

过表达 Atg5 蛋白对巨噬细胞泡沫化程度的影响

王平¹, 刘访遥², 姚平波¹, 龚慧琴³

(1. 南华大学附属南华医院重症医学科, 湖南省衡阳市 421002; 2. 南华大学附属第二医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001; 3. 南华大学附属南华医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421002)

[关键词] Atg5; 自噬; 巨噬细胞; 泡沫化; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨过表达 Atg5 蛋白对巨噬细胞泡沫化程度的影响。方法 采用 Atg5 慢病毒和对照组病毒感染 Raw264.7 巨噬细胞, 建立对照细胞系(对照组)和 Atg5 过表达细胞系(观察组)。两组细胞分别加入 50 mL/L ox-LDL 诱导形成泡沫化细胞。采用 Western blot 分析两组细胞蛋白 p62、LC3、CD36 和 SR-A 的变化; 采用高效液相色谱法检测两组细胞内胆固醇酯(CE)、游离胆固醇(FC)和总胆固醇(TC)的变化; 采用免疫荧光和电子显微镜分析两组细胞内脂滴的含量; 采用 ELISA 检测两组细胞培养上清中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平。结果 与对照组比较, 观察组细胞自噬底物 p62 水平显著下调, LC3-II 水平显著上调($P < 0.05$)。与对照组比较, 观察组巨噬细胞 CE、FC 和 TC 含量均显著下调($P < 0.05$)。观察组细胞脂质水平和脂滴的数量较对照组明显下降($P < 0.05$)。与对照组比较, 观察组细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平显著下调($P < 0.05$)。结论 自噬核心蛋白 Atg5 过表达可显著提高巨噬细胞自噬水平, 可能通过自噬降解胞内胆固醇等脂质, 预防巨噬细胞泡沫化, 进而降低动脉粥样硬化的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of over-expression of Atg5 protein on macrophage foam formation

WANG Ping¹, LIU Fangyao², YAO Pingbo¹, GONG Huiqin³

(1. Department of Intensive Care Unit, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Nanhua Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

[KEY WORDS] Atg5; autophagy; macrophages; foam; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of over-expression of Atg5 protein on the degree of macrophage foam.

Methods Raw264.7 macrophages were infected with Atg5 lentivirus and control virus. The control cell line (control group) and the Atg5 over-expression cell line (observation group) were established. Two groups of cells were added 50 mL/L ox-LDL (oxidized low-density lipoprotein) respectively to induce the formation of frothy cells. The levels of protein p62, LC3, CD36 and SR-A were analyzed by western blot. The changes of intracellular cholesterol metabolism (cholesterol CE, free cholesterol FC and total cholesterol TC) were detected by HPLC (high performance liquid chromatography). The contents of lipid droplets in the two groups were analyzed by immunofluorescence and electron microscopy. The levels of inflammatory factors including TNF- α , IL-6 and IL-1 beta were detected by ELISA in cell culture supernatants of two groups. **Results** Compared with the control group, the level of the autophagic substrate p62 was significantly down-regulated and the level of LC3-II was significantly up-regulated in the observation group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the contents of CE, FC and TC of macrophages in the observation group significantly decreased ($P < 0.05$). The level of cell lipid and the number of lipid droplets in the observation group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the levels of inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1

[收稿日期] 2018-10-16

[修回日期] 2019-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81461434); 湖南省自然科学基金科卫联合项目(2018JJ6122); 衡阳市科技局项目(2012KJ163); 南华大学项目(2012FS028)

[作者简介] 王平, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 wangping1980@163.com。通信作者刘访遥, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的防治, E-mail 为 10615965@qq.com。

beta in the observation group were significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** The over-expression of Atg5, autophagy core protein, can significantly enhance the autophagy level of macrophages. The Atg5 may degrade intracellular cholesterol and other lipids to prevent macrophage froth, thus reducing the occurrence of atherosclerosis.

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要病理学基础,流行病学分析显示其与冠心病、心肌梗塞、卒中等疾病的发生和发展存在密切关系^[1-2]。随着对动脉粥样硬化研究的不断深入,发现巨噬细胞摄入大量氧化型低密度脂蛋白或者胆固醇后会向泡沫细胞转化,这一现象是动脉粥样硬化形成过程中重要的步骤^[3-4]。巨噬细胞泡沫化后会发生慢性炎症反应,造成细胞炎症因子水平分泌增加,进一步促进了动脉粥样硬化的发展。自噬是真核细胞高度保守的生物学行为,在维持糖代谢和脂代谢过程中发挥着重要的作用^[5-6]。目前研究显示自噬核心蛋白 Atg5 或 Atg7 敲除的小鼠,肝脏细胞显著增大,脂质大量积累,并伴有明显脂肪肝表型,说明自噬缺陷可抑制细胞脂质代谢^[7-8]。基于这一观点,本文在巨噬细胞中分析提高自噬水平是否会降低巨噬细胞脂质的积累,进而降低巨噬细胞泡沫化水平,为临床动脉粥样硬化治疗提供一定的策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

巨噬细胞 RAW264.6 购自美国 ATCC 公司; PRMI-1640 培养基、胎牛血清和青链霉素均购自美国 Gibicon 公司; p62 和 LC3 兔多克隆抗体均购自日本 MBL 公司; CD36 和 SR-A 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; ox-LDL 购自北京生物技术公司; HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗购自北京中山金桥生物有限公司; BODIPY493/503 购自美国 Thermo Fisher 公司; TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。高效液相所用的有机试剂购自美国 Sigma 公司。

1.2 Atg5 稳定细胞系构建

Raw264.7 巨噬细胞采用 PRMI-1640 (含 10% FBS 和 1% 青链霉素) 培养至指数生长期,然后用 0.25% 胰酶消化后,接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,将入空载体慢病毒和 Atg5 过表达的慢病毒,感染 24 h,细胞:病毒=1:100。连续感染两次后,细胞采用 1 mg/L 嘌呤霉素处理 24 h,杀死没有感染的细胞,存活的细胞即为空载体病毒和 Atg5 过表达病毒感染成功的细胞,即为对照细胞系(对照组)和 Atg5 过表达细胞系(观察组)。

1.3 巨噬细胞泡沫化诱导

将对照组和观察组细胞培养于 PRMI-1640 培养基中(含 10% FBS 和 1% 青链霉素),待细胞贴壁后,加入 ox-LDL (50 mg/L) 共同培养 48 h,诱导泡沫细胞形成。

1.4 Western blot 检测自噬和泡沫化相关蛋白的表达

将泡沫化的巨噬细胞采用上样缓冲液直接裂解,然后金属浴煮沸 20 min,采用 10% 分离胶进行 SDS-PAGE,待溴酚蓝跑出分离胶,然后采用水平电泳将 SDS-PAGE 上的蛋白质转移至 PVDF 膜上,结束后用 5% BSA 封闭 1 h,然后将 p62、LC3、CD36 和 SR-A 的抗体按照比例稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,结束后用 HRP 标记的羊抗兔或者羊抗鼠二抗(1:2000)在室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次,每次 5 min 后,在 PVDF 膜涂上 ECL 发光液,然后进行显影分析。以 Tubulin 作为内标进行分析目的蛋白的表达水平。

1.5 高效液相色谱分析胆固醇代谢

RAW264.7 细胞采用 ox-LDL 处理 48 h 后,弃细胞培养上清,用 PBS 洗涤 2 次后,加入 700 μL 甲醇/异丙醇(V:V=1:2)将细胞全部变性后转移至 1.5 mL 离心管中,然后 12 000 r/min 离心 20 min,将有机相转移至新的 1.5 mL 离心管中,采用真空冷冻干燥剂进行干燥处理,冷却后溶于 100 μL 异丙醇:正庚烷:乙腈(35:12:52, V/V)中,用活性炭去除色素后,取 10 μL 样品采用高效液相进行分析,检测胆固醇脂(CE)、游离胆固醇(FC)和总胆固醇(TC)水平。

1.6 免疫荧光分析细胞脂质水平

Raw264.7 经 ox-LDL 处理 48 h 后,爬片,待细胞贴壁后,用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,用 PBS 洗涤 3 次除去多聚甲醛,然后将 1:2000 稀释的 BODIPY493/503 滴加到对照组和观察组细胞上,室温处理 30 min,然后采用 DAPI 染核,再用 PBS 洗涤 3 次,除去残留的 BODIPY493/503 和 DAPI,然后采用防淬灭剂进行封片,在荧光显微镜下观察脂滴的数量。

1.7 电子显微镜分析泡沫化细胞的脂滴变化

对照组和观察组细胞采用 ox-LDL 处理 48 h 后,细胞采用胰酶消化,然后用 100% FBS 重悬细胞,1 000 r/min 5 min,收集细胞沉淀,并用 2.5% 戊

二醛固定 12 h。用 0.1 mol/L PBS 漂洗 2 次,每次 5 min;用 1.5% 锇酸固定液固定细胞 1 h,再用去离子水漂洗 2 次,每次 5 min,用 2% 醋酸铀固定染色后,依次采用 50%-70%-90%-100% 乙醇和 100% 丙酮进行脱水处理,然后样品采用纯包埋剂室温包埋 2 h 后,依次在 37℃、45℃ 和 60℃ 各聚合 24 h,然后超薄切片机切片,用醋酸铀-柠檬酸铅染色,显微镜下观察,并做统计分析。

1.8 ELISA 分析 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的变化

对照组和观察组细胞采用 ox-LDL 处理 48 h 后,更换新鲜培养基,然后继续培养 48 h,收集细胞培养上清,测定 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子水平。TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的检测严格按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行。

1.9 统计分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞自噬和泡沫化相关蛋白的比较

实验采用慢病毒感染成功建立了对照细胞系和 Atg5 过表达稳定细胞系。在 Atg5 过表达 Raw264.7 细胞中,自噬水平明显增加,表现为自噬底物 p62 水平显著下调,而 LC3-II 水平则显著累积,而泡沫化相关蛋白水平显著下调,表现为 CD36 和 SR-A 蛋白水平显著下调(图 1)。

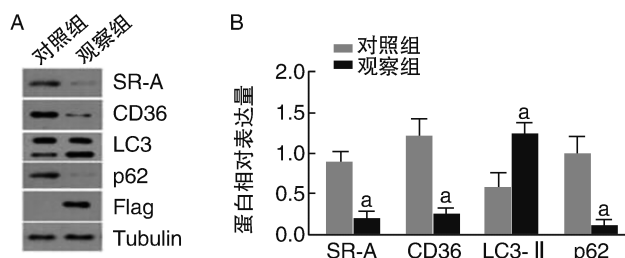


图 1. 两组细胞自噬和泡沫化蛋白表达的比较 A: Western blot 结果; B: Western blot 定量结果。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Expression analysis of autophagy and foam cell formation associated proteins in the control group and observation group

2.2 两组细胞胆固醇代谢的比较

与对照组比较,观察组巨噬细胞胆固醇酯、游离胆固醇和总胆固醇含量均显著下调,差异有统计

学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1. HPLC 分析对照组和观察组细胞胆固醇代谢水平

Table 1. The level of cholesterol metabolism by HPLC in the control group and the observation group

分组	胆固醇酯(g/L)	游离胆固醇(g/L)	总胆固醇(g/L)
对照组	47.22±4.12	32.43±2.09	70.29±5.09
观察组	28.12±5.17	15.20±3.87	45.78±7.12
<i>P</i> 值	3.981	2.191	2.938
<i>T</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 两组细胞胞内脂质水平的比较

BODIPY493/503 染色见图 2,对照组经 ox-LDL 处理后可见细胞内大量被 BODIPY493/503 染色的脂滴,而观察组细胞内被 BODIPY493/503 染色的脂滴较少。透射电子显微镜如图 3 所示,观察组细胞内脂滴数量[(10.32±4.12)个]明显低于对照组脂滴[(25.54±6.98)个]($P < 0.05$)。

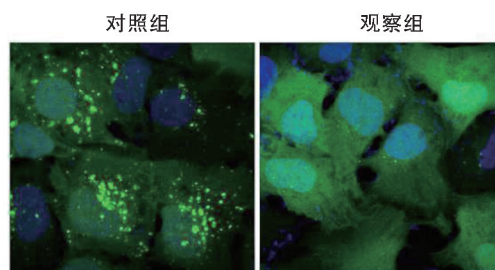


图 2. 免疫荧光分析对照组和观察组细胞内脂质水平(200×)

Figure 2. The level of lipid by immunofluorescence in the control group and observation group(200×)

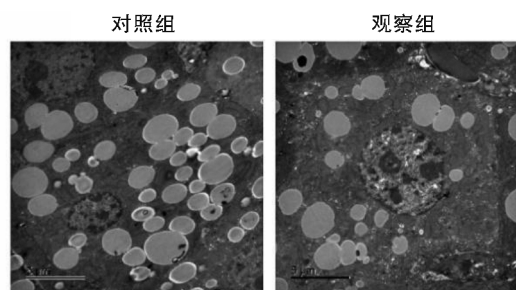


图 3. 电子显微镜分析对照组和观察组脂滴的数量(5900×)

Figure 3. The number of lipid droplets by TEM in the control group and observation group(5900×)

2.4 两组细胞炎症因子水平的比较

与对照组比较,观察组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子水平显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2. 两组细胞炎症因子水平的比较

Table 2. The level of inflammatory cytokines in the control group and observation group

分 组	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-1 β (ng/L)
对照组	78.12 \pm 8.20	102.34 \pm 10.91	205.41 \pm 15.18
观察组	39.19 \pm 6.09	61.29 \pm 7.29	96.72 \pm 9.11
<i>t</i> 值	3.510	3.109	3.289
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

自噬相关蛋白 Atg5 是自噬信号通路中关键性蛋白,存在于大多数真核生物中,具有高度的保守性,其参与两个泛素样连接系统,对自噬小体的形成起着关键作用^[9-10]。在自噬通路中,Atg5 一方面与 Atg12 和 Atg16 形成 ATG12-ATG5-ATG16 三元复合物与自噬体外膜结合,另一方面 Atg5 复合物促进 LC3 向自噬体募集,参与自噬膜泡的弯曲^[11-12]。总之,Atg5 在自噬过程中发挥着举足轻重的作用。而目前研究发现,细胞脂质代谢除了经典的脂肪酸氧化途径外,自噬溶酶体在脂质代谢中发挥着重要作用^[13]。而作为动脉粥样硬化早期表征的巨噬细胞泡沫化现象,主要由于巨噬细胞大量提呈低密度脂蛋白,造成巨噬细胞大量胆固醇酯堆积,造成慢性炎症,加剧了动脉粥样硬化的发生机会。

目前报道发现,提高细胞自噬水平可以促进肝脏脂代谢,缓解非乙醇性脂肪肝的症状,而自噬相关基因的敲除则显著抑制肝细胞的脂代谢^[14-15]。本研究通过在巨噬细胞中过表达自噬相关基因 Atg5,分析了增强巨噬细胞自噬对其泡沫化的影响。研究结果显示,在巨噬细胞中过表达 Atg5 可显著提高细胞自噬水平,表现为 p62 明显降解,LC3-II 显著累积,这一结果与其他细胞表达 Atg5 的表型一致。本研究进一步发现过表达 Atg5 蛋白的巨噬细胞,在 ox-LDL 处理后,细胞中胆固醇代谢水平显著增加,胆固醇水平降低,细胞内脂质水平明显下降,说明提高巨噬细胞自噬水平促进了巨噬细胞脂质代谢,一定程度缓解了巨噬细胞中脂质的积累,有效预防了巨噬细胞泡沫化的进程。巨噬细胞泡沫化会造成巨噬细胞慢性炎症的发生,进而释放各种炎症因子,慢性炎症进一步加剧动脉粥样硬化的发生^[16]。而提高巨噬细胞自噬水平后可见炎症因子水平较对照组细胞明显下降,说明提高巨噬细胞自噬缓解了细胞泡沫化程度,进而降低了细胞的慢性炎症反应,进一步有效预防动脉粥样硬化的进展。

本研究结果显示,巨噬细胞过表达 Atg5 可显著

提高细胞自噬水平,降低 ox-LDL 诱导的细胞泡沫化的形成和慢性炎症因子的释放,可能对有效预防动脉粥样硬化的发生和发展具有重要意义。本研究结果提示通过使用一些促进细胞自噬的药物,可能有效预防巨噬细胞泡沫化,延缓动脉粥样硬化的发生和发展。

[参考文献]

- [1] Mancio J, Oikonomou EK, Antoniades C, et al. Perivascular adipose tissue and coronary atherosclerosis [J]. *Heart*, 2018, 104(20): 1654-1662.
- [2] Jackson AO, Regine MA, Subrata C, et al. Molecular mechanisms and genetic regulation in atherosclerosis [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2018, 21(25): 36-44.
- [3] Sargolzaei J, Chamani E, Kazemi T, et al. The role of adiponectin and adipolin as anti-inflammatory adipokines in the formation of macrophage foam cells and their association with cardiovascular diseases [J]. *Clin Biochem*, 2018, 54(13): 1-10.
- [4] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95(11): 1153-1165.
- [5] Martinez Lopez N, Tarabra E, Toledo M, et al. System-wide benefits of intermeal fasting by autophagy [J]. *Cell Metab*, 2017, 26(6): 856-871.
- [6] Dong S, Jia C, Zhang S, et al. The REG- γ proteasome regulates hepatic lipid metabolism through inhibition of autophagy [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(3): 380-391.
- [7] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(3): 425-434.
- [8] Martinez LN, Singh R. Autophagy and lipid droplets in the liver [J]. *Annu Rev Nutr*, 2015, 35(3): 215-237.
- [9] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27(11): 107-132.
- [10] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(7): 458-467.
- [11] Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation [J]. *EMBO J*, 2001, 20(21): 5971-5981.
- [12] Mizushima NL, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152(4): 657-668.
- [13] Nguyen TB, Olzmann JA. Lipid droplets and lipotoxicity during autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(11): 2002-2003.
- [14] Chun SK, Lee S, Yang MJ. Exercise-induced autophagy in fatty liver disease [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2017, 45(3): 181-186.
- [15] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131-1135.
- [16] Singh V, Rana M, Jain M, et al. Curcuma oil attenuates accelerated atherosclerosis and macrophage foam-cell formation by modulating genes involved in plaque stability, lipid homeostasis and inflammation [J]. *Br J Nutr*, 2015, 113(1): 100-113.

(此文编辑 朱雯霞)