub>S antagonize ox-LDL induced inflammatory response of endothelial cells through KLF6

XUE Feng<sup>1</sup>, DU Cong-Kuo<sup>1</sup>, QUAN Hui<sup>1</sup>, JIANG Shan<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>1</sup>, FAN Xiao-Fang<sup>1</sup>, GONG Yong-Sheng<sup>1</sup>, GENG Bin<sup>1,2</sup>

(1. Research Center of Hypoxia, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China; 2. Hypertension Center of Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Oxidized low density lipoprotein; Endothelium; Cystathionine  $\gamma$  lyase; Hydrogen sulfide; Krüppel-like factor 6

[ABSTRACT] **Aim** That Ox-LDL induced endothelial inflammation response then promoted monocyte and macrophage adhesion is an essential pathophysiological process of atherosclerosis. Hydrogen sulfide is a novel gasotransmitter and exhibits anti-atherosclerotic and anti-inflammation effects. The present study investigated the role of Krüppel-like factor 6 (KLF6) in protection of H<sub>2</sub>S on ox-LDL induced endothelial inflammation. **Methods** Cystathionine  $\gamma$  lyase (CSE) protein expression, H<sub>2</sub>S generation by fluorescence probe were assayed after ox-LDL stimulated in human aortic endothelial cells (HAEC). Then, quantitative real-time PCR were used for measuring the changes of Krüppel-like factors mRNA while treated with H<sub>2</sub>S donor or overexpression CSE gene by adenovirus. And then, assayed the inflammatory factors changes and monocyte adhesion to HAEC while knockdown the KLF6. At last, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay were used for determining the DNA binding activity of KLF6 after H<sub>2</sub>S treatment. **Results** Using Western blot to measure the CSE protein expression, H<sub>2</sub>S fluorescence probe to identify the endogenous H<sub>2</sub>S generation, it found that ox-LDL down-regulated endothelial endogenous CSE/H<sub>2</sub>S system in a dose-dependent and time-dependent manner.

[收稿日期] 2018-02-10

[修回日期] 2018-05-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470552 和 81670739)

[作者简介] 薛峰,硕士研究生,E-mail 为 xuegengcg@163.com。通讯作者耿彬,E-mail 为 bingeng@hsc.pku.edu.cn。

Ox-LDL lowered KLF6 but increased KLF10 mRNA expression; H<sub>2</sub>S donor (NaHS) reversed the KLF6 and KLF10 mRNA changes by ox-LDL induction. In this cellular model, other KLF family mRNA is not changed. Next, it confirmed H<sub>2</sub>S donor or CSE overexpression up-regulated KLF6 protein expression. H<sub>2</sub>S reduced inflammatory factors-ICAM-1, VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelium induced by ox-LDL, knockdown KLF6 blocked the H<sub>2</sub>S action. It confirmed that H<sub>2</sub>S donor decreased DNA binding activity of KLF6 to CXCL2, IL-8 and ATG7 promoter. **Conclusion** Ox-LDL down-regulated endothelial CSE/H<sub>2</sub>S system. H<sub>2</sub>S donor treatment or overexpression CSE reduced ox-LDL induced inflammation response by KLF6.

动脉粥样硬化是心血管系统疾病中最常见的病变,严重威胁人类健康。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)升高诱导内皮细胞炎症反应,促进单核细胞及巨噬细胞黏附是动脉粥样硬化发病的重要环节<sup>[1]</sup>。硫化氢(H<sub>2</sub>S)是继一氧化氮与一氧化碳后又一新的气体信号分子,在心血管疾病中有重要的保护作用<sup>[2]</sup>。心血管组织表达内源性 H<sub>2</sub>S 产生的关键酶—胱硫醚  $\gamma$  裂解酶(cystathionine  $\gamma$  lyase, CSE)。动脉粥样硬化发生时,血管内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统下调,外源性给予 H<sub>2</sub>S 供体能有效缓解动脉粥样硬化的形成<sup>[3]</sup>。H<sub>2</sub>S 可通过多种机制拮抗动脉粥样硬化的发病,如抑制 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成,通过 NF- $\kappa$ B 通路抑制内皮细胞 ICAM-1 的表达<sup>[4]</sup>。我们前期研究发现, H<sub>2</sub>S 可以通过硫化氢修饰 SIRT1 增加其去乙酰化活性,使 NF- $\kappa$ B 的 P65 去乙酰化而拮抗内皮细胞的炎症反应进而拮抗动脉粥样硬化<sup>[5]</sup>。

Krüppel 样因子(Krüppel-like factor, KLF)家族是真核生物中一大类基础转录因子,在羧基端具有三个高度保守的 C2H2 型锌指结构,可结合于 DNA 富含 GC 的区域,进而刺激或抑制靶基因的表达,调节增殖分化、凋亡、炎症反应等功能<sup>[6]</sup>。KLF2 可以通过 CEBP 上调 eNOS,抑制湍流引起的 IL-1 炎症因子的表达<sup>[7]</sup>; KLF2 敲除则可加重动脉粥样硬化的发生<sup>[8]</sup>。内皮细胞自噬也可通过 KLF2 参与动脉粥样硬化的发病<sup>[9]</sup>。CSE/H<sub>2</sub>S 是否可通过 KLF 家族调节内皮细胞炎症反应参与动脉粥样硬化的发生发展尚不清楚。本研究在 ox-LDL 刺激的人主动脉内皮炎症模型上,观察内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统的改变,以及 KLF 家族在其抗炎作用中的调节机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAEC)购自 Sciencell 公司(cat#: 6100),人单核细胞白血病细胞(THP-1)购自中科院上海细胞库

(cat#: CBP60518)。ox-LDL 购自广州奕元生物技术有限公司(Cat#: YB-002); KLF6 (cat#: ab135783)、CSE 抗体(cat#: ab189916)抗体购自 Abcam 公司; KLF6 siRNA 由北京知序生物科技有限公司设计并合成; Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 购自 YEASEN 公司(cat#: 11202ES08)。

### 1.2 CSE 蛋白表达检测

HAEC 传代培养至 12 孔板,待细胞密度达到 70%~80%时,给予梯度浓度的 ox-LDL (0、12.5、25、50、100、200 mg/L)处理 24 h;或 ox-LDL (100 mg/L)分别处理 3~48 h; Western blot 检测 CSE 的蛋白表达。细胞处理后,加入 H<sub>2</sub>S 荧光探针(Mito-HS, 100  $\mu$ mol/L)孵育 2 h,荧光显微镜下观察 H<sub>2</sub>S 的产生。

### 1.3 实时定量 PCR 检测

HAEC 经不同的处理后,弃去培养基,无菌 PBS 洗涤细胞, Trizol 一步法抽提总 RNA,逆转录成 cDNA, qRT-PCR 定量分析各基因的 mRNA 表达水平。以 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 值计算 mRNA 表达变化倍数。各基因引物见表 1。

### 1.4 单核细胞黏附实验

HAEC 生长至 70%~80%时,给予不同的条件处理 24 h。向悬浮培养的 THP-1 培养基中加入 DAPI 染液至终浓度为 100  $\mu$ g/L,染色 15 min, PBS 洗涤 2 次,用内皮培养基重悬细胞。向 HAEC 每个处理组中加入等量的 THP-1 细胞,共培养 1 h。弃去悬浮的 THP-1 细胞和培养基, PBS 轻柔的洗涤细胞 2 次,荧光显微镜下观察黏附于内皮细胞上的 THP-1 细胞。

### 1.5 染色体免疫共沉淀

内皮细胞经不同处理 24 h,收集细胞,超声将 DNA 处理成 300~500 bp 片段,取 2  $\mu$ g KLF6 抗体与磁珠 Protein G 混合孵育 1 h,再加入细胞裂解液于 4℃共孵育过夜,捕获 KLF6 结合的 DNA 片段。酚-氯仿法抽提 DNA,再经 qPCR 和 RNA 电泳对 KLF6 结合的靶基因启动子进行定量。基因特异的引物序列: CXCL2 引物序列为 5'-CTC GCA GGC

GGT TAT CTC GGT ATC-3' 和 5'-GGG GGT CGG GGC ACT CAC G-3', ATG7 引物序列为 5'-CTT GGC TCC TAC ACT TCC CG-3' 和 5'-GGC CTC CAG AAC TAC CAT CG-3'。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

基因	正向引物	反向引物
ICAM-1	5'-TGTGACCAGCCCAAGTTGTT-3'	5'-AGTCCAGTACACGGTGAGGA-3'
VCAM-1	5'-TTTGACAGGCTGGAGATAGACT-3'	5'-TCAATGTGTAATTTAGCTCGGCA-3'
MCP-1	5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
IL-1 $\beta$	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	5'-GTCGGAGATTCTAGCTGGA-3'
IL-18	5'-TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG-3'	5'-TCCGGGGTGCATTATCTCTAC-3'
KLF2	5'-AGCTCACGCGCCACTACCGAA-3'	5'-GGCACGATCGCACAGATGGCACT-3'
KLF3	5'-GAGAATCACCCCTTCGGTCA-3'	5'-TTAGTTCATCAGACCGAGCAA-3'
KLF4	5'-ACCAGGCACTACCGTAAACACA-3'	5'-GGTCCGACCTGGAAAAATGCT-3'
KLF5	5'-CTTCCACAACAGGCCACTTACTT-3'	5'-AGAAGCAATTGTAGCAGCATAGGA-3'
KLF6	5'-CAACTTAGAGACCAACAGCC-3'	5'-TCAGTTCCGGAGAAGATGG-3'
KLF7	5'-CGGGACAAGTTGCTATCTGAGA-3'	5'-CTGTTGACGGCTGTGTAGCT-3'
KLF8	5'-TGTCATTACACTATCCCTC-3'	5'-GCAGGCAAAGTAGTATACACC-3'
KLF9	5'-ACCTGAACAAGTACCGACCCAT-3'	5'-ACTTTCCAGACTGTGCTGCAC-3'
KLF10	5'-GATGCCCAGCTATGTAACCAC-3'	5'-TTCTTTCTTGCAGCCTCAACA-3'
KLF11	5'-AATACCAAGTTGTTGCCCTT-3'	5'-CGTGACAGCTCATCCGAACGA-3'
KLF12	5'-ACAAGGGTCTCCAAACGTCCA-3'	5'-CAGGCACCGACTGTACCAC-3'
KLF13	5'-AAGGCGCACCTGAGAACTCACAC-3'	5'-TCTCCAGCCTCCCGGATCACC-3'
KLF14	5'-GAAGTTTACGCGTTCCGACG-3'	5'-GATGATAGGTTGGGTGGCGG-3'
KLF15	5'-CTGTGCCCATTGCCGCCAAG-3'	5'-CCCAGGGGTCCCGATCCAAC-3'
KLF16	5'-CGCCAAGAGCCACCGCTGTCC-3'	5'-AGCCCTGCCAGTCAACAAGCAA-3'
GAPDH	5'-CGCTCTCTGCTCCTCTGTT-3'	5'-CCATGCTGTCTGAGCGATGT-3'

## 2 结果

### 2.1 ox-LDL 呈剂量和时间依赖性抑制内皮细胞 CSE/H<sub>2</sub>S 系统

不同浓度的 ox-LDL (0~200 mg/L) 处理 HAEC 24 h, CSE 蛋白表达呈剂量依赖性下调, 内皮细胞内源性 H<sub>2</sub>S 水平呈剂量依赖性降低。100 mg/L ox-LDL 处理 HAEC 不同时间, 结果发现, 随着处理时间的延长, 细胞内 CSE/H<sub>2</sub>S 呈现降低趋势 (图 1)。提示 ox-LDL 可呈剂量和时间依赖性下调主动脉内皮细胞内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统。

### 2.2 CSE/H<sub>2</sub>S 上调 KLF6

为探讨 CSE/H<sub>2</sub>S 系统对 KLF 家族蛋白表达的影响, 在 ox-LDL 诱导 HAEC 模型上, 给予 H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE, 采用实时定量 PCR 检测 KLF 家族各成员的表达情况。结果发现, 除 KLF6、KLF10 外, CSE/H<sub>2</sub>S 对 KLF 家族其他成员表达无明显改变。

### 1.6 统计学分析

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据间比较采用非配对 *t* 检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

ox-LDL 下调 KLF6 mRNA 表达, 外源给予 NaHS 或过表达 CSE 显著增加 KLF6 mRNA 表达。而 ox-LDL 上调 KLF10、CSE/H<sub>2</sub>S 则下调 KLF10 mRNA 表达。进一步研究发现, NaHS 或过表达 CSE 均可拮抗 ox-LDL 对 KLF6 蛋白表达的抑制 (图 2)。提示内皮细胞内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 可拮抗 ox-LDL 对 KLF6 的下调。

### 2.3 KLF6 介导 H<sub>2</sub>S 的抑炎反应

我们前期工作发现, H<sub>2</sub>S 供体可抑制 ox-LDL 诱导的炎症因子的表达。本研究首先确证了 H<sub>2</sub>S 供体 NaHS 显著抑制 ox-LDL 诱导的 ICAM-1、VCAM-1、IL-1 $\beta$  的表达, 采用 RNAi 敲低 KLF6 后, 可显著阻断 NaHS 的抑炎效应。单核细胞及巨噬细胞黏附到内皮细胞是动脉粥样硬化发病的重要环节, 也是内皮细胞炎症反应的重要功能指标。NaHS 显著抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 细胞黏附。而敲低 KLF6 后, NaHS 的抑制效应消失 (图 3)。提示 KLF6 介导了 H<sub>2</sub>S 的抑炎效应。

## 2.4 CSE/H<sub>2</sub>S 抑制 KLF6 与 NF- $\kappa$ B 下游靶基因启动子的结合

KLF6 作为重要的转录因子,可调控下游靶基因的表达。已有研究表明,KLF6 可与 NF- $\kappa$ B 相互作用,共激活 NF- $\kappa$ B 下游靶基因。本研究选取已有文献报道的可与 KLF6 结合的目的基因启动子序列,检测 CSE/H<sub>2</sub>S 对 KLF6 转录活性的影响。结果发现,无论 NaHS 或过表达 CSE 均可显著抑制 KLF6 与 CXCL2、IL-8、ATG7 启动子区域的结合,进而抑制下游靶基因的表达(图 4)。

## 3 讨论

本研究在 ox-LDL 诱导的内皮炎症模型中发现,ox-LDL 能显著下调内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统并诱发炎

症;H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 可上调 KLF6 的表达,抑制其转录活性,下调其靶基因的表达,抑制单核细胞对 endothelial 细胞的黏附,从而减轻 ox-LDL 诱导的内皮功能障碍,进而减轻动脉粥样硬化的发生。

越来越多的研究表明,内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 参与动脉粥样硬化发生的调控。Wang 等<sup>[3]</sup>首先报道了 H<sub>2</sub>S 供体 NaHS 可抑制血管 ICAM-1 的表达,抑制泡沫细胞形成从而减少 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块面积。H<sub>2</sub>S 缓释剂 GYY4137 也具有同样的拮抗效应<sup>[10]</sup>。CSE<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>双敲除小鼠减少内源性 H<sub>2</sub>S 并增加动脉粥样硬化斑块面积<sup>[11]</sup>;反之,CSE 转基因小鼠则拮抗动脉粥样硬化斑块形成<sup>[12]</sup>。本研究发现,ox-LDL 可以呈剂量及时间依赖性下调内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统,支持内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统变化是动脉粥样硬化发病的重要机制的论点。

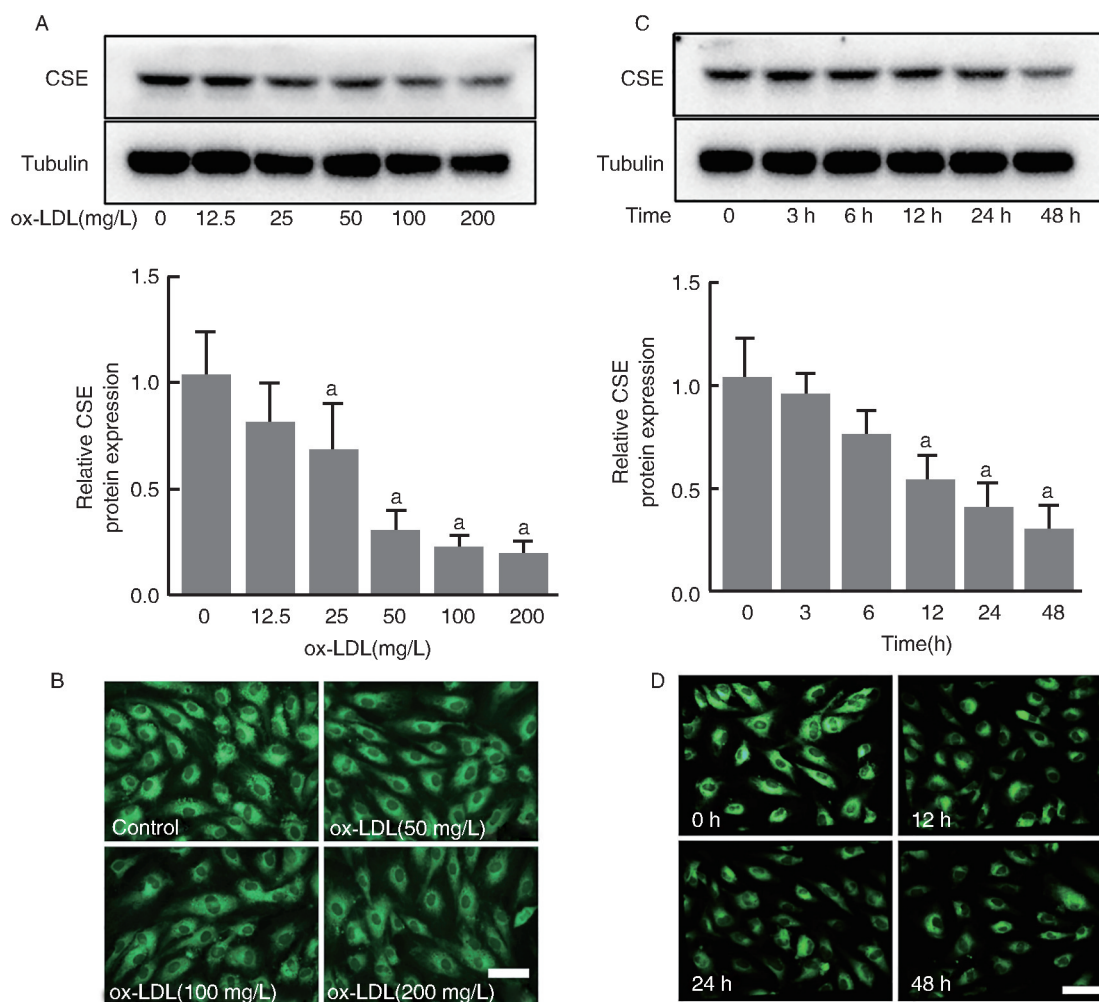
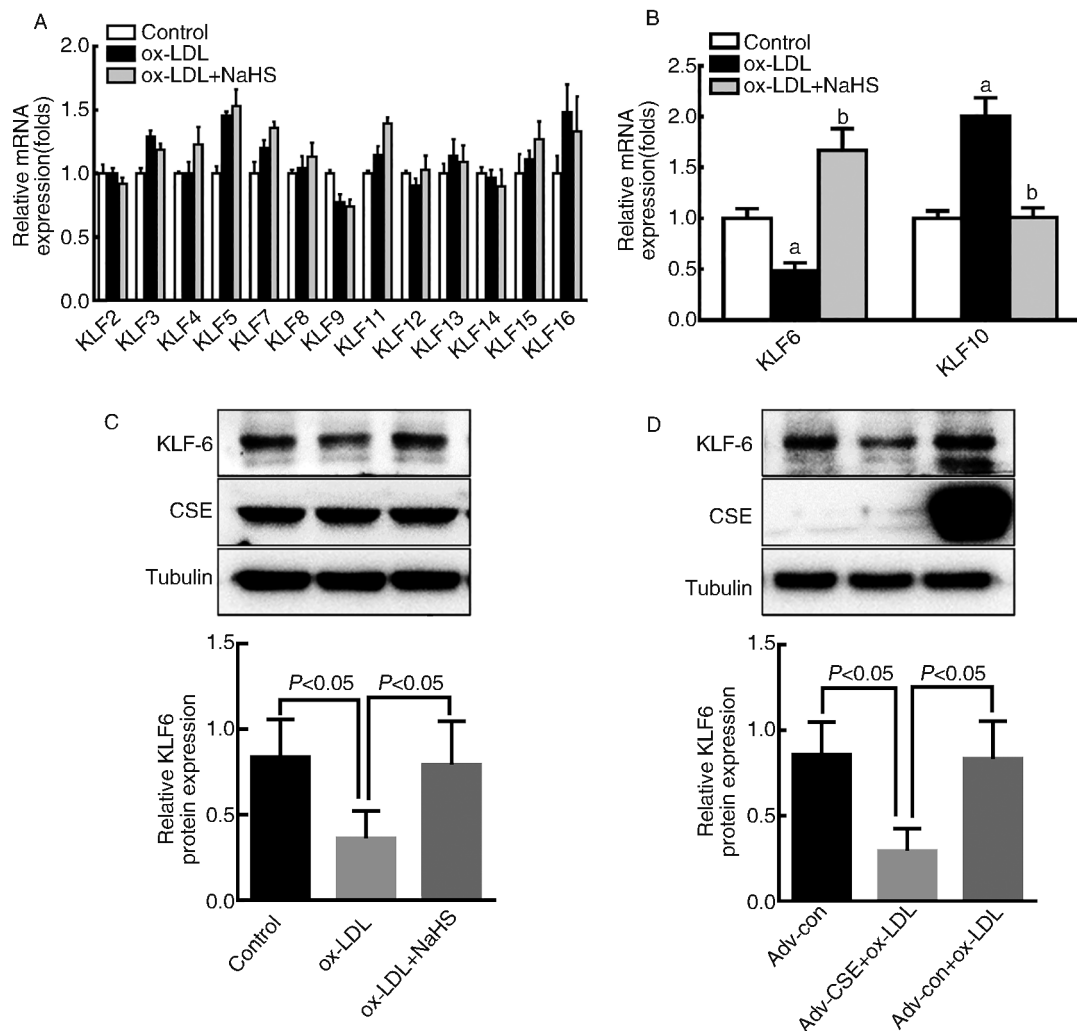


图 1. ox-LDL 呈剂量依赖性和时间依赖性抑制 CSE/H<sub>2</sub>S 表达 A 为不同浓度 ox-LDL 对内皮细胞 CSE 蛋白表达的影响, B 为荧光探针检测 ox-LDL 刺激下内皮细胞 H<sub>2</sub>S 的产生(Bar=20  $\mu$ m), C 为 ox-LDL 处理内皮细胞不同时间对 CSE 蛋白的影响(Bar=20  $\mu$ m), D 为 ox-LDL 处理内皮细胞不同时间对内源性 H<sub>2</sub>S 的影响。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较。

Figure 1. Ox-LDL inhibited CSE/H<sub>2</sub>S expression in a dose-dependent and time-dependent manner





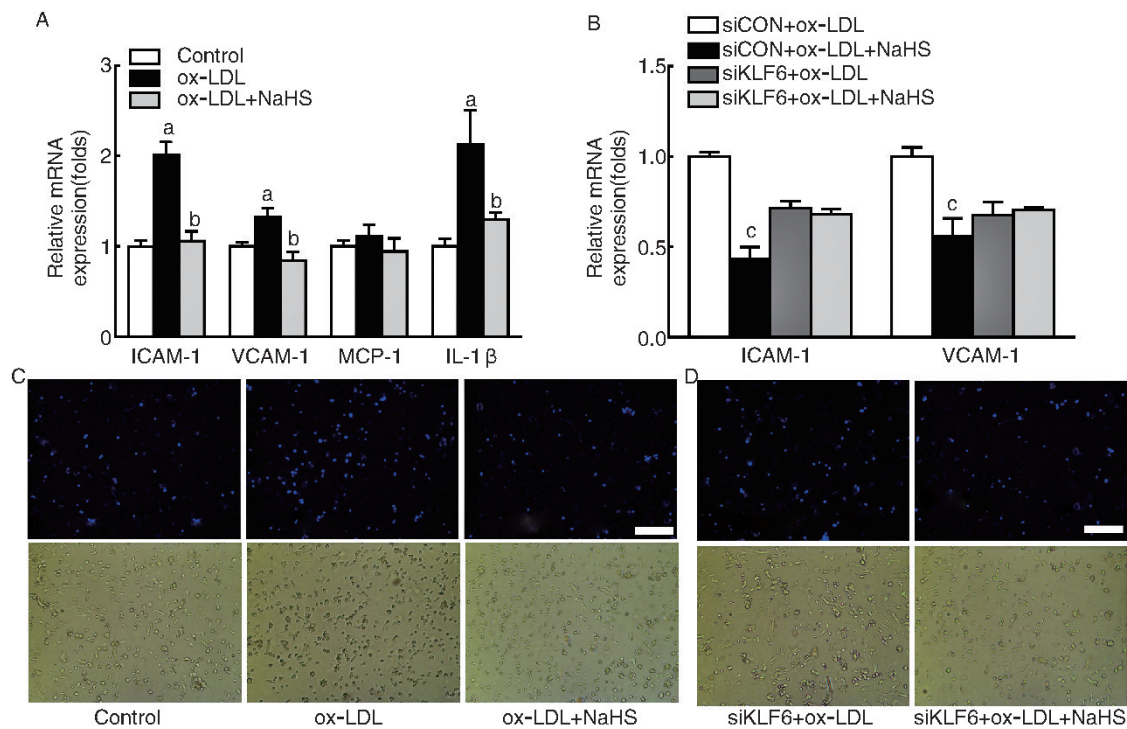
**图 2. 内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 对 KLF 家族表达的影响** A 为 qRT-PCR 检测 ox-LDL 刺激以及 H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 对 KLF 家族 mRNA 表达的影响, B 为 qRT-PCR 检测 ox-LDL 刺激以及 H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 对 KLF6、KLF10 mRNA 表达的影响, C 为 H<sub>2</sub>S 供体对 KLF6 蛋白表达的影响, D 为过表达 CSE 对 KLF6 表达的影响。a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 ox-LDL 组比较。

**Figure 2. The effect of endogenous CSE/H<sub>2</sub>S on the expression of KLF family**

多种因素诱导内皮细胞炎症反应是内皮细胞功能障碍的重要因素。ox-LDL 可诱导内皮细胞的氧化应激,诱导内皮黏附分子的表达,并且促进内皮细胞凋亡,诱发动脉粥样硬化斑块发生<sup>[13]</sup>。H<sub>2</sub>S 可通过调节 NF- $\kappa$ B 信号抑制内皮细胞炎症反应<sup>[14]</sup>,也可影响 microRNA-186 表达,调节炎症基因而抑制巨噬细胞炎症<sup>[15]</sup>。我们前期工作也证实, H<sub>2</sub>S 可以通过硫氢化修饰 SIRT1,增加其去乙酰化活性,使去乙酰化 P65 增加,抑制其入核,从而抑制内皮细胞炎症反应<sup>[5]</sup>。本研究发现阻断 KLF6 可阻断 H<sub>2</sub>S 的抑炎效应,提示 KLF6 可能是 H<sub>2</sub>S 抗炎的新机制。

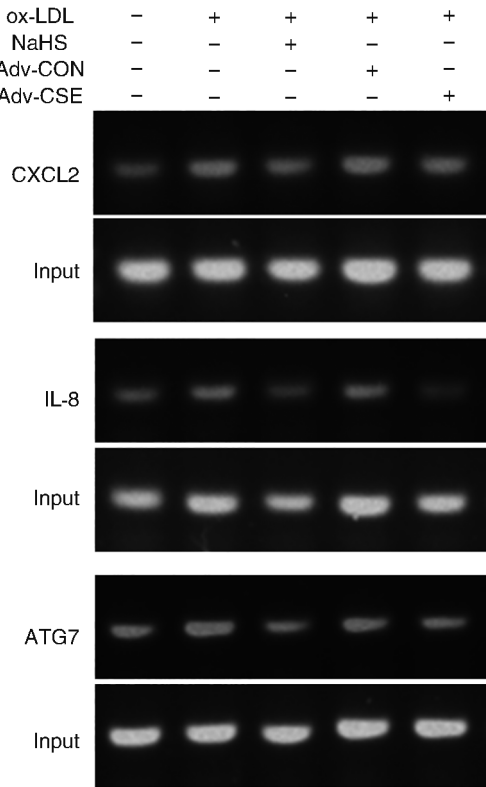
KLF6 是 KLF 家族的一员,也称锌指转录因子 9 (zinc finger factor 9, ZF9) 或核心启动子元件结合蛋白 (core promoter-binding protein, CPBP),可以特异

性结合靶基因启动子区域的 GC 盒、CACCC 盒等核心元件而发挥生物学效应<sup>[16]</sup>。KLF6 与炎症调节有密切关系。研究表明, KLF6 能以一种依赖于 p65 的方式被招募至 NF- $\kappa$ B 下游基因的启动子区,进而促进 p65 在其部分下游基因启动子上的结合,作为 NF- $\kappa$ B 共激活因子,也可调控炎症因子的表达<sup>[17]</sup>;另可通过结合 PRDM1 上调 Bcl-2 转录促进巨噬细胞炎症反应<sup>[18]</sup>; KLF6 还可调节 iNOS 表达,参与病毒感染诱导的炎症反应<sup>[19]</sup>。反之, KLF6 也可结合 CREBP,抑制 TNF- $\alpha$  诱导的炎症反应<sup>[20]</sup>。本研究发现, ox-LDL 抑制 KLF6 表达,但增加了 KLF6 对炎症因子的转录活性,提示在 KLF6 与炎症反应中存在着负反馈调节,过度的炎症反应抑制 KLF6 表达,发挥机体自身的保护机制。CSE/H<sub>2</sub>S 系统处理可使 KLF6 表达恢复到正常水平,并抑制其转录活性,



**图 3. KLF6 介导 H<sub>2</sub>S 抑制内皮细胞炎症反应** A 为 H<sub>2</sub>S 供体对 ox-LDL 诱导的炎症因子表达的影响, B 为敲低 KLF6 对 H<sub>2</sub>S 抗炎效应的影响, C 为 H<sub>2</sub>S 供体对 ox-LDL 诱导的 THP-1 细胞黏附功能的影响 (Bar = 100  $\mu$ m), D 为敲低 KLF6 对 H<sub>2</sub>S 拮抗 THP-1 细胞黏附功能的影响 (Bar = 100  $\mu$ m)。a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 siCON+ox-LDL 组比较。

**Figure 3. KLF6 mediated H<sub>2</sub>S inhibits inflammatory response in endothelial cells**



**图 4. H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 对 KLF6 DNA 结合活性的影响** ChIP 检测 KLF6 对 CXCL2、IL-8 以及 ATG7 启动子区结合的活性以及 H<sub>2</sub>S 供体或过表达 CSE 对其活性的调节。

**Figure 4. Effect of H<sub>2</sub>S donor or CSE overexpression on KLF6 DNA binding activity**

发挥其抑制炎症效应。

本研究发现了内源性 CSE/H<sub>2</sub>S 系统拮抗内皮细胞炎症反应转录表达调控的新机制。KLF6 在 ox-LDL 诱导的内皮炎症反应中有促炎效应, 而其也属于锌指蛋白家族, 类似于 SIRT1, 富含半胱氨酸残基, 也可被硫化氢修饰。H<sub>2</sub>S 可能硫化氢修饰 KLF6 而抑制其活性。同时也提示, 选择性抑制 KLF6 可能成为防治动脉粥样硬化新的靶点。

(致谢: 感谢北京大学医学部药学院汤新景教授提供硫化氢荧光探针)

[参考文献]

[1] Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis [J]. Physiol Rev, 2013, 93: 1 317-542.

[2] Streeter E, Ng HH, Hart JL. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor[J]. Med Gas Res, 2013, 3(1): 9.

[3] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29: 173-179.

[4] Mani S, Untereiner A, Wu L, et al. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20: 805-817.

- [5] Du C, Lin X, Xu W, et al. Sulfhydrated Sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, DOI: 10.1089/ars.2017.7195.
- [6] Fan Y, Lu H, Liang W, et al. Krüppel-like factors and vascular wall homeostasis[J]. *J Mol Cell Biol*, 2017, 9: 352-363.
- [7] SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, et al. KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation[J]. *J Exp Med*, 2004, 199: 1 305-315.
- [8] Atkins GB, Wang Y, Mahabeleshwar GH, et al. Hemizygous deficiency of Krüppel-like factor 2 augments experimental atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2008, 103: 690-693.
- [9] Vion AC, Kheloufi M, Hammoutene A, et al. Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: e8 675-684.
- [10] Liu Z, Han Y, Li L, et al. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169: 1 795-809.
- [11] Mani S, Li H, Untereiner A, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2013, 127: 2 523-534.
- [12] Cheung SH, Kwok WK, To KF, et al. Anti-atherogenic effect of hydrogen sulfide by over-expression of cystathionine gamma-lyase (CSE) gene[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e113038.
- [13] Negre-Salvayre A, Audebert N, Camare C, et al. Dual signaling evoked by oxidized LDLs in vascular cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 118-133.
- [14] Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28: 501-505.
- [15] Yao Y, Zhang X, Chen HP, et al. MicroRNA-186 promotes macrophage lipid accumulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting cystathionine gamma-lyase in THP-1 macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 250: 122-132.
- [16] Andreoli V, Gehrau RC, Bocco JL. Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death [J]. *IUBMB Life*, 2010, 62: 896-905.
- [17] Zhang Y, Lei CQ, Hu YH, et al. Krüppel-like factor 6 is a co-activator of NF-kappaB that mediates p65-dependent transcription of selected downstream genes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 12 876-885.
- [18] Kim GD, Das R, Goduni L, et al. Krüppel-like factor 6 promotes macrophage-mediated inflammation by suppressing B cell leukemia/lymphoma 6 expression[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 21 271-282.
- [19] Mgbemena V, Segovia J, Chang TH, et al. KLF6 and iNOS regulates apoptosis during respiratory syncytial virus infection[J]. *Cell Immunol*, 2013, 283: 1-7.
- [20] Ho EA, Piquette-Miller M. KLF6 and HSF4 transcriptionally regulate multidrug resistance transporters during inflammation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353: 679-685.
- (此文编辑 文玉珊)