

TLR4-TLR10-CD36 的识别和炎症信号转导可能参与细胞内天然低密度脂蛋白氧化

刘艳红¹, 王京伟¹, 武军驻²

(1. 武汉大学人民医院检验科, 湖北省武汉市 430060; 2. 武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 动脉粥样硬化; 低密度脂蛋白; 单核细胞; cDNA 阵列; 氧化应激

[摘要] **目的** 探究低密度脂蛋白(LDL)氧化的可能分子机制。**方法** 天然 LDL(100 mg/L)诱导人单核细胞系 THP-1 细胞 0、1、3、5 h。用诱导不同时间点的单核细胞进行表达谱芯片实验,筛选与 LDL 氧化相关的基因。在 mRNA 水平和蛋白质水平上分别用实时定量 PCR 和 Western blot 进一步验证部分微阵列结果。利用 DAVID 数据库进行基因聚类、生物学功能以及与脂质和氧化相关的信号传导途径分析。**结果** LDL 诱导 THP-1 后,细胞内大量生物膜相关基因的表达发生变化,提示脂质氧化的发生定位在生物膜上。LDL 诱导 3 h 后细胞内脂质氧化相关基因的表达发生变化,提示脂质氧化已经开始。差异表达基因的功能注释分析发现,Toll 样受体(TLR)信号通路、凋亡、内吞、细胞周期、脂质筏、脂质结合、定位、转运、细胞黏附、金属离子稳态、氧化还原等生物学通路得到不同程度的富集。天然 LDL 诱导 THP-1 不同时间点炎症因子的 mRNA 以及蛋白水平的表达均受到了抑制,如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 33、c-FOS 等基因的表达随着 LDL 孵育时间的延长,其表达量逐渐降低。**结论** 本研究提示,天然 LDL 的氧化可能与 TLR4-TLR10-CD36 的识别和炎症信号转导有关。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Recognition and inflammation signal transduction of TLR4-TLR10-CD36 may be involved in natural low density lipoprotein oxidation

LIU Yanhong¹, WANG Jingwei¹, WU Junzhu²

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

[KEY WORDS] atherosclerosis; low density lipoprotein; monocyte; cDNA microarray; oxidative stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore the possible molecular mechanism of low density lipoprotein (LDL) oxidation.

Methods Human monocyte line THP-1 cells were induced by natural LDL (100 mg/L) for 0, 1, 3 and 5 hours. Induction of monocytes at different time points was for expression profile microarray experiments, and genes related to LDL oxidation were screened. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to further validate the results of some microarrays at the levels of mRNA and protein, respectively. Gene clustering, biological functions and signal transduction pathways related to lipid and oxidation were analyzed by using the DAVID database. **Results** After LDL induced THP-1, the expression of a large number of genes related to biofilm in cells was changed, suggesting that lipid oxidation was localized on biofilm. The expression of lipid oxidation-related genes changed after 3 hours of LDL induction, which imply that lipid oxidation had begun. Functional annotation analysis of differentially expressed genes revealed that Toll-like receptor (TLR) signaling pathway, apoptosis, endocytosis, cell cycle, lipid raft, lipid binding, localization, transport, cell adhesion, metal ion homeostasis, redox and other biological pathways were enriched to varying degrees. The mRNA and protein expressions of inflammatory factors induced by natural LDL were inhibited at different time points in THP-1. For example, the expressions of tumor necrosis factor α , interleukin-33, c-FOS and other genes decreased gradu-

[收稿日期] 2019-01-25

[修回日期] 2019-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170273)

[作者简介] 刘艳红,副主任医师,主要从事临床血液学检验研究,E-mail 为 1376090683@qq.com。

ally with the prolongation of incubation time of LDL. **Conclusion** This study suggests that the oxidation of natural LDL may be related to the recognition and inflammation signal transduction of TLR4-TLR10-CD36.

体外和体内研究数据表明,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化损伤在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发展的多个阶段都发挥重要作用^[1],随着进入内皮下的 LDL 的增加,动脉壁内的所有细胞包括内皮细胞、平滑肌细胞以及单核源性巨噬细胞都可以使聚集的 LDL 氧化成氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。内皮下稳定的高 LDL 水平又会导致内皮下聚集更多的炎性细胞、脂质以及细胞外基质,最终发展成粥样斑块。少数的粥样斑块会发生破裂,引发急性血栓性血管疾病,例如心肌梗死、脑卒中和心源性猝死。尽管 LDL 氧化在 As 的发生发展中发挥如此重要的作用,但体内 LDL 的氧化机制至今不甚明瞭,这也可能是体外具有明显抗 LDL 氧化作用的抗氧化剂在临床上却未能奏效的内在原因^[2-3]。

LDL 在体内有其重要的生物学功能,因此不是所有的 LDL 都需要氧化,事实证明也并非所有的 LDL 都接受了氧化,那么到底哪些 LDL 会被氧化呢?我们实验室前期研究结果推测体内存在 2 种 LDL 氧化模型^[4],即主动氧化与被动氧化,我们假设 LDL 主动氧化过程中应该存在某种分子作为氧化修饰标签,只有被标签修饰或者结合的 LDL 才会被氧化相关细胞捕获并氧化,并且这一过程存在特异性的识别机制而非随机发生,因此希望我们的基因表达谱数据能够为找到这个 LDL 主动氧化修饰的识别机制提供一定的线索。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

人源 LDL 购自 ProSpec 公司(Pro-562, Rehovot, Israel); β -actin(sc-1616r)抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司(Santa Cruz, CA, USA); FBJ 骨肉瘤病毒癌基因同源物 C(FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog, c-FOS)(ab18119)抗体购自 Abcam 公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)(a0277)购自 Abclonal 公司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自 KPL 公司(Gaithersburg, MD, USA)。

1.2 细胞培养及天然 LDL 的处理

THP-1 细胞系购自中国培养物保藏中心。在 RPMI 1640 培养基(Hyclone, Logan, UT, USA)中加

入青霉素(10^5 U/L)、链霉素(10^5 μ g/L)和 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone, Logan, UT, USA),在 5% CO₂、37 °C 下培养,直到细胞在 60 cm² 细胞培养皿中达到 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 个,磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,LDL 诱导前在无血清 RPMI 1640 培养基中预孵育 2 h。

在天然 LDL 刺激之前,除去无血清培养基,加入含 1% FBS 的新鲜 RPMI 1640 培养基,随后加入天然 LDL(100 mg/L),在 1 μ mol/L Cu²⁺ 存在下,作用 1、3、5 h 后收获细胞。在无血清 RPMI 1640 培养基中预孵育后的细胞直接收获作为对照细胞。

1.3 总 RNA 的分离纯化

在分别诱导 0、1、3、5 h 后收获 LDL 处理的 THP-1 细胞。使用 TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)按照制造商提供的说明书提取总 RNA。RNA 的进一步纯化使用 RNEASY 迷你试剂盒(Qiagen, Valencia, CA, USA),根据制造商的说明书使用无 Rnase 的 DNase 消化以完全除去 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳和安捷伦 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, CA, USA)确定总 RNA 的产量、完整性和纯度。通过 RIN 评分评价 RNA 的质量符合基因表达分析标准,分数高于 7。

1.4 探针标记、微阵列杂交及影像分析

每个样品的 RNA(10 ng)被扩增并使用单色 Low Input Quick Amp Labeling Kit(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)标记 CY3 染料,标记的 cRNA 由 RNeasy 迷你试剂盒(QIAGEN, GmbH, Germany)纯化。1.65 μ g CY3 标记的 cRNA 与安捷伦全人类基因组(4 $\times$ 44 K, Agilent, San Diego, CA, USA)杂交,其中含有超过 41 000 个人类基因和转录本。杂交过程使用基因表达杂交试剂盒(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)在杂交炉(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)中完成。根据说明书,在 17 h 杂交后,在染色皿中(Thermo Shandon, Waltham, MA, USA)用基因表达洗涤缓冲试剂盒(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)洗涤芯片,并用安捷伦微阵列扫描仪(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)扫描。使用 Feature Extraction Software 10.7(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)提取数据。使用 Gene Spring Software 11(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA),利用分位数算法对原始数据进行归一化。微阵列分析由

上海生物公司进行。在进行注释和通路分析后,选择表达水平超过 5 倍的基因进行进一步分析。

1.5 Western blot 分析

LDL 处理的 THP-1 细胞(1×10^7 个细胞)用 250 μ L RIPA 缓冲液裂解,RIPA 缓冲液中含有 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 1 μ mol/L 完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche, Indianapolis, IN, USA)。用 Bradford 法测定细胞匀浆的蛋白浓度。等量的蛋白质经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)。含 5% 无脂牛奶的 TBST 封闭硝酸纤维素膜,在 4 $^{\circ}$ C 下,用对 β -actin、白细胞介素 33(interleukin-33, IL-33)、TNF- α 和 c-FOS 的特异性抗体(1 : 1 000)孵育,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育(1 : 10 000)。ECL 试剂盒(Perkin-Elmer Inc, Boston, MA, USA)显色。使用美国国立卫生研

究院图像 J 处理系统进行密度测量分析。

1.6 实时定量 PCR 分析

为了验证微阵列分析所获得的数据,进行了实时定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)。用 qRT-PCR 进一步评估通过微阵列分析鉴定出的具有统计学意义的选择基因。采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照。qRT-PCR 的循环条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,40 次循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,末段延伸 60 $^{\circ}$ C 5 min,熔解曲线 75 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C,每 20 s 升温 1 $^{\circ}$ C。不含 cDNA 模板的体系作为对照。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算解离曲线及相关基因表达(Livak and Schmittgen, 2001)。所有引物(表 1)均使用引物 Prime 5.0 设计,并由中国上海英特朗生物技术有限公司合成,qRT-PCR 检测在不同时间点对每个样品进行 3 次重复,并计算平均值和标准差。

表 1. 实时定量 PCR 引物信息

Table 1. The information of primers used in quantitative real-time PCR

基因	引物序列	转录本	产物(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
GAPDH	F:5'-ACTTTGGTATCGTGGAAGGACTCAT-3'	NM_002046	255	60
	R:5'-GTTTTCTAGACGGCAGGTCAGG-3'			60
TLR3	F:5'-TTGTATCACTTGCTCATTCTCCCT-3'	NM_003265	170	60
	R:5'-ATTTTCTAGACCTCTCCATTCTCTG-3'			60
TLR10	F:5'-TTATGAAGAAGGTAGCCTGCCC-3'	NM_001017388	246	60
	R:5'-AGGAAAAGGTCGTCCCAGAGTA-3'			60
TNF- α	F:5'-CTGCTGCACTTTGGAGTGATC-3'	NM_000594.2	102	60
	R:5'-GGTTCGAGAAGATGATCTGACTG-3'			60
c-FOS	F:5'-CGTCTCCAGTGCCAACTTCAT-3'	NM_005252	290	60
	R:5'-CAGCCATCTTATTCTTTCCCT-3'			60
RGS16	F:5'-GGGCAGTAAACACAGCAAAGAGAAT-3'	NM_002928.3	300	60
	R:5'-AGGTTTCATCTCGTCAGCTCGT-3'			60
NFAM1	F:5'-TGCAGGATCACCTATCCATACAC-3'	NM_145912.5	107	60
	R:5'-TGGCAGTTTGTGGCTTCTTAG-3'			60
CDO1	F:5'-GCCATGAGCTCAATGTAGAGGAG-3'	NM_001801	211	60
	R:5'-AGAAAGCAGTGGGAGTTGGTATG-3'			60
AOC3	F:5'-CTTTGCCCTTGTTTGTGTCCT-3'	NM_001277731	89	60
	R:5'-TGGGAGATACAGAGGGGCAAT-3'			60

1.7 统计分析

qRT-PCR 重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验比较各组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 DAVID(注释、可视化和集成发现数据库)工具(Dennis, Sherman, et al, 2003; Huang da,

Sherman, et al, 2009)分析了 3 136 个差异基因生物学过程和途径的富集。数据库包括 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)(Kanehisa, Goto, et al, 2004)、BioCarta([http://www. biocarta. com/webcite](http://www.biocarta.com/webcite))、Reactome(Croft, O'Kelly, et al, 2011)、

PANTHER (Mi, Lazareva-Ulitsky, et al, 2005) 和 Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) (Ashburner, Ball, et al, 2000)。由于本研究的目的是探索性研究, 选择了相对宽松的 Cutoff 值, 即选择 Benjamini Horchberg 程序 (Benjamini and Horchberg 1995) 后的 $FDR < 10\%$ 以及在通路或生物过程中至少 3 个差异基因, 用于戴维分析。

2 结果

2.1 LDL 刺激后转录谱的变化

失调基因以相对转录水平的倍数变化 (fold change, FC) 定义。相对转录水平为 $-1 \leq \text{Log FC} \leq 1$ 的基因被认为没有显著变化。本研究利用 DNA 微阵列技术对 41 000 个转录本进行分析, 发现在 LDL 处理 THP-1 细胞后 1、3、5 h 内, 分别有 842、664、703 个基因 ($FC \geq 2$) 上调, 807、577、736 个基因 ($FC \leq 0.5$) 下调 (表 2)。

2.2 基因聚类及通路分析

与对照组相比, LDL 刺激后 1 个以上时间点的 THP-1 基因中有 3 136 个基因被鉴定为失调基因。为了进一步研究由天然 LDL 影响的差异基因的生物学过程和通路, 使用注释、可视化和集成发现数

据库 (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, DAVID) 对结果进行分析。富集了包括“Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路”、“炎症反应”和“脂质筏” ($FDR < 25\%$, 最少 3 个基因) 等 56 个通路和生物学过程。

表 2. LDL 刺激 THP-1 不同时间基因的差异表达 (个)
Table 2. The differentially expressed genes in LDL-induced THP-1 for different time (number)

项目	上调	下调	合计
1 h 比 0 h	842	807	1649
3 h 比 0 h	664	577	1241
5 h 比 0 h	703	736	1439
5 h 比 1 h	736	631	1367
3 h 比 1 h	1119	1710	2829
5 h 比 3 h	623	741	1364

2.3 生物膜相关富集条目

对差异表达基因的功能注释分析发现 LDL 诱导 THP-1 后, 细胞内大量生物膜相关的基因的表达量发生了变化, 我们认为这与 LDL 的跨膜转运以及在生物膜上的氧化相符合 (表 3)。

表 3. 生物膜相关的 $FC > 2$ 的融合差异表达基因的功能注释
Table 3. Functional annotation of merged differential expression genes related to biofilms with $FC > 2$

类别	GO 条目	融合数	%	P 值
GO_CC	质膜成分	239	11.601942	0.0139772
GO_CC	与质膜整合成分	130	6.3106796	0.0568121
BaiduGO_CC	质膜固有成分	130	6.3106796	0.0946961
Interpro	C2 钙依赖性膜靶向	29	1.407767	0.000148
Interpro	C2 膜靶向蛋白	23	1.1165049	0.000582
GO_CC	脂质筏	20	0.9708738	0.0847123
GO_CC	细胞器膜固有成分	20	0.9708738	0.0990298
GO_BP	跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路	19	0.9223301	0.0155351
GO_CC	顶外侧质膜	17	0.8252427	0.0310819
GO_CC	内质网膜固有成分	11	0.5339806	0.0791677
Interpro	铁还原酶样跨膜组分 N 端	5	0.2427184	0.0244849

2.4 Toll 样受体通路相关基因验证

研究发现 Toll 样受体通路在 ox-LDL 的信号转导过程中具有重要生物学作用, 但是其在天然 LDL 氧化中的生物学作用却鲜少被提及, 我们的芯片数据显示天然 LDL 可以诱导 THP-1 细胞内的 TLR3 与 TLR10 表达量的上调。我们用 qRT-PCR 对

TLR3、TLR10 的 mRNA 表达水平进行验证, 结果显示无论与对照组还是与 1、3 h 刺激相比, 天然 LDL 作用 5 h 后 TLR3 与 TLR10 都有显著升高 (图 1)。

2.5 LDL 刺激后炎症因子的变化

As 形成过程中从斑块形成到破裂的各个阶段, 都有不少炎症细胞和炎症介质参与。研究表明, 血

管内皮细胞受损是炎症反应的始动环节。血管内皮细胞在受到病原微生物感染、脂质浸润等外界刺激因素发生损伤时,损伤局部发生炎症反应,一方面内皮细胞表达多种黏附分子,参与单核细胞和 T 细胞等炎症细胞以滚动、黏附、迁移和积聚的形式转移到受损内皮下的过程;另一方面又分泌多种促炎因子如 TNF、干扰素 γ 、IL-1、IL-8、IL-12 等;同时在内膜下,单核细胞激活转化为巨噬细胞并摄入 ox-LDL,从而进一步分泌促炎因子(如 TNF)、生长因子

(如血小板源性生长因子)和其他水解蛋白酶(如金属蛋白酶等)。我们对天然 LDL 诱导的差异表达基因进行功能注释发现,大量差异表达基因富集到炎症反应及防御反应条目内,可见炎症反应在天然 LDL 的氧化以及信号转导中发挥着重要作用;我们通过 qRT-PCR 以及 Western blot 对该通路相关的差异表达基因的 mRNA 以及蛋白表达水平进行了验证(图 2)。

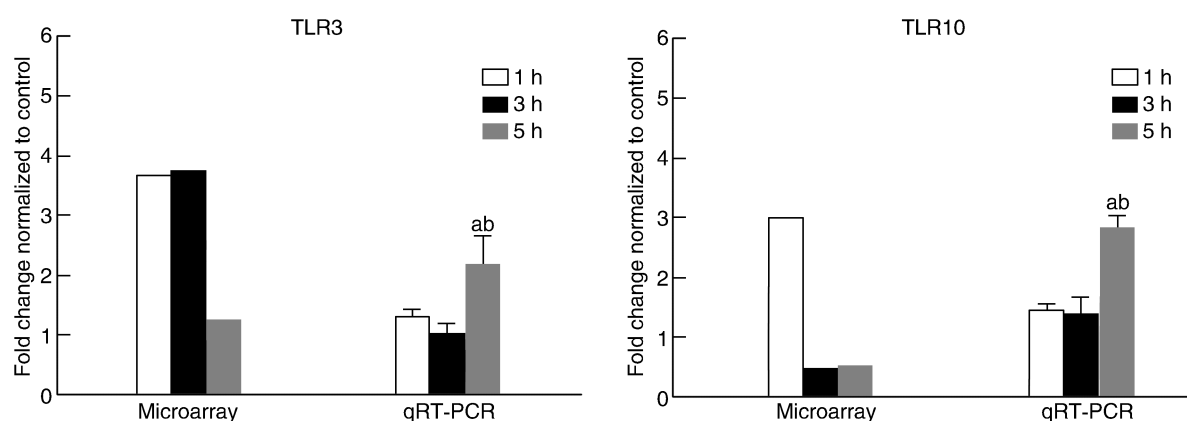


图 1. 天然 LDL 对 THP-1 细胞内的 Toll 样受体基因表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与 1 h 比较;b 为 $P<0.05$,与 3 h 比较。
Figure 1. Effects of native LDL on the expression of Toll-like receptors in THP-1 ($n=3$)

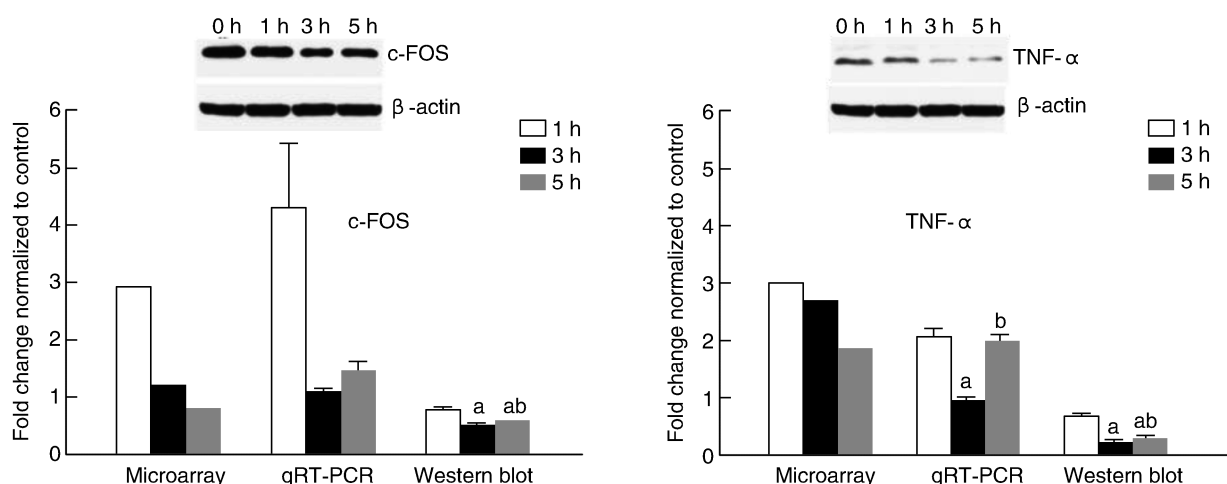


图 2. 天然 LDL 对 THP-1 细胞内炎症相关基因表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$,与 1 h 比较;b 为 $P<0.05$,与 3 h 比较。
Figure 2. Effects of native LDL on the expression of inflammation-related genes in THP-1 ($n=3$)

2.6 脂质筏相关的基因验证

我们都知道关于细胞内 LDL 的氧化定位,尤其是我们提出来 LDL 的选择性主动氧化,一直都是颇具争议性的话题,有的说天然 LDL 的氧化发生在细胞膜上,有的说发生在胞质内,最近有实验证据指向氧化发生在溶酶体的生物膜上^[5]。我们的芯

片数据发现天然 LDL 的诱导导致细胞内大量生物膜相关基因的表达量发生变化,因此我们推测 LDL 的氧化很有可能发生在细胞的生物膜上,更倾向于溶酶体膜上。我们实验室认为选择性进行主动氧化的 LDL 被贴上某个生物标签后进入到生物膜上的脂质筏内发生反应,因为脂质筏为 LDL 的氧化提

供了一个密闭的反应空间,使其不受外界抗氧化环境的影响,这也是临床单纯抗氧化疗效不佳的原因。因此我们分析差异表达基因中与脂质筏相关的基因,发现与脂质筏相关的基因有 G 蛋白信号通

路调节蛋白 16 (regulator of G protein signaling 16, RGS16)、含 ITAM 基序的 NFAT 激活蛋白 1 (NFAT activating protein with ITAM motif 1, NFAM1) 等,分别从 mRNA 表达水平进行验证(图 3)。

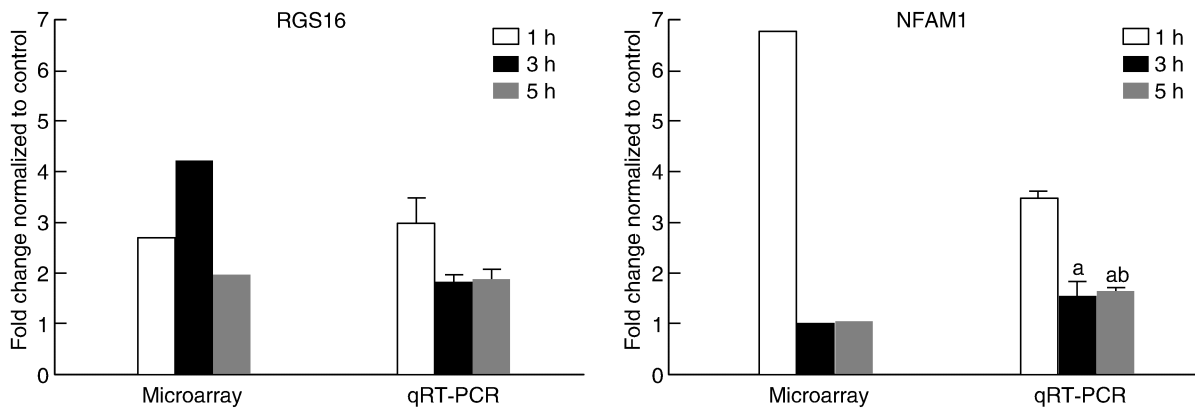


图 3. 天然 LDL 对 THP-1 细胞内脂质筏相关基因表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 1 h 比较; b 为 $P<0.05$, 与 3 h 比较。

Figure 3. Effects of native LDL on the expression of lipid raft-related genes in THP-1 ($n=3$)

2.7 氧化还原相关酶类的基因验证

虽有大量的文献报道指出一些氧化还原相关的酶参与 LDL 的氧化,但是至今仍然不能通过抑制某种氧化酶而阻断 LDL 的氧化,说明细胞内 LDL 的氧化是一个多种酶参与的复杂过程,不可能通过抑制单一的酶而阻断其氧化。我们希望通过高通量

的芯片数据为 LDL 氧化相关酶提供新的候选氧化酶,我们的芯片数据分析发现 LDL 体外孵育 THP-1 细胞的确有大量氧化相关酶的 mRNA 表达水平发生变化。我们对其中部分氧化还原相关酶进行了验证(图 4)。

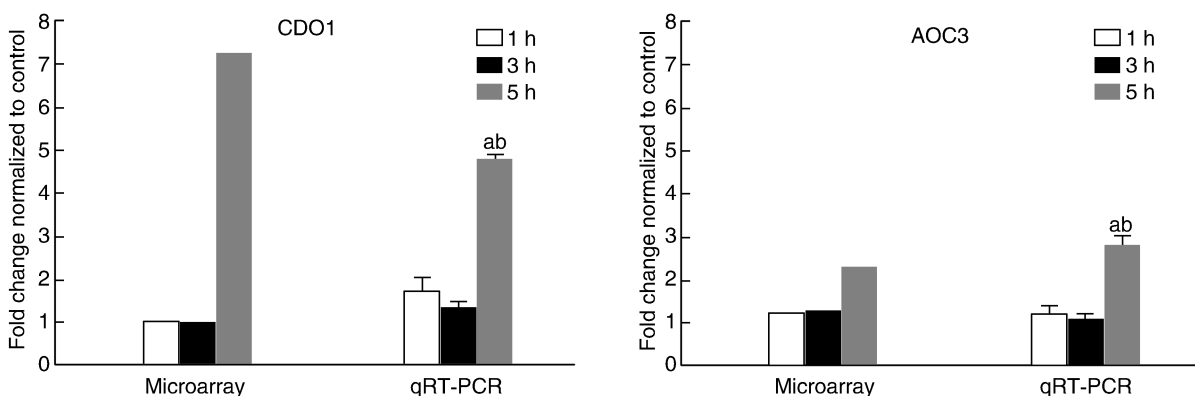


图 4. 天然 LDL 对 THP-1 细胞内的氧化还原相关基因表达的影响($n=3$) a 为 $P<0.05$, 与 1 h 比较; b 为 $P<0.05$, 与 3 h 比较。

Figure 4. Effects of native LDL on the expression of redox-related genes in THP-1 ($n=3$)

3 讨论

本实验室早期通过检测共轭双烯生成量的方法监测 LDL 刺激单核细胞 THP-1 不同时间点内的脂质氧化程度。LDL 诱导单核细胞 9 h 后,细胞内的脂质氧化反应程度达到最高峰,但针对 9 h 样品

进行芯片表达谱实验发现 1 651 个信号转导相关基因中与对照相比只有 13 个 FC 大于 2 的差异表达基因^[6]。我们推测虽然 LDL 刺激 9 h 细胞内的脂质氧化程度达到峰值,但已不再具有促进细胞内 LDL 氧化相关基因表达的能力。因此我们分别取 LDL 诱导 THP-1 细胞 1、3、5 h 三个时间点来设计表达谱芯

片实验。同时由于芯片技术的日益发展,我们选用安捷伦公司的人全基因表达谱 4×44 K 芯片,该芯片包含 41 000 个转录本,相比前期的定制芯片(1 651 个信号转导相关转录本)其文本库大大增加,对我们筛查 LDL 氧化相关的差异表达基因更为有利。

细胞介导的 LDL 氧化虽然已经取得了很大的研究进展,但是 LDL 的识别、转运、信号转导、氧化、定位这一连贯的生物学过程却很难被串联起来。我们通过天然 LDL 与单核细胞 THP-1 的体外共孵育模拟 LDL 氧化过程,并利用表达谱芯片的技术广谱筛查 LDL 诱导相关的基因表达变化,并对变化基因进行验证和分析,希望能够对细胞从识别到氧化清除脂蛋白的连续过程给予解释,为临床高脂血症病人以及 As 病人的早期诊断和预防提供新的线索,为临床的有效治疗提供新的靶点。

LDL 作用 THP-1 细胞 5 h 后,结果显示 TLR3 与 TLR10 的表达显著升高。和其他 TLR 家族一样,TLR10 有多个富含亮氨酸重复序列以及 TIR (Toll/interleukin-1 receptor) 结构域,与 TLR1 和 TLR6 具有较高的同源性。TLR 可通过形成同源二聚体或异源二聚体的形式协同执行功能。研究发现当 TLR10 与 TLR1 或 TLR2 或其他 TLR 家族形成同源或异源二聚体时,可以通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 向胞内发送信号^[7]。单核细胞/巨噬细胞是表达 TLR 种类最多的细胞^[8],有报道指出 ox-LDL 通过激活 THP-1 细胞内 MyD88 依赖 CD36-TLR4-TLR6-NF- κ B 信号通路发挥促 IL-1 β 表达的作用,该通路中 TLR4-TLR6 以异源二聚体的形式存在并发挥功能^[9]。我们前期脂质筏质谱分析的结果^[10]表明天然 LDL 作用于单核/巨噬细胞后 TLR6 在 mRNA 水平没有变化而在脂质筏内的蛋白水平则明显降低。说明 TLR6 在天然 LDL 的识别以及信号转导中不发挥作用。而与 TLR6 具有较高同源性的 TLR10 在本研究中的表达水平则明显增加,因此我们猜测 TLR10 或许可以代替 TLR6 在 TLR4-TLR6-CD36 信号通路中的作用参与天然 LDL 的识别与信号转导。进一步的研究拟通过激光共聚焦及免疫共沉淀证明 LDL 作用 THP-1 细胞后细胞膜上 TLR4-TLR10-CD36 复合体的存在。同时脂质筏质谱分析的结果也显示 TLR3 在脂质筏内的含量相比对照组下降 62 倍,我们推测可能与氧化过程中伴随的炎症反应相关。

有实验证据显示 LDL 氧化发生在溶酶体的生

物膜上^[5]。LDL 被 TLR4-TLR10-CD36 复合体识别后需要转运到溶酶体。囊泡是连接不同细胞、细胞器以及细胞内外的功能结构,它负责生物大分子在细胞与细胞器间的转运,如脂质和蛋白质等都需要囊泡的运输。双 C2 域蛋白 α (double C2 domain alpha, DOC2A) 和 DOC2B 是与突触囊泡胞外分泌相关的 2 个同源基因^[11];我们的芯片结果提示 LDL 刺激后 THP-1 细胞内其表达逐渐增高,刺激 3、5 h 后表达量分别上升 2 倍和 26.75 倍。说明 LDL 诱导后细胞内的这种膜性运输功能得到提高。核内体或内体 (endosome) 是真核细胞内的膜结合细胞器,属于囊泡结构,是细胞内吞过程中的一种密闭的囊泡性区室运载体,核内体既可从细胞膜转运至溶酶体后降解,也可再循环回到细胞膜。根据细胞内吞作用的不同时间阶段可将核内体分为初级内体、次级内体以及再循环内体,3 种内体可被三磷酸鸟苷结合蛋白等标记而区分。内吞作用中的囊泡一旦从细胞膜上释放,首先与初级内体融合,再成长为次级内体与溶酶体融合^[12]。可以推测细胞内 LDL 的转运可能主要由核内体参与完成。进一步的研究拟通过分别标记核内体与 LDL 证明其转运过程。

我们的芯片数据显示 LDL 与单核细胞孵育不同时间后炎症反应通路富集明显,86 个炎症相关基因表达量发生不同程度改变,其中变化规律最为明显的是 c-FOS 和 TNF- α 。c-FOS 基因与心脏病风险的相关性远远高于 C 反应蛋白,检测循环单核细胞内 c-FOS 基因的表达可以为临床 As 的早期发现予以提示^[13]。As 病人循环白细胞内 c-FOS 基因的表达水平与病人的吸烟史有关,c-FOS 基因的转录水平可以作为吸烟的累积生物标志物,提示烟草内尼古丁可能作用于 c-FOS^[14]。众所周知吸烟是心血管风险预测模型中的一项独立预测指标,如果炎症因子 c-FOS 基因与 As 病人的吸烟有关,我们便可以 c-FOS 基因为靶点展开研究,将心血管风险独立预测指标吸烟与炎症之间的生物学联系一一揭示出来。大量可以预测心血管疾病患病风险的血液源性生物标记物被单独或组合使用进行心血管患病风险的预测,这些数据的进一步分析将有利于帮助我们建立预测心血管患病风险的最佳模型。

炎症或高水平的 LDL 刺激,导致内皮细胞活化并释放趋化因子,招募单核细胞到血管内皮下并在此处活化成为巨噬细胞。巨噬细胞可以通过各种酶系统氧化修饰堆积在内皮下的 LDL,例如细胞外血浆铜蓝蛋白、对氧磷酶 1、髓过氧化物酶、细胞内的 12/15-脂氧合酶、NADPH 氧化酶 (NADPH

oxidase, NOX)、胞质型磷脂酶 A2 α 。但是至今仍然不能通过抑制某种氧化酶而阻断 LDL 的氧化,因此本研究选择了研究较少的 CDO1 与 AOC3 进行了验证,尝试是否可以寻找到新的线索。

脂质筏是质膜上一个即时形成的动态组装胆固醇、鞘脂类和蛋白质的富含脂质的脂质微区,是免疫反应和炎症反应中十分重要的一个信号转导平台,该平台为信号相关蛋白的瞬时共定位提供了一个物理空间^[15]。我们验证了脂质筏相关基因 RGS16 与 NFAM1 的表达变化。巨噬细胞内髓过氧化物酶以及筏相关的 NOX1 产生氧自由基氧化内皮下 LDL。因此,脂质筏在导致巨噬细胞泡沫化的氧化过程发挥着重要的调节作用^[16]。部分 NOX1 酶定位于脂质筏中,而脂质筏可以为其及其活性亚基提供最适微环境,因此 NOX1 保持活性的必要条件就是脂质筏的定位。氧化应激状态下脂质筏招募、运载 NOX1 至生物膜表面,使其以较高酶活性的形

式参与细胞内的氧化过程^[17]。我们的芯片数据表明 LDL 可以明显促进 THP-1 细胞内 NOX1 的表达,说明 NOX1 在单核细胞内参与 LDL 的氧化。

综上所述,通过对表达谱芯片结果的深入挖掘分析,在大量文献的支持下我们对单核细胞内 LDL 的氧化机制与信号转导作出以下推测(图 5),还有待进一步深入的研究来验证假说的真实与否:

细胞膜上的 TLR4-TLR10-CD36 以复合体的形式参与单核细胞对天然 LDL 的识别、内化以及 LDL 介导的信号转导。天然 LDL 在单核细胞内的转运则主要由核内体介导完成,网格蛋白被膜小窝介导 LDL 的内化后与核内体膜融合,LDL 经由核内体转运至溶酶体,并在溶酶体膜的脂质筏内被氧化。天然 LDL 作用于单核细胞可以抑制炎症因子相关基因的表达,从而促使单核/巨噬细胞向泡沫化细胞转归,同时促进基质金属蛋白酶(MMP)的合成,导致斑块的不稳定。

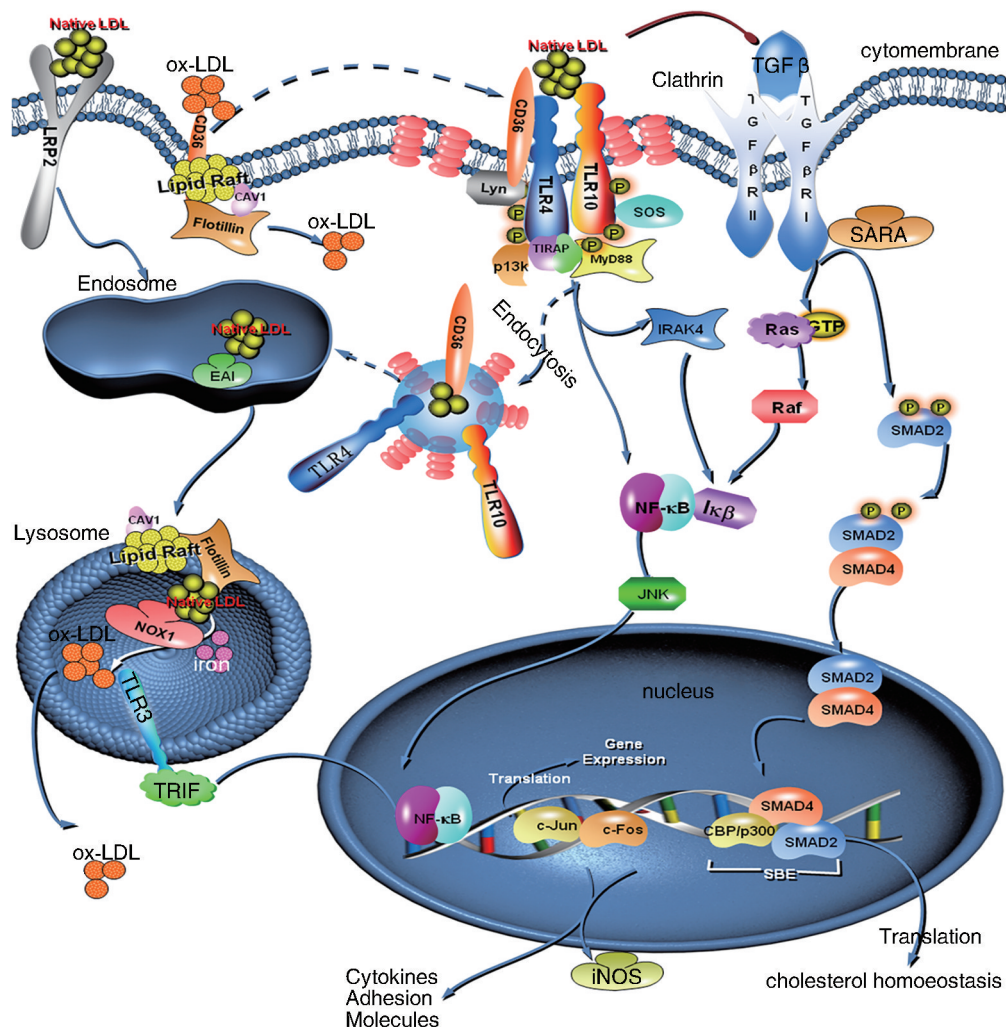


图 5. LDL 诱导 THP-1 的表达谱芯片数据揭示单核细胞内的 LDL 氧化机制

Figure 5. The microarray data of LDL-treated THP-1 reveals the mechanism of LDL oxidation

[参考文献]

- [1] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity[J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(14): 915-924.
- [2] Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S376-S381.
- [3] Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23-24): 1875-1882.
- [4] Tan Z, Liu YH, Liang R, et al. Trans fatty acids influence the oxidation of LDL in ECV304 cells[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2012, 114(8): 880-888.
- [5] Wen Y, Leake DS. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9): 1337-1343.
- [6] He C, Huang R, Du F, et al. LDL oxidation by THP-1 monocytes: implication of HNP-1, SgIII and DMT-1[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 402(1-2): 102-106.
- [7] Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88[J]. *J Immunol*, 2005, 174(5): 2942-2950.
- [8] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides[J]. *J Immunol*, 2002, 168(9): 4531-4537.
- [9] Stewart C, Stuart L, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 155-161.
- [10] Song J, Ping LY, Duong DM, et al. Native low density lipoprotein promotes lipid raft formation in macrophages[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2087-2093.
- [11] Korteweg N, Denekamp FA, Verhage M, et al. Different spatiotemporal expression of DOC2A genes in the developing rat brain argues for an additional, nonsynaptic role of DOC2B in early development[J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(1): 165-171.
- [12] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(8): 513-525.
- [13] Patino WD, Mian OY, Kang JG, et al. Circulating transcriptome reveals markers of atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(9): 3423-3428.
- [14] Saliques S, Teyssier JR, Vergely C, et al. Smoking and FOS expression from blood leukocyte transcripts in patients with coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(2): 931-936.
- [15] Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle[J]. *Science*, 2010, 327(5961): 46-50.
- [16] Schmitz G, Grandl M. Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during ox-LDL-mediated foam cell formation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(9): 1499-1518.
- [17] Liu P, Li RL, Zhang L, et al. Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth[J]. *Plant J*, 2009, 60(2): 303-313.
- (此文编辑 曾学清)