

本文引用: 王文琳, 罗 焯, 柯 晓. 辣椒来源外泌体样纳米囊泡通过 ERK1/2 通路拮抗巨噬细胞向泡沫细胞转化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(6): 503-513. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.06.007.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-06-0503-11

· 实验研究 ·

辣椒来源外泌体样纳米囊泡通过 ERK1/2 通路拮抗巨噬细胞向泡沫细胞转化

王文琳^{1,3}, 罗 焯², 柯 晓³

1. 南华大学中国医学科学院阜外医院深圳医院协作培养基地, 广东省深圳市 518057; 2. 北京大学深圳医院心内科, 广东省深圳市 518057; 3. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心内科, 广东省深圳市 518057

[摘要] [目的] 研究辣椒来源外泌体样纳米囊泡(CDELN)抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化的作用机制。[方法] 通过组织破碎、差速/超速离心及蔗糖密度梯度离心等步骤,分离提纯 CDELN。利用 ox-LDL 刺激 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 建立泡沫细胞模型,并进一步研究 CDELN 对巨噬细胞泡沫化的作用及其机制。采用激光共聚焦显微镜检测 THP-1 源性巨噬细胞对 CDELN 和人 DiL 标记乙酰化低密度脂蛋白(DiL-ac-LDL)的摄取;采用油红 O 染色检测细胞内胆固醇含量,通过分析细胞油红 O 染色阳性面积评估细胞内脂质累积影响;RT-qPCR 和 Western blot 检测清道夫受体 A(SRA)、脂肪酸转运蛋白(CD36)、凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)、ATP 结合盒转运体 A1/G1(ABCA1/G1)以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路 p-ERK、p-p38 MAPK 和 p-c-Jun 的 mRNA 和蛋白表达水平。[结果] CDELN 是大小均一、具有双层膜结构、富含蛋白质和核酸的外泌体样纳米囊泡,能被巨噬细胞摄取。DiL-ac-LDL 摄取实验提示 CDELN 可抑制巨噬细胞的胆固醇摄取。油红 O 染色实验提示 CDELN 可减轻 ox-LDL 诱导下的胞内胆固醇蓄积。RT-qPCR 及 Western blot 显示,CDELN 能够显著降低 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、SRA、CD36、LOX-1 的 mRNA 水平,以及降低 p-ERK、SRA、CD36、LOX-1 蛋白水平。加入 p-ERK 激动剂 Yoda1 后,CDELN 的保护作用被明显逆转。[结论] CDELN 可显著抑制巨噬细胞泡沫化,该作用可能与抑制 MAPK 通路 ERK1/2 的磷酸化水平有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 辣椒来源外泌体样纳米囊泡; 泡沫细胞; MAPK; 巨噬细胞

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Chili-derived exosome-like nanovesicle antagonize the transformation of macrophages into foam cells through ERK1/2 pathway

WANG Wenlin^{1,3}, LUO Ye², KE Xiao³

1. University of South China, Fuwai Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China; 2. Department of Cardiology, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen, Guangdong 518057, China; 3. Coronary Artery Disease Ward 1, Fuwai Shenzhen Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong 518057, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate how chili-derived exosome-like nanovesicle (CDELN) inhibited ox-LDL uptake and reduced ox-LDL-induced intracellular cholesterol accumulation. **Methods** CDELN were isolated and purified using tissue crushing, differential centrifugation, ultracentrifugation and sucrose density gradient centrifugation. Ox-LDL was used to stimulate THP-1-derived macrophages for 24 hours to establish a foam cell model *in vitro*, and the effect of CDELN on macrophage foam and its mechanism were further studied. Confocal laser microscopy was used to detect the uptake of CDELN and DiL-acetylated low density lipoprotein (DiL-ac-LDL) by THP-1 macrophages. Oil red O staining

[收稿日期] 2024-01-30

[修回日期] 2024-02-26

[基金项目] 深圳市科技计划项目(JCYJ20230807150803007、JCYJ20220531091611026、JCYJ20210324124605015);广东省自然科学基金面上项目(2021A1515010178)

[作者简介] 王文琳,硕士研究生,研究方向为心血管病学,E-mail:wenlinwang2021@163.com。通信作者柯晓,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心血管内科,E-mail:xiaokehospital@126.com。

was used to detect intracellular cholesterol content and the positive area of oil red O staining in cells was analyzed to evaluate the effect of intracellular lipid accumulation. RT-qPCR and Western blot were used to detect mRNA and protein levels of scavenger receptor A (SRA) and cluster of differentiation 36 (CD36), lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), ATP-binding cassette transporter A1/G1 (ABCA1/G1). The expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway proteins including p-ERK, p-p38 MAPK and p-c-Jun, were also analyzed. **Results** CDELN were exosome-like nanovesicles with uniform size and double membrane, rich in protein and nucleic acids, which can be taken up by macrophages. The results of DiI-ac-LDL uptake showed that CDELN could inhibit cholesterol uptake of macrophages. Oil red O staining showed that CDELN could reduce ox-LDL-induced intracellular cholesterol accumulation. RT-qPCR and Western blot showed that CDELN could significantly reduce mRNA levels of matrix metalloprotein-9 (MMP-9), SRA, CD36 and LOX-1 and protein levels of p-ERK, SRA, CD36 and LOX-1 in ox-LDL-induced THP-1-derived macrophages. Treatment with the p-ERK agonist Yoda1 diminished the protective effect of CDELN. **Conclusion** CDELN can significantly inhibit macrophage foam cell formation, and this effect may be associated with the inhibition of phosphorylation levels of ERK1/2 in the MAPK pathway.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; chili-derived exosome-like nanovesicle; foam cell; MAPK; macrophage

动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 是全球范围内高患病率、高死亡率的疾病谱之一,其病理生理过程涉及内膜下脂质沉积、内皮细胞受损、炎症细胞大量浸润,粥样斑块形成导致管腔狭窄,最终可引发靶器官缺血性改变^[1]。其中,炎症刺激下巨噬细胞膜表面清道夫受体 A (scavenger receptor A, SRA)、脂肪酸转运蛋白 (cluster of differentiation 36, CD36)、凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 表达水平上调,巨噬细胞大量摄取氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL); 尽管 ATP 结合盒转运体 A1/G1 (ATP-binding cassette transporter A1/G1, ABCA1/G1) 介导部分胆固醇流出,但巨噬细胞内胆固醇摄取和流出不均衡,使得巨噬细胞内出现大量的胆固醇和脂类物质,从而向泡沫细胞转化^[2-5]。泡沫细胞在动脉内膜下蓄积,是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成的起始和关键步骤^[6]。因此,如何控制巨噬细胞泡沫化成为当前治疗 ASCVD 的热点问题。

辣椒 (chili pepper) 是茄科植物中的辣椒属。研究表明辣椒的摄入可减少心血管患者死亡率^[7-10]。辣椒及其提取物被认为具有良好的抗 ASCVD 作用。其中,辣椒提取物中的辣椒素 (capsaicin, CAP) 已被发现具有抗氧化、抗炎和降血压的潜力^[11-13]。然而,辣椒素口服生物利用度低、组织刺激性强等问题始终制约着辣椒素的临床应用。我们从辣椒组织分离并提纯了辣椒来源外泌体样纳米囊泡 (chili-derived exosome-like nanovesicle, CDELN), 其心血管保护作用尚未被研究。本研究中,我们通过 ox-LDL 诱导巨噬细胞建立泡沫细胞模型,初步探索

CDELN 对巨噬细胞向泡沫细胞转化的调控及相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞来源与试剂

THP-1 细胞 (Pricella, CL-0233)。95% 辣椒素 (源叶, S97493)、人 ox-LDL (biolong, YB-002)、新鲜小米辣、99% 蔗糖 (Macklin, S818046)、TRIS-HCL (Solarbio, T8230)、99.7% 无水乙醇 (Macklin, E809061)、99.5% 异丙醇 (Macklin, I811925)、99.5% 甲醇 (Macklin, M813895)、Trizol reagent (Invitrogen, 15596018)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (bio-sharp, BL521A)、ECL 发光液 (Thermo Scientific, 34080)、TBS 缓冲液 (Servicebio, G0001)、TWEEN 20 (Biofrox, 1247ML100)、PBS (Servicebio, G4202)、7.5% PAGE 胶快速制备试剂盒 (EpiZyme, PG111)、高效 RIPA 裂解液 (Solarbio, R0010)、50×通用型蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (Beyotime, P1045)、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲溶液 (Beyotime, P0015L)、PageRuler 预染蛋白 Marker (Thermo Scientific, 26616)、SYBR® Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (含 Rox) (AG, AG11718)、Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR (AG, AG11705)、0.22 μmol/L 滤膜 (Merck Millipore, SLGS025NB)、beckman 超速离心管 (Beckman, 344059)、beckman 高速离心管 (Beckman, 357007)、氯仿替代物 (CWbio, CW3166M)、2×RNA loading buffer (Beyotime, R0215)、small RNA ladder (Beyotime, R0206)、NA-Red (Beyotime, D0128)、Urea-PAGE 凝胶配制试剂盒 RNA 专用 (Beyotime, D0128S)、THP-

1 细胞专用培养基 (Pricella, CM-0233)、亲脂性膜染料 DiL (Invitrogen, D282)、人 DiL 标记乙酰化低密度脂蛋白 (DiL-acetylated low density lipoprotein, DiL-ac-LDL) (MKBio, MP6013)、饱和油红 O 染料 (Servicebio, G1015)、35 mm 玻底共聚焦培养皿 (Biosharp, BS-15-GJM)、4% 多聚甲醛 (Biosharp, BL539A)、DAPI (Beyotime, C1002)、BSA Fraction V (Beyotime, ST023)、BD 脱脂奶粉 (BD, 232100)、细胞计数板 (Invitrogen, C10228)、DEPC 水 (Biosharp, BL510B)。

1.2 CDELN 的分离与提纯

新鲜辣椒去除辣椒柄,超纯水浸泡洗涤多次去除杂质,通风橱晾干后转移至破壁机,250 g 辣椒组织加入预冷的 20 mmol/L Tris-HCl 溶液 500 mL,充分破碎辣椒 3 min/次,共 5 次。滤网过滤除去残渣。分装滤液至 50 mL 离心管,4 °C 下 300 ×g 离心 10 min,取上清;4 °C 下 2 000 ×g 离心 20 min,取上清;4 °C 下 10 000 ×g 离心 30 min,取上清;4 °C 下 135 000 ×g 离心 70 min,弃上清,20 mmol/L Tris-HCl 溶液充分重悬沉淀即粗提的 CDELN。配制 8%、20%、30%、50% 的蔗糖 Tris-HCl 溶液。水平超速离心管内依次缓慢加入 2 mL 的 50% 蔗糖 Tris-HCl 溶液、30% 蔗糖 Tris-HCl 溶液、20% 蔗糖 Tris-HCl 溶液、8% 蔗糖 Tris-HCl 溶液、Tris-HCl 溶液重悬的 CDELN,150 000 ×g 离心 120 min,抽取各分层区的液体,利用纳米颗粒追踪分析技术 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测其纳米囊泡的粒径并定量;使用透射显微镜检测其形貌。鉴定后的优选层 PBS 稀释后 4 °C 下 135 000 ×g 离心 70 min,弃上清, PBS 重悬沉淀即提纯后的 CDELN, -80 °C 储存。

1.3 CDELN 蛋白电泳及考马斯亮蓝染色

取 100 μL 的 1×10^{14} 颗粒/mL CDELN 溶液,加入 100 μL 的 RIPA 裂解液、4 μL 的 50 ×蛋白酶抑制剂、4 μL 的 50 ×磷酸酶抑制剂、4 μL 的 0.05 mol/L EDTA,混匀后 4 °C 摇动裂解 30 min。4 °C 下 12 000 ×g 离心 15 min 留取上清,加入 50 μL 的 5 ×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,混匀后 100 °C 煮样 10 min。冰浴冷却后上样 10% SDS-PAGE 胶,每孔 30 μL,电泳结束进行考马斯亮蓝染色,脱色后曝光。

1.4 CDELN RNA 提取及核酸电泳 NA-Red 染色

1×10^{11} 颗粒 CDELN,加入 1 mL Trizol,颠倒混匀后静置 10 min,加入 250 μL 氯仿替代物,颠倒混匀后室温静置 5 min,4 °C 下 12 000 ×g 离心 15 min。抽取上清加入等量异丙醇混匀,-20 °C 过夜沉降,4 °C 下 12 000 ×g 离心 10 min,弃上清加入现配 75%

乙醇洗涤沉淀,4 °C 下 12 000 ×g 离心 10 min,弃洗涤液晾干 RNA 沉淀,30 μL 无酶水溶解沉淀。加入 30 μL 的 2 ×RNA ladder buffer 混匀后煮样 75 °C,5 min,冰浴冷却后 30 μL/孔上样 15% urea-page 电泳,电泳结束进行 NA-Red 染色,冲洗后曝光。

1.5 细胞培养

采用 THP-1 细胞来源的巨噬细胞建立泡沫细胞模型。37 °C、5% CO₂ 培养箱中使用 THP-1 细胞专用完全培养基培养 THP-1 细胞,半换液法传代维持 $(2 \sim 4) \times 10^5$ 个/mL。状态良好的 THP-1 细胞加入终浓度 160 nmol/L 的 PMA 诱导贴壁,24 h 观察到大部分细胞贴壁后更换新鲜培养基维持培养巨噬细胞。在后续实验研究中,将细胞随机分为:对照组、CDELN 组、模型组 (ox-LDL 组)、ox-LDL+CAP 组、ox-LDL+CDELN 组。

1.6 激光扫描共聚焦显微镜观察 THP-1 源性巨噬细胞对 CDELN 的摄取实验

DMSO 溶解 DiL 粉末制备 1 mmol/L 储存液, PBS 稀释储存液至 100 μmol/L 的 DiL 工作液,10 mL 的 1×10^{11} 颗粒/mL CDELN 与 10 mL 的 100 μmol/L DiL 工作液混合均匀,37 °C 孵育 30 min。DiL-CDELN 混合孵育液 4 °C、135 000 ×g 离心 70 min,沉淀重悬于 10 mL PBS,得到纯化的 DiL-CDELN 用于后续的摄取实验。每个共聚焦小皿接种 5×10^4 个 THP-1 细胞,并诱导贴壁,培养基稀释 DiL-CDELN 至 10^8 颗粒/mL 换液小皿,37 °C 避光孵育 12 h, PBST 洗涤 2 次后,4% 多聚甲醛室温固定细胞 10 min, PBST 润洗 2 次,1 mg/L DAPI 染核 5 min, PBST 洗涤 2 次,覆盖细胞后共聚焦下观察拍照。

1.7 CCK8 法评估 CDELN 对 THP-1 细胞活力的影响

THP-1 接种于 96 孔板中,每孔接种 5 000 个细胞,细胞培养板离心后吸弃培养基,换含有不同剂量 CDELN (0 、 10^7 、 10^8 、 10^9 和 10^{10} 颗粒/mL) 的 RPMI 1640 培养基,继续培养 24 h,每孔 10 : 1 体积加入 CCK8 试剂,避光孵育 2 h,酶标仪测量 450 nm 吸光度。

1.8 激光扫描共聚焦显微镜观察 THP-1 源性巨噬细胞对 DiL-ac-LDL 的摄取

方法同 1.4,CAP 给药浓度 20 μmol/L^[13]、CDELN 给药浓度 10^8 颗粒/mL,p-ERK 激动剂 Yoda1 加药浓度 10 nmol/L^[14-15],加药处理 12 h 后,吸弃培养基。根据说明书,DiL-ac-LDL 药物浓度为 20 mg/L,37 °C 孵育 4 h。孵育结束固定细胞并染核拍照。

1.9 THP-1 巨噬细胞来源泡沫细胞油红 O 染色

每孔 1×10^6 个 THP-1 细胞接种 12 孔板,诱导

贴壁后加入 CDELN、CAP、Yoda1 孵育细胞 12 h。后续使用 80 mg/L 的 ox-LDL^[16-17], 孵育细胞 12 h 后, 吸弃培养基, PBS 润洗细胞 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定细胞 10 min, PBS 润洗细胞 2 次, 60% 异丙醇覆盖细胞 20 s, 吸弃后稍晾干水分, 油红工作液(6 份饱和油红与 4 份蒸馏水充分混合均匀, 置于 70 °C 水浴 30 min, 滤纸过滤)覆盖细胞, 室温避光染色 30 min, 吸弃染色液, 60% 异丙醇快速分化 3 s, 纯水洗 5 min/次共 3 次。PBS 覆盖细胞后显微镜观察拍照。

1.10 RT-qPCR 检测 mRNA 水平

分组及加药步骤同 1.5, 6 孔板每孔 2×10^6 个细胞。加药处理 24 h 后, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 提取细胞 RNA, 方法同 1.4 中 CDELN 的 RNA 提取。Nano Drop 对 RNA 进行定量, Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒进行反转录, 产物 cDNA 应用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒对靶基因进行定量检测。使用 GAPDH 作为内参, mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。

表 1. 引物列表
Table 1. Primer list

基因	引物序列	产物大小
LOX-1	Forward: TTGCCTGGGATTAGTAGTGACC Reverse: GCTTGCTCTGTGTTAGGAGGT	81 bp
CD36	Forward: GGCTGTGACCCGAACTGTG Reverse: AGGTCTCCAAGTGGCATTAGAA	92 bp
SRA	Forward: CTGAGGTCAGTCAGTGGATGG Reverse: AGCCTGGTATGGTATGGTTCT	129 bp
MMP-9	Forward: TGTACCGCTATGGTTACACTCG Reverse: GGCAGGGACAGTTGCTTCT	97 bp
ABCA1	Forward: ACCCACCTATGAACAACATGA Reverse: GAGTCGGGTAACGGAAACAGG	123 bp
ABCG1	Forward: ATTCAGGGACCTTTCCTATTCCG Reverse: CTCACCACTATTGAACTTCCCC	103 bp
GAPDH	Forward: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT Reverse: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197 bp

1.11 Western blot 检测蛋白表达水平

分组及加药步骤同 1.5, 6 孔板每孔 2×10^6 个细胞。加药处理 24 h 后, 预冷 PBS 润洗细胞 2 次, 配制 1 500 μ L RIPA 裂解液、30 μ L 50 \times 蛋白酶抑制剂、30 μ L 50 \times 磷酸酶抑制剂、30 μ L 0.05 mol/L EDTA 混合液, 吹打混匀后每孔加入 250 μ L 冰上裂解细胞 5 min, 刮取细胞后收集裂解液, 4 °C 摇床继续裂解 25 min。离心弃细胞沉淀, BCA 试剂盒定量各组样品蛋白量后, 加入 loading buffer 混匀 100 °C 变性 10 min, 冰浴冷却后加样进行 SDS-PAGE, 每泳

道蛋白定量 30 μ g。电泳结束转 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 稀释一抗 4 °C 过夜孵育, 1 : 10 000 稀释二抗室温孵育 1 h 后显影成像。蛋白抗体信息如下: phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13. 14. 4E) XP[®] Rabbit mAb # 4370 (CST), 稀释比例 1 : 5 000; phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP[®] Rabbit mAb # 4511 (CST), 稀释比例 1 : 5 000; phospho-c-Jun (Ser73) (D47G9) XP[®] Rabbit mAb # 3270 (CST), 稀释比例 1 : 5 000; CD36 (D8L9T) Rabbit mAb # 14347 (CST), 稀释比例 1 : 5 000; OLR1 Polyclonal antibody 11837-1-AP (proteintech), 稀释比例 1 : 1 000; SRA1 Polyclonal antibody 24655-1-AP (proteintech), 稀释比例 1 : 1 000; β -Tubulin (9F3) Rabbit mAb # 2128 (CST), 稀释比例 1 : 8 000; GAPDH (14C10) Rabbit mAb # 2118 (CST), 稀释比例 1 : 8 000; HRP Conjugated Goat anti-Rabbit IgG Goat Polyclonal Antibody # HA1001 (CST), 稀释比例 1 : 10 000; HRP Conjugated Goat anti-Mouse IgG, Light-Chain Specific Antibody # 91196 (CST), 稀释比例 1 : 10 000。

1.12 数据统计方法

数据分析采用 GraphPad Prism 软件。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 9.0 作图并进行统计学分析。两组之间比较采用独立样本 *t* 检验, 三组或者三组以上间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辣椒来源外泌体样纳米囊泡的分离提纯与鉴定

本研究中, 参考大多数中草药来源外泌体样纳米囊泡的提取方法, 通过榨汁破壁预处理结合差速/超速离心、蔗糖密度梯度离心法^[18]从辣椒中分离、纯化获得大量外泌体样纳米囊泡 (图 1A); 利用 NTA 检测其纳米囊泡的粒径并定量, 结果显示 CDELN 颗粒大小较为均一, 集中在 50 ~ 100 nm 区间, 250 g 辣椒可提取 10^{13} 颗粒 CDELN (图 1B); 使用透射显微镜检测其形貌, CDELN 呈典型的类圆形双层囊泡状 (图 1C); 通过 SDS-PAGE、Urea-PAGE 凝胶电泳, 分别结合考马斯亮蓝染色及 NA-Red 染色, 可视化纳米囊泡内蛋白质、RNA 等生物活性小分子, 观察纳米囊泡中蛋白质、RNA 分子的组成及分子量分布 (图 1D、E)。可见, CDELN 是大小均一、具有双层膜结构、富含蛋白质和 RNA 的外泌体样纳米囊泡。

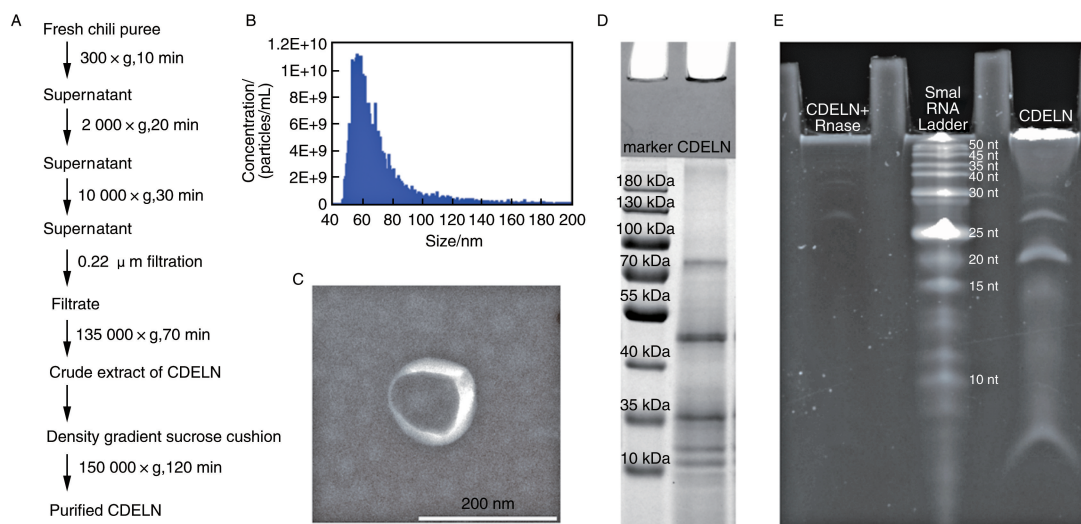


图 1. CDELN 提纯分离与鉴定

A 为 CDELN 提纯过程;B 为 NTA 追踪 CDELN 的粒度及分布;C 为 TEM 下 CDELN 的形态学;
D 为考马斯亮蓝染色 CDELN 主要蛋白带谱;E 为 NA-Red 染色 CDELN 主要 RNA 带谱。

Figure 1. Purification, isolation and identification of CDELN

2.2 CDELN 及 CAP 给药浓度

不同剂量的 CDELN 孵化 THP-1 源性巨噬细胞 24 h, 使用 CCK8 法检测细胞活性比值(图 2A), 结果显示 10^8 颗粒/mL 的 CDELN 效果最佳, 10^9 颗粒/mL 与 10^8 颗粒/mL 的 CDELN 作用效果无统计学差

异, 因此后续采用 10^8 颗粒/mL 的 CDELN 孵化 THP-1 源性巨噬细胞。HPLC 质谱检测 10^8 颗粒 CDELN 内辣椒素含量为 $3.4083 \mu\text{mol}$ (图 2B)。参考其他辣椒素作用细胞研究文献, 采用 $20 \mu\text{mol/L}$ 辣椒素干预 THP-1 源性巨噬细胞。

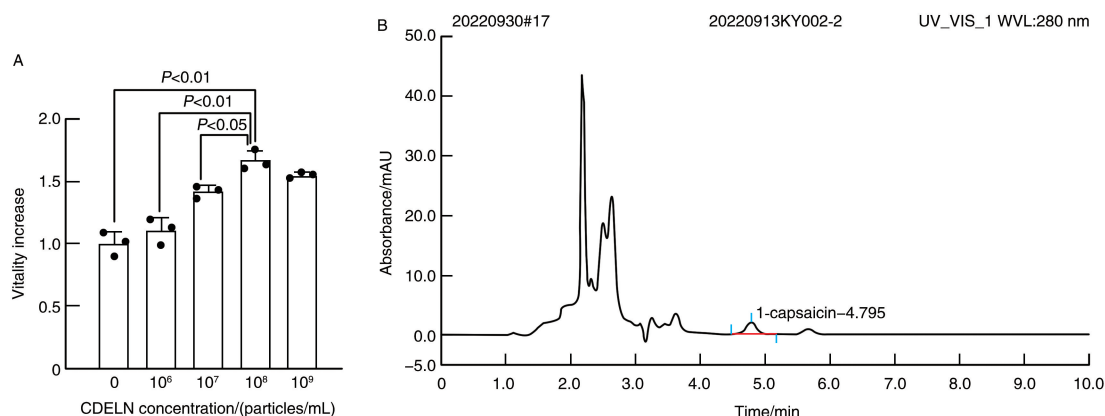


图 2. CDELN 对细胞活力的作用及其内辣椒素含量($n=3$)

A 为 CCK8 检测不同剂量 CDELN 对 THP-1 源性巨噬细胞活性的影响;B 为 HPLC 质谱检测 10^8 颗粒 CDELN 内辣椒素含量。

Figure 2. The effect of CDELN on cell proliferation and its capsaicin content($n=3$)

2.3 THP-1 源性巨噬细胞摄取 CDELN

诱导贴壁后的 THP-1 源性巨噬细胞与 DiI 标记好的 CDELN 共孵育 24 h, DAPI 标记细胞核后共聚焦显微镜观察结果, 巨噬细胞内可见 DiI 红色荧光信号, 提示 CDELN 被巨噬细胞摄取(图 3)。

2.4 共聚焦显微镜观察 THP-1 源性巨噬细胞对 DiI-ac-LDL 摄入能力

与对照组比较, $20 \mu\text{mol/L}$ CAP 或 10^8 颗粒/mL CDELN 孵育巨噬细胞 24 h 都减少了细胞 DiI-ac-LDL 的摄入量, 其中 CDELN 组平均荧光强度降低 18% ($P<0.01$), 表明 CDELN 抑制 THP-1 源性巨噬细胞中 ac-LDL 的摄取(图 4)。

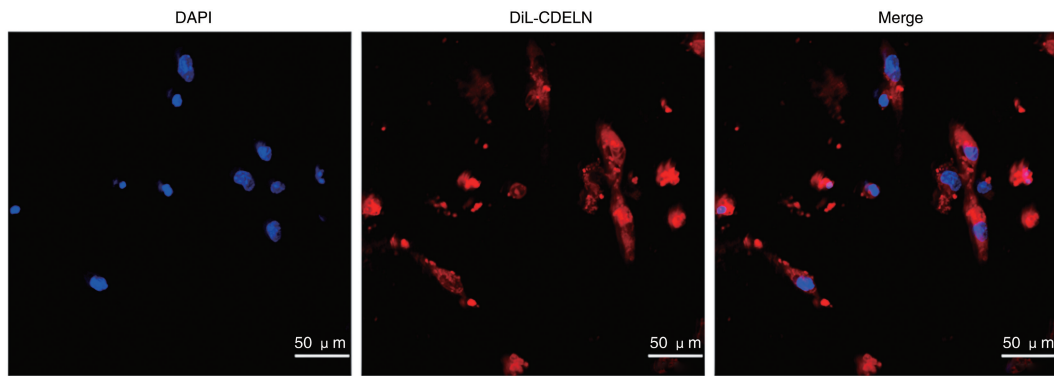
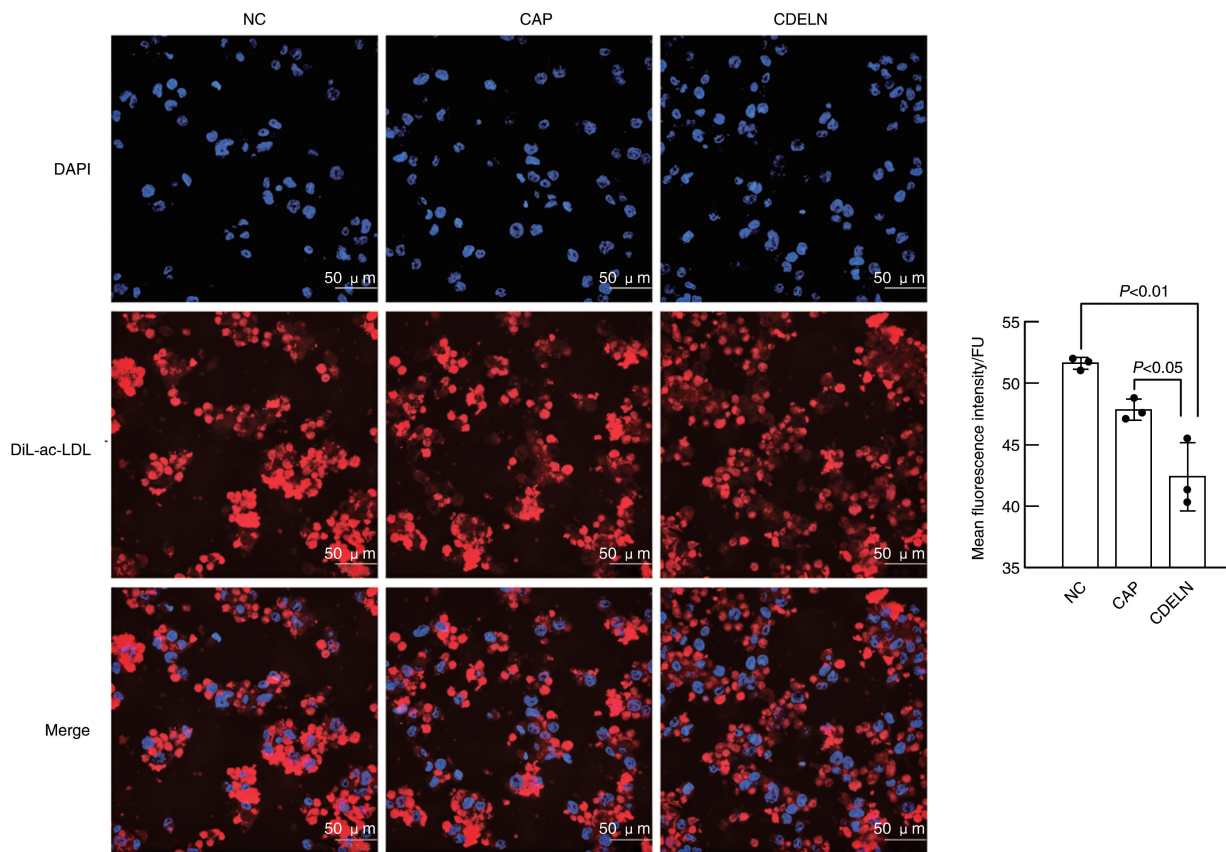


图 3. THP-1 源性巨噬细胞摄取 CDELN

Figure 3. Uptake of CDELN by THP-1-derived macrophages

图 4. THP-1 源性巨噬细胞摄取 DiI-ac-LDL 能力评估 ($n=3$)Figure 4. Assessment of the uptake of DiI-ac-LDL by THP-1-derived macrophages ($n=3$)

2.5 油红 O 染色检测 CDELN 对 THP-1 巨噬细胞来源泡沫细胞内脂质累积的影响

光镜下观察油红 O 染色细胞,与对照组相比,80 mg/L ox-LDL 处理巨噬细胞显著泡沫化,细胞内可见密集红色脂滴,细胞体积略有增加,油红 O 着色脂滴面积增加 901% ($P<0.01$); ox-LDL+CAP 组和 ox-LDL+CDELN 组胞质内脂滴有不同程度减少,其中,ox-LDL+CDELN 组油红 O 着色脂滴面积减少

62% ($P<0.01$)。结果表明,CDELN 有效减少 THP-1 源性巨噬细胞摄取 ox-LDL,减轻胞内脂质蓄积,抑制巨噬细胞向泡沫细胞转化(图 5)。

2.6 CDELN 降低 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞向泡沫细胞转化过程中胆固醇摄取相关受体的表达

为了明确 CDELN 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞向泡沫细胞转化过程中胆固醇摄取及

外排相关受体的影响,采用 Western blot 检测各组细胞中相关蛋白的表达,以及 RT-qPCR 检测各组细胞中相关基因的表达。结果发现,与对照组比较,ox-LDL 组细胞内 SRA、CD36、LOX-1 蛋白表达量增加 149%、182%、193% ($P < 0.01$);与 ox-LDL 组比较,ox-LDL+CDELN 组细胞内 SRA、CD36、LOX-1 表达量分别降低 44%、27%、40% ($P < 0.05$),p-ERK1/2 表达量降低 50% ($P < 0.01$),p-c-Jun 及 p-p38 表达量变化不具有统计学差异。表明 CDELN 干预可显著下调巨噬细胞胆固醇摄取 SRA、CD36、LOX-1 及

MAPK 通路 p-ERK1/2 等的表达(图 6)。RT-qPCR 实验结果显示,与 ox-LDL 组相比,ox-LDL+CDELN 组 SRA 表达量下调 30% ($P < 0.01$),CD36 表达量下调 23% ($P < 0.01$),LOX-1 表达量下调 19% ($P < 0.01$),MMP-9 表达量下调 36% ($P < 0.01$),ABCA1 及 ABCG1 表达量的变化不具有统计学差异(图 6)。上述实验结果表明,CDELN 在抑制巨噬细胞向泡沫细胞转化过程中下调 p-ERK1/2 活性及胆固醇摄取相关受体的表达。

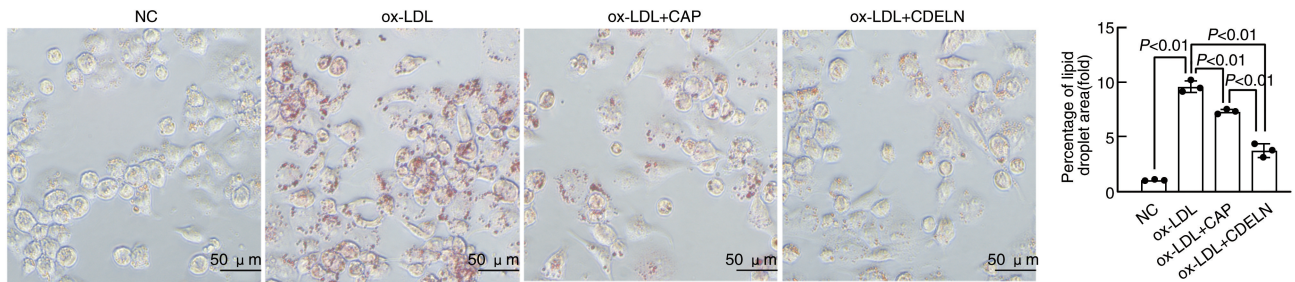


图 5. CAP 和 CDELN 干预作用于 ox-LDL 诱导的 THP-1 细胞泡沫化的油红 O 染色结果 ($n = 3$)

Figure 5. Oil red O staining results of CAP and CDELN intervention on ox-LDL-induced foam of THP-1 cells ($n = 3$)

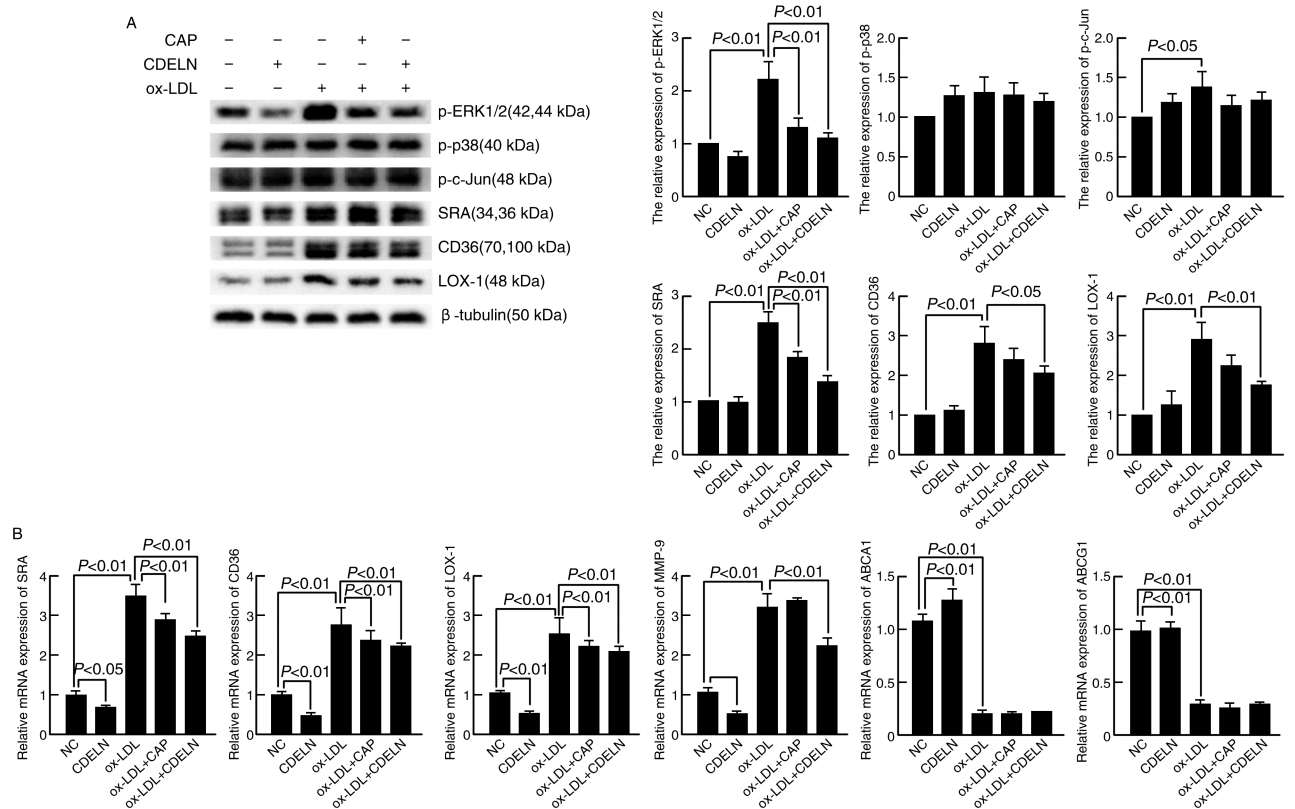


图 6. CDELN 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化进程中胆固醇摄取相关受体表达的影响 ($n = 3$)

A 为 Western blot 检测 MAPK 通路关键分子及胆固醇摄取相关受体的蛋白表达水平;B 为 RT-qPCR 检测胆固醇摄取及外排相关受体的 mRNA 水平。

Figure 6. Effect of CDELN on the expression of cholesterol uptake-related receptors during ox-LDL-induced foam cell formation in THP-1-derived macrophages ($n = 3$)

2.7 Yoda1 促进巨噬细胞向泡沫细胞转化

油红 O 染色和共聚焦显微镜拍摄结果显示,与 ox-LDL+CDELN 组比较,加入 p-ERK1/2 激动剂 Yoda1 (ox-LDL+CDELN+Yoda1 组)巨噬细胞内染色

脂滴数量增多、平均荧光强度增高 ($P < 0.01$, 图 7)。结果表明, Yoda1 通过激活 p-ERK1/2 信号通路,显著提高巨噬细胞对 DiL-ac-LDL 的摄取,促进巨噬细胞泡沫化进程。

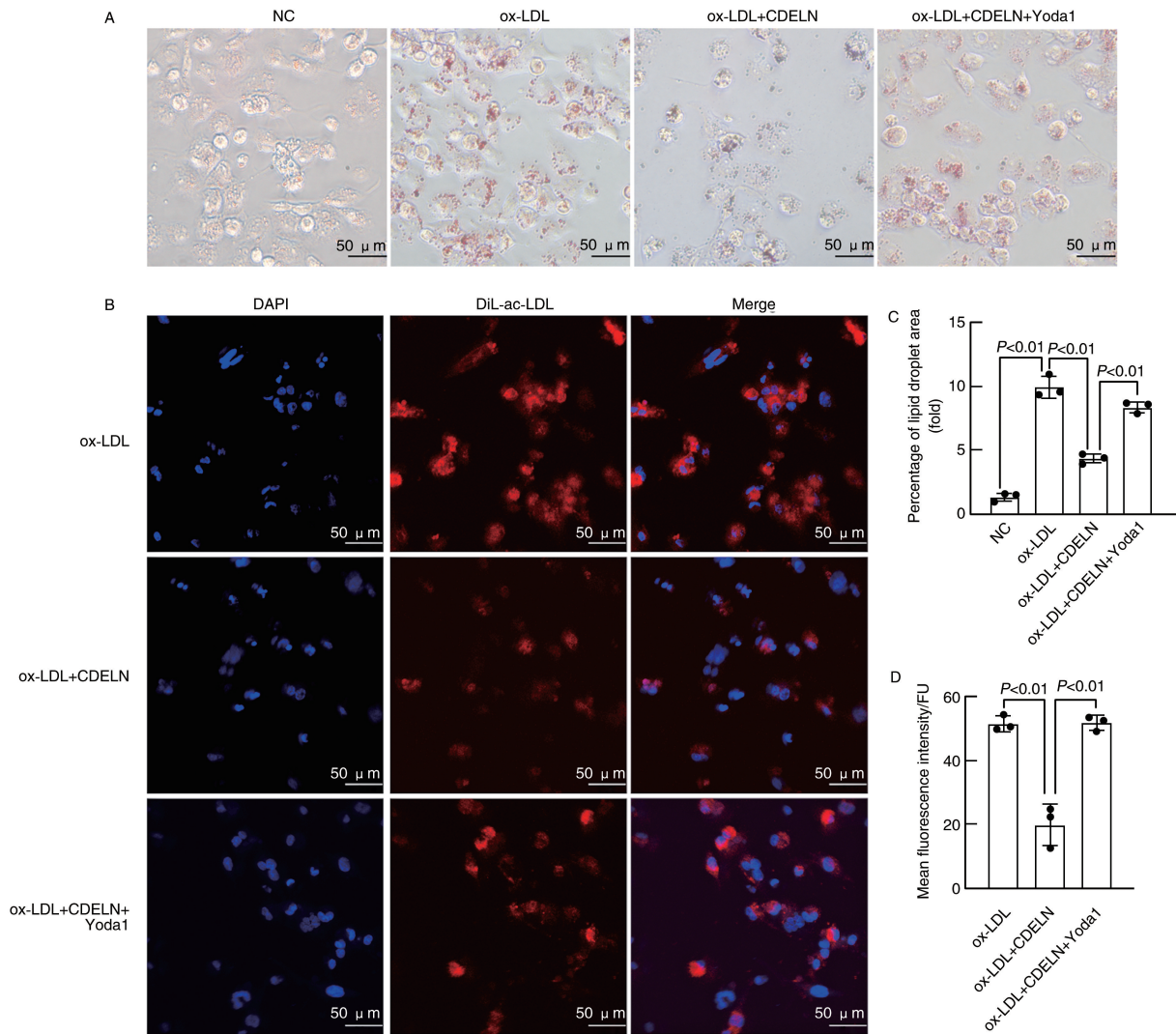


图 7. Yoda1 干预下 THP-1 源性巨噬细胞对 ox-LDL 及 DiL-ac-LDL 摄取的评估

A 与 C 为油红 O 染色检测 Yoda1 干预对巨噬细胞来源泡沫细胞生成的影响 ($n=3$); B 与 D 为共聚焦显微镜拍照检测

Yoda1 拮抗 CDELN 抑制巨噬细胞摄取 DiL-ac-LDL 的作用及统计图 ($n=3$)。

Figure 7. Assessment of THP-1-derived macrophage uptake of ox-LDL and DiL-ac-LDL under Yoda1 intervention

2.8 Yoda1 通过激活 p-ERK1/2 上调 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇摄取相关受体的表达

Yoda1 干预 12 h 显著上调了 p-ERK1/2 的水平。与 ox-LDL+CDELN 组比较, ox-LDL+CDELN+Yoda1 组 SRA 上调 46% ($P < 0.01$), CD36 上调 18% ($P < 0.05$), LOX-1 上调 186% ($P < 0.01$) (图 8A)。RT-qPCR 结果显示,与 ox-LDL+CDELN 组比较, ox-LDL+CDELN+Yoda1 组 MMP-9 mRNA 水平显著上调;与 ox-LDL+CDELN 组比较, Yoda1 干预后巨噬细

胞 SRA、CD36、LOX-1 mRNA 水平显著上调,差异有统计学意义 (图 8B)。该实验结果显示, CDELN 抑制巨噬细胞 p-ERK1/2 表达水平,遏制巨噬细胞向泡沫细胞转化,而加入 Yoda1 后,通过上调 p-ERK1/2 水平,逆转 CDELN 介导的抑制作用。

3 讨论

辣椒作为常见植物的一种,无论是被草药医学

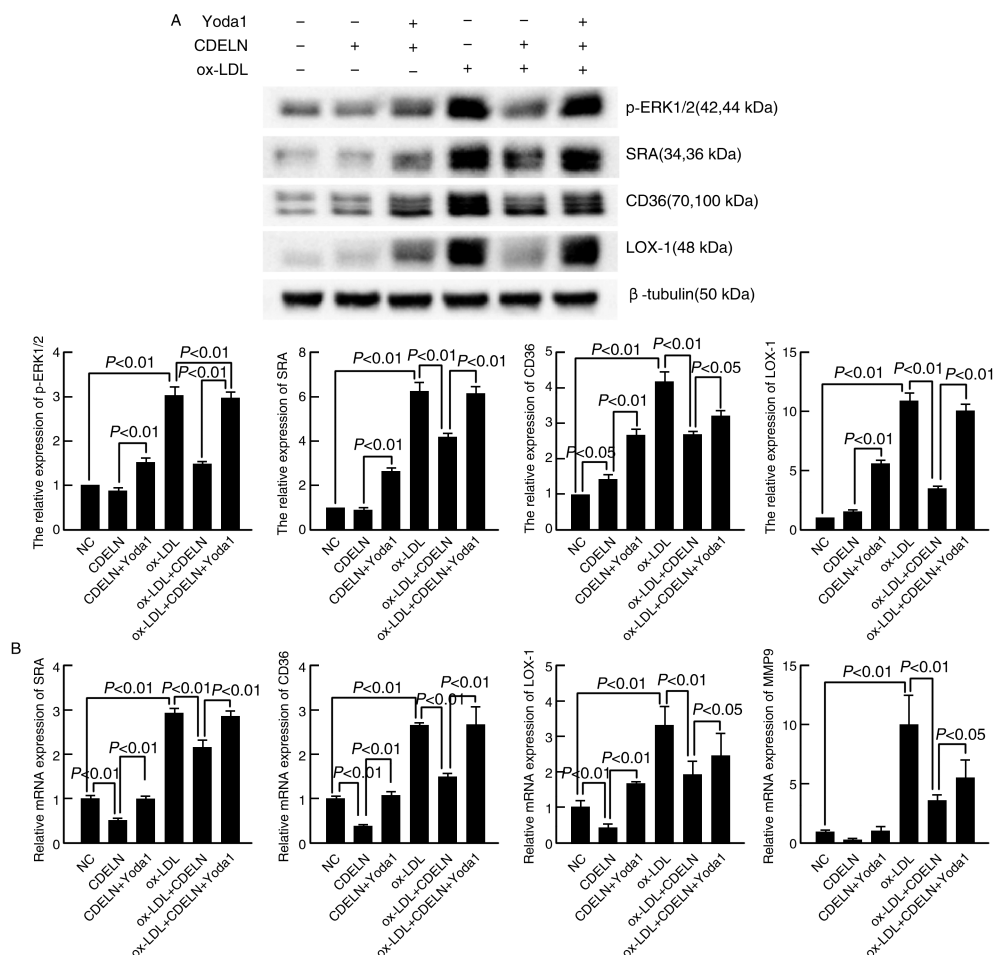


图 8. Yoda1 干预对 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇摄取相关蛋白和基因表达的影响 ($n=3$)

A 为 Western blot 检测胆固醇摄取相关受体的蛋白表达水平及统计图; B 为 RT-qPCR 检测胆固醇相关受体的 mRNA 水平。

Figure 8. Effect of Yoda1 intervention on the expression of cholesterol uptake-related proteins and genes in ox-LDL-induced THP-1-derived macrophages ($n=3$)

作为整体应用于治疗疾病^[19]还是提取其中有效成分辣椒素等化合物入药^[20-22],已有充分的研究表明其对人类健康具有积极保护作用。本研究立足于目前植物提取物应用于治疗疾病方向的热点(植物外泌体样纳米囊泡),通过实验研究探讨来源于辣椒植物组织、携带辣椒生物活性分子的外泌体样纳米囊泡对巨噬细胞泡沫化的干预作用,解释辣椒心血管获益的机制。

As 是一种慢性血管炎症性病变,其特征是内膜增厚、平滑肌细胞增殖、脂质堆积和斑块形成。巨噬细胞是 As 斑块内的主要免疫细胞,在 As 发生发展中起着至关重要的作用。内皮细胞损伤后,初始的免疫反应通过释放单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等炎症因子引发慢性炎症反应,推动单核细胞向内皮细胞下迁移。在内皮细胞下,单核细胞分化为巨噬细胞,这些巨噬细胞吸附和内化修饰的低密度脂蛋白或脂蛋白残基,

最终转化为泡沫细胞^[23]。巨噬细胞源性泡沫细胞大量积聚在内膜组织被认为是 As 早期病变的主要标志之一,同时也在 As 病变进程中发挥核心作用^[5]。抑制巨噬细胞向泡沫细胞转化,被认为是防治 As 的有效手段之一。本研究发现,CDELN 可有效抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化过程,提示 CDELN 具有良好的抗 As 潜能。

泡沫化进程中,巨噬细胞通过 CD36、SRA1、LOX-1 等清道夫受体吞噬 ox-LDL^[24],而 ABCA1、ABCG1 作为介导巨噬细胞胆固醇外排的主要转运体,介导了 50% 以上的胆固醇从巨噬细胞排出^[25]。血管炎症刺激下,黏附到内皮下的巨噬细胞上调清道夫受体表达,增加对 ox-LDL 的摄取;下调膜胆固醇转运体表达,减少对胆固醇的外排,胆固醇摄取与外排过程出现不平衡,巨噬细胞内大量胆固醇酯堆积,最终导致泡沫细胞形成。可见,巨噬细胞对胆固醇摄入与外排的失衡,是导致其发生泡沫化的

关键。本研究通过评估 CDELN 对巨噬细胞胆固醇摄入与外排的影响,探索其抗巨噬细胞泡沫化的机制。结果表明 CDELN 显著抑制巨噬细胞摄取 DiL-ac-LDL 的能力,且降低胆固醇摄入相关受体 SRA、CD36 和 LOX-1 的 mRNA 和蛋白表达水平,然而对胆固醇外排相关蛋白 ABCA1 及 ABCG1 的 mRNA 表达水平无明显影响,提示 CDELN 主要通过减少修饰化脂蛋白内化以抑制巨噬细胞向泡沫细胞发展。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 属于一组进化保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,通过传递各种刺激的信号分子,在细胞增殖、分化、发育、转化、炎症反应和凋亡中发挥重要作用。目前已明确 MAPK 通路三个主要亚族 (ERK、JNK 和 p38 MAPK) 每个家族都有特定的细胞外信号启动^[26]。多项研究发现,MAPK 通路在巨噬细胞泡沫化进程中发挥重要作用^[27-28]。Liu 等^[29]发现,MAPK 通路激活,加剧了巨噬细胞泡沫化。Lu 等^[30]发现,抑制 MAPK 信号转导可以抑制巨噬细胞炎症和泡沫细胞形成。本研究发现,在 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化模型中 MAPK 通路被显著激活,与既往文献报道相符。CDELN 干预巨噬细胞后,p-ERK1/2 表达量下降,ERK1/2 通路活性受抑制,且胆固醇摄入受体表达减少,巨噬细胞内胆固醇蓄积减轻;以上作用被 ERK1/2 激动剂 Yoda1^[14] 显著抑制。可见,CDELN 可通过介导 MAPK/ERK 通路抑制胆固醇摄入以阻止巨噬细胞向泡沫细胞转化。

本研究从辣椒提取物 CDELN 抑制巨噬细胞向泡沫细胞转化角度丰富了辣椒心血管获益的机制,为动脉粥样硬化性心血管疾病的药物开发提供了新的思路。然而,本研究仍存在一定的局限性。首先,CDELN 内含蛋白质、RNA、化合物(如辣椒素)等多种活性成分,受限于研究篇幅,未在本研究中针对其内含物的生物学作用展开研究。再者,本研究仅在体外模型中评估 CDELN 的抗 As 作用,其体内效应仍有待进一步评估。在后续研究中,作者团队将深入研究 CDELN 内含成分的作用,并建立体内 As 模型,进一步完善 CDELN 抗 As 的作用评估及机制探索。

[参考文献]

- [1] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [2] LIBBY P, RIDKER P M, HANSSON G K, et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice

- [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(23): 2129-2138.
- [3] KOELWYN G J, CORR E M, ERBAY E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(6): 526-537.
- [4] WANG D, YANG Y, LEI Y, et al. Targeting foam cell formation in atherosclerosis: therapeutic potential of natural products[J]. *Pharmacol Rev*, 2019, 71(4): 596-670.
- [5] MCLAREN J E, MICHAEL D R, ASHLIN T G, et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy [J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50(4): 331-347.
- [6] MAGUIRE E M, PEARCE S W A, XIAO Q. Foam cell formation: a new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 112: 54-71.
- [7] SPENCE J D. Chili pepper consumption and cardiovascular mortality[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(25): 3150-3152.
- [8] BONACCIO M, DI CASTELNUOVO A, COSTANZO S, et al. Chili pepper consumption and mortality in Italian adults [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(25): 3139-3149.
- [9] MOSELEY A, LAIPPLY K, RUBINSTEIN J. Capsaicin mediates remote ischemic pre-conditioning to explain improved cardiovascular mortality with chili pepper intake[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(15): 1865.
- [10] WANG H, CHEN L, SHEN D, et al. Association between frequency of spicy food consumption and hypertension: a cross-sectional study in Zhejiang province, China [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2021, 18(1): 70.
- [11] MUNJULURI S, WILKERSON D A, SOOCH G, et al. Capsaicin and TRPV1 channels in the cardiovascular system: the role of inflammation[J]. *Cells*, 2021, 11(1): 18.
- [12] KANG C, WANG B, KALIANNAN K, et al. Gut microbiota mediates the protective effects of dietary capsaicin against chronic low-grade inflammation and associated obesity induced by high-fat diet[J]. *mBio*, 2017, 8(3): e00470-17.
- [13] LUO D, LI W, XIE C, et al. Capsaicin attenuates arterial calcification through promoting SIRT6-mediated deacetylation and degradation of HIF1 α (hypoxic-inducible factor-1 alpha)[J]. *Hypertension*, 2022, 79(5): 906-917.
- [14] DELA PAZ N G, FRANGOS J A. Yoda1-induced phosphorylation of Akt and ERK1/2 does not require Piezo1 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 220-225.
- [15] 潘显梅,夏明峰,李静. 丹酚酸 B 介导巨噬细胞 Piezo1/MAPK/YAP 轴对动脉粥样硬化的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(1): 17-23.
- PAN X M, XIA M F, LI J. Protective effect of salvianolic acid B mediating the macrophages Piezo1/MAPK/YAP

- axis in regulating atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(1): 17-23.
- [16] WANG T, LU H. Ganoderic acid A inhibits ox-LDL-induced THP-1-derived macrophage inflammation and lipid deposition via Notch1/PPAR γ /CD36 signaling[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30(10): 1031-1041.
- [17] 潘杨, 张蕾, 李梦杰, 等. 黄芪多糖和水蛭素联合干预对巨噬细胞脂质积聚的影响及其机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(12): 1029-1036.
- PAN Y, ZHANG L, LI M J, et al. Effects of Astragalus polysaccharide and hirudin combined intervention on lipid accumulation in macrophages and its mechanism[J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(12): 1029-1036.
- [18] YOU J Y, KANG S J, RHEE W J. Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(12): 4321-4332.
- [19] AZLAN A, SULTANA S, HUEI C S, et al. Antioxidant, anti-obesity, nutritional and other beneficial effects of different chili pepper: a review[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 898.
- [20] ZHENG J, ZHOU Y, LI Y, et al. Spices for prevention and treatment of cancers[J]. *Nutrients*, 2016, 8(8): 495.
- [21] VILLA-RIVERA M G, OCHOA-ALEJO N. Chili pepper carotenoids: nutraceutical properties and mechanisms of action[J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5573.
- [22] ZHENG J, ZHENG S, FENG Q, et al. Dietary capsaicin and its anti-obesity potency: from mechanism to clinical implications[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(3): BSR20170286.
- [23] TABAS I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(1): 36-46.
- [24] BLANCHET C, JOUVION G, FITTING C, et al. Protective or deleterious role of scavenger receptors SR-A and CD36 on host resistance to *Staphylococcus aureus* depends on the site of infection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87927.
- [25] CHEN W, LI L, WANG J, et al. The ABCA1-efferoctosis axis: a new strategy to protect against atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 518: 1-8.
- [26] FANG J Y, RICHARDSON B C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2005, 6(5): 322-327.
- [27] SHEN D, ZHAO D, YANG X, et al. Geniposide against atherosclerosis by inhibiting the formation of foam cell and lowering reverse lipid transport via p38/MAPK signaling pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 864: 172728.
- [28] FEI X, PAN L, YUAN W, et al. Papain exerts an anti-atherosclerosis effect with suppressed MPA-mediated foam cell formation by regulating the MAPK and PI3K/Akt-NF- κ B pathways[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2023, 27(3): 239-250.
- [29] LIU Q, FAN J, BAI J, et al. IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17347.
- [30] LU S, LUO Y, SUN G, et al. Ginsenoside compound K attenuates ox-LDL-mediated macrophage inflammation and foam cell formation via autophagy induction and modulating NF- κ B, p38, and JNK MAPK signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 567238.
- (此文编辑 许雪梅)