

本文引用: 曹子彤, 陈彦君, 谈世铭, 等. 氧化型脂蛋白(a)通过抑制细胞色素 b 表达促进血管内皮细胞焦亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(7): 558-566. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.07.002.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2024)32-07-0558-09

氧化型脂蛋白(a)通过抑制细胞色素 b 表达促进血管内皮细胞焦亡

曹子彤¹, 陈彦君¹, 谈世铭¹, 饶羽祝¹, 王晶晶¹, 蔡泽民², 王佐¹

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地,
2. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] [目的] 探讨氧化型脂蛋白(a)[oxLp(a)]诱发血管内皮细胞焦亡及其机制。[方法] 人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)经 100 mg/L oxLp(a)孵育 24 h 后,通过 Western blot 和 RT-qPCR 检测焦亡相关蛋白、促炎细胞因子、线粒体相关蛋白核呼吸因子 1(NRF1)、核呼吸因子 2(NRF2)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)及线粒体基因细胞色素 b(CYTB)蛋白表达水平,ELISA 检测炎症因子水平,扫描电镜检测细胞膜破裂,透射电镜检测线粒体形态,Hoechst33342/PI 染色检测细胞凋亡,MitoSOX 探针检测线粒体活性氧(mtROS),Flou-4AM 探针检测钙离子,JC-1 探针检测线粒体膜电位(MMP),Calcein AM 染色检测线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放。向 HUVEC 转染 CYTB 过表达慢病毒,分析其对 oxLp(a)诱发焦亡与线粒体功能的影响。[结果] 经 oxLp(a)处理后,焦亡相关分子 NLRP3、pro-Caspase-1、Caspase-1、消皮素 D(GSDMD)、GSDMD-N 蛋白水平显著升高($P<0.05$);CYTB、促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 蛋白和 mRNA 水平均显著升高($P<0.05$);细胞膜上出现细小裂孔,PI 染色阳性细胞百分比显著增加($P<0.05$)。oxLp(a)抑制线粒体相关蛋白 NRF1、NRF2、PGC-1 α 的表达及线粒体基因 CYTB 的表达,促使 mtROS 生成增加、钙离子超载、ATP 水平下降、MMP 下降、mPTP 值升高、线粒体形态异常。pHelper 2.0 慢病毒载体转染过表达 CYTB 后,oxLp(a)诱发 HUVEC 焦亡与线粒体形态功能异常被过表达 CYTB 部分逆转。[结论] oxLp(a)通过下调 CYTB 促进线粒体形态功能异常而诱发 HUVEC 焦亡。

[关键词] 细胞焦亡; 氧化型脂蛋白(a); 线粒体功能; 血管内皮细胞; 细胞色素 b

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Oxidized lipoprotein(a) induces endothelial cell pyroptosis by inhibiting the expression of cytochrome b

CAO Zitong¹, CHEN Yanjun¹, TAN Shiming¹, RAO Yuzhu¹, WANG Jingjing¹, CAI Zeming², WANG Zuo¹

1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory of Arterial Hard Chemistry of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base, 2. The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanism of oxidized lipoprotein(a) (oxLp(a)) inducing pyroptosis of vascular endothelial cells. **Methods** After incubating human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with 100 mg/L oxLp(a) for 24 hours, Western blot and RT-qPCR was used to detect pyroptosis related proteins, pro-inflammatory cytokines, mitochondrial related proteins NRF1, NRF2, PGC-1 α and mitochondrial gene cytochrome b (CYTB), ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors, scanning electron microscopy was used to detect cell membrane rupture, transmission electron microscopy was used to detect mitochondrial morphology, Hoechst33342/PI staining was used to detect cell apoptosis, MitoSOX probe was used to detect mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), Flu-4AM probe was used to detect calcium ions, JC-1 probe was used to detect mitochondrial membrane potential (MMP), and Calcein AM staining was used to detect mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Transfecting HUVEC with CYTB

[收稿日期] 2024-02-01

[修回日期] 2024-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81970389);湖南省科技创新计划项目(2021SK51801)

[作者简介] 曹子彤,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化,E-mail:779631829@qq.com。通信作者王佐,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化发病学与防治研究,E-mail:smt121101@163.com。

overexpressing lentivirus and analyzing its effects on oxLp(a) induced pyroptosis and mitochondrial function. **Results**

After treatment with oxLp(a), the expression of NLRP3, pro-Caspase-1, Caspase-1, GSDMD and GSDMD-N proteins related to pyroptosis were significantly increased ($P < 0.05$); the protein and mRNA levels of CYTB and pro-inflammatory cytokine IL-1 β , IL-18 were significantly increased ($P < 0.05$). Small pores appeared on the cell membrane, the percentage of PI stained positive cells significantly increased ($P < 0.05$). OxLp(a) significantly inhibited the expression of mitochondrial related proteins NRF1, NRF2 and PGC-1 α , and the expression of mitochondrial gene CYTB, promoted an increase in mtROS generation, Ca²⁺ overload, a decrease in ATP levels, a decrease in MMP, an increase in mPTP values, and abnormal mitochondrial morphology. After transfection with pHelper 2.0 lentivirus vector overexpressing CYTB, it was found that oxLp(a) induced HUVEC pyroptosis and mitochondrial morphological and functional abnormalities were partially reversed by overexpression of CYTB. **Conclusion** oxLp(a) promotes mitochondrial morphological and functional abnormalities and induces HUVEC pyroptosis by downregulating CYTB.

[**KEY WORDS**] cell pyroptosis; oxidized lipoprotein (a); mitochondrial function; vascular endothelial cell; cytochrome b

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种主要累及大、中动脉的炎症性慢性复杂病变,会导致多种心血管疾病的发生,如冠心病、脑梗死和外周血管疾病^[1-2]。血管内皮细胞损伤和功能障碍被认为是 As 始动环节和病理学基础。血管内皮细胞位于血管内表面,其不但是血管组织的物理性屏障,还对局部血管舒张、氧化还原平衡和血管稳态、动脉壁内炎症反应的调节起作用^[3]。血管内皮细胞损伤常伴有不同类型的细胞死亡方式,如自噬、焦亡、凋亡和坏死^[4]。

焦亡是一种程序性细胞死亡形式,伴随着炎症反应的发生。其特征是质膜破裂和促炎介质释放,非选择性消皮素 D(gasdermin-D, GSDMD)孔驱动的细胞不断肿胀直至膜破裂^[5-6],以及随后释放出炎症因子白细胞介素(interleukin, IL) 1 β 和 18,焦亡在血管内皮细胞功能障碍和 As 病变中发挥重要作用^[7-10]。越来越多的证据表明,血管内皮细胞焦亡后血管壁通透性增加,导致局部炎症反应加剧、血管壁脂质沉积、As 斑块形成和斑块不稳定^[4]。

脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]水平被认为是 As 的独立危险因素^[11-12]。大量研究表明, Lp(a)参与 As 的起始、进展和斑块破裂各个阶段,特别是对血管内皮细胞产生损伤作用。氧化型脂蛋白(a)[oxidized lipoprotein(a), oxLp(a)]是 Lp(a)致血管病变的活性形式,对血管内皮细胞有很强的损伤作用^[13],且在 As 斑块中大量存在^[14],并与 As 发生发展密切相关^[15]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起细胞焦亡发生^[8]。而 oxLp(a)可诱导大量 ROS 的生成引起血管内皮细胞损伤^[16]。故 oxLp(a)是引起血管内皮细胞焦亡的分子基础。ROS 的产生主要来源于线粒体^[17],过量的 ROS 产生可造成线粒体功能紊乱(mitochondrial dysfunction,

MDF)。当线粒体电子传递链上的复合物相关基因表达异常时,线粒体活性氧(mitochondria reactive oxygen species, mtROS)产生增多,从而激活 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体,导致血管内皮细胞焦亡发生^[18-19]。线粒体 DNA(mitochondria DNA, mtDNA)编码细胞色素 b(cytochrome b, CYTB), CYTB 是线粒体呼吸链复合物 III 的核心,线粒体 CYTB 基因突变可引起线粒体氧自由基的大量生成^[20-22], oxLp(a)是否通过调控 CYTB 的表达促进血管内皮细胞焦亡,目前尚不清楚。基于此,本研究拟在血管内皮细胞上研究 oxLp(a)对焦亡、线粒体形态与功能以及对 CYTB 基因表达的影响,并分析过表达 CYTB 对 oxLp(a)诱发焦亡及线粒体形态与功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自中国科学院细胞库;一抗(Abcam 公司);山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗鼠 IgG 二抗(Abiowell 公司);Hoechst33342、PI(Solarbio 公司);Lp(a)(Fitzgerald 公司);MitoSOX 红色线粒体超氧阴离子探针、反转录试剂盒(Thermo Fisher 公司);钙离子荧光探针 Fluo-4 AM(凯基生物);CYTB 过表达慢病毒(吉凯基因);ATP 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);线粒体膜电位检测(凯基生物);人 IL-18/IL-1 β ELISA kit、人 IL-1 β ELISA kit、Calcein AM(碧云天)。

1.2 细胞培养

HUVEC 复苏后,在 25 mL 培养瓶中用含 10% FBS 的 DME 培养基中培养,并在 5% CO₂ 和 95% 空

气中于 37 °C 孵育, 每 3 天换液 1 次, 待培养瓶中细胞密度达到 80% 时, 用于后续实验。

1.3 Lp(a) 的氧化修饰

把 Lp(a) 装入透析袋中, 两端用夹子夹紧, 然后放入配置好的 20 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 溶液中启动氧化反应, 37 °C 连续放置 36 h, 观察到 Lp(a) 由淡黄色变成乳白色则表示氧化成功。接着, 把透析袋放入配置好的 200 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 溶液中终止氧化反应, 4 °C 放置 24 h, 且每隔 8 h 换一次新鲜的 EDTA 溶液直至去除 Cu^{2+} 。最后, 用 PBS 溶液于 4 °C 透析 24 h 以除去 EDTA。收集氧化后的 oxLp(a), 放在 EP 管中, 用封口胶封好后标记制备时间, 并放入 4 °C 冰箱备用。

1.4 Western blot 检测

根据目的蛋白相对分子质量大小配制好分离胶和浓缩胶, 插入梳子后待凝固即可放入有电泳液的电泳槽中。拔出梳子, 用微量上样针每孔上样 10 μL 待测蛋白。上样完成后开始电泳, 电压 60 ~ 80 V, 当跑过浓缩胶后, 将电压加大到 100 ~ 120 V, 此为恒压。当跑胶完成后, 按照 Marker 指示和目的条带的位置切胶。将切好的胶放置在滤纸上, 并覆盖 PVDF 膜, 放入转膜槽内并用 220 mA 的恒流转膜 60 ~ 120 min。整个转膜过程在 4 °C 的条件下进行。转膜完成后取出 PVDF 膜放入配制好的 5% 脱脂牛奶封闭液中封闭 1 h。按照抗体说明书稀释目的蛋白的一抗溶液, 并将其置于 4 °C 冰箱孵育 10 h, 用 TBST 洗涤 3 次后, 孵育二抗溶液摇床 2 h, TBST 洗涤 3 次后配制显影液, 并在凝胶成像系统中显影, Image J 软件扫描其灰度值, 并记录数据。

1.5 CYTB 过表达慢病毒转染

在转染开始前, 将细胞按传代步骤制成细胞悬液, 并在细胞瓶中接种, 当贴壁细胞密度大约为 30% 时开始转染。将细胞换液, 然后加入 2.5 mL 不含血清的培养基。提前计算好病毒的 MOI 值, 将装载 CYTB 基因 (1 638 bp) 过表达 pHelper 2.0 慢病毒载体转染细胞, PCR 鉴定所用引物序列为 5'-TCAT-GCCCACCATCAGCCTG-3' (KL61239-p3) 和 5'-CCT-TATAGTCCTTATCATCGTC-3' (KL61239-p4)。6 孔板中加入适量病毒悬液和病毒增强液 100 μL , 摇匀, 置于培养箱中 37 °C 继续培养, 病毒转染完成后, 大紫外灯照射 30 min。培养 24 h 后, 用新鲜的培养基替换有病毒的培养基继续培养, 并于 72 h 后观察转染效率。实验分为 4 组: 对照组 (Control)、CYTB 过表达对照组 (OENC)、oxLp(a) 组、oxLp(a) + OECYTB 组, 分析 CYTB 过表达对 oxLp(a) 诱发 HU-

VEC 焦亡及线粒体功能的影响。

1.6 Hoechst33342/PI 细胞凋亡检测

Hoechst33342 是一种蓝色荧光染料, PI 可以使凋亡细胞发出红色荧光。将种满细胞的 24 孔板用 PBS 清洗 2 ~ 3 次后甩干, 每孔加入提前配置好的 Hoechst33342 染液 500 μL , 在摇床上避光孵育 10 min; 吸去染色液后, 用 PBS 清洗 2 ~ 3 次后甩干, 每孔加入配置好的 PI 染液 500 μL , 在摇床上闭光孵育 10 min; 用 PBS 洗涤 3 次后, 加入适量 PBS 湿润细胞并立即使用荧光显微镜观察细胞染色情况。

1.7 细胞钙离子检测

Fluo-4 AM 用 DMSO 溶解, 1 μL Fluo-4 AM 储存液用 PBS 稀释至 2.5 mL/L, 加入避光 EP 管中备用。操作过程中避免人为损伤细胞, 将种满细胞的 24 孔板用 PBS 清洗 2 ~ 3 次后甩干。每孔加入稀释液 500 μL , 随后在水浴锅中避光孵育 30 min。用 PBS 清洗 2 ~ 3 次后, 弃 PBS 后再加入适量 PBS 湿润细胞, 立即在荧光显微镜下拍照保存。

1.8 线粒体通透性转换孔检测

将细胞吸除培养液, 用 PBS 清洗细胞 2 遍, 加入 Calcein AM 染色液覆盖细胞面, 轻轻晃动使染料均匀覆盖所有细胞, 在 37 °C 水浴箱中避光孵育 45 min。孵育结束后, 更换成新鲜的 37 °C 预热的培养液, 再次在水浴箱中避光孵育 30 min, 以保证细胞内酯酶充分水解 Calcein AM。最后, 吸除培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 然后加入检测缓冲液, 在荧光显微镜下观察。

1.9 线粒体膜电位检测

首先, 将 10 \times incubation 缓冲液稀释为 1 \times , 在 37 °C 水浴箱中预热备用。将处理好的细胞弃去培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 加入胰酶后消化吹打, 移至离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去离心上清, 收集细胞团块。在 500 μL 的 1 \times incubation 缓冲液中加入 1 μL 的 JC-1 原液, 震荡至完全混匀后, 制成 JC-1 工作液。在收集的细胞中加入 500 μL JC-1 工作液, 吹打为细胞悬液, 置于细胞培养箱中孵育 15 min。孵育完成后, 室温 1 000 r/min 离心 10 min。弃去洗涤液, 再次用 1 \times incubation 缓冲液清洗细胞 2 次。最后用 1 \times incubation 缓冲液吹打为细胞悬液, 用流式细胞仪检测。

1.10 ATP 含量检测

弃去细胞培养上清, 用 PBS 清洗 3 次。用细胞刮棒收集细胞沉淀, 加入 500 μL 煮沸双蒸水, 然后转移至匀浆器中, 在热水中研磨至细胞破碎。将研

磨后的液体转移至离心管中,继续煮沸 8 min,取出后混匀。按照说明书依次加入试剂,混匀后室温孵育 5 min,酶标仪检测 636 nm 处数值。

1.11 RT-qPCR 检测

用 Trizol 溶液提取 HUVEC 总 RNA,并静置 5 min 充分溶解以获得 RNA。使用 Nanodrop 2000 检测 RNA 浓度及纯度。以细胞总 mRNA 为模板,反转录成 cDNA。于荧光定量 PCR 仪上完成,扩增具体步骤为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,65 °C ~ 95 °C 延伸 10 min,40 个循环。引物序列:IL-1 β 引物正向为 5'-TGAGGTCAATGAAGGGTCCT-3'、反向为 5'-CGTCACACACCAGCAGGTTATC-3'; IL-18 引物正向为 5'-TCTTCATTGACCAAG GAAATCGG-3'、反向为 5'-TCCGGGGTG CATTATCTCTAC-3'; CYTB 引物正向为 5'-TATG GCTGAATCATCCGCTAC-3'、反向为 5'-GGATAATGCCGATGTTTC-3'; GAPDH 引物正向为 5'-TGAAGTAAGAGGACTGGCTGTGA-3'、反向为 5'-TTGGCAA GCAAGAAAGTGTCC-3'。

1.12 ELISA 检测

收集细胞培养上清,分别设标准孔和待测样本孔,按照试剂盒说明将标准品稀释至要求浓度。各组取 100 μ L 的稀释样品和标准品加入 96 孔中,置于 37 °C 温育 90 min。弃去溶液并甩干,不用洗涤。实验孔加入生物素化抗体试剂,空白孔加入生物素化抗体稀释液覆上新的板贴,置于室温摇床上 1 h。在微量板上吸附组蛋白体。清洗 4 次孔板,每次 2 min,然后加酶结合物工作液 100 μ L,空白孔加酶结合稀释液,覆上新的板贴,摇床上轻轻振荡 45 min。再次清洗 4 次孔板后,加入底物溶液 100 μ L,置于摇床 30 ~ 45 min。最后每孔加入终止液 50 μ L,并立即在 450 nm 处测量各孔的吸光度值。

1.13 mtROS 检测

从细胞房取出处于对数生长下的细胞,用 PBS 洗涤 2 ~ 3 次后,用二甲基亚砷溶解 MitoSOX,按照所需浓度配制好 MitoSOX。每孔加入稀释好的染色液 500 μ L,在 37 °C 水浴锅避光孵育 30 ~ 45 min,此后的操作也尽量在黑暗环境中进行。反应完成后用 PBS 清洗 2 次,再加入适量 PBS 以湿润细胞,立即在荧光显微镜下观察并拍照保存。

1.14 扫描电镜和透射电镜观察

按照细胞传代步骤将细胞经胰蛋白酶消化后,离心,收集细胞沉淀,随后加电镜固定液固定细胞

2 h,并在 4 °C 保存。固定好后的样本尽快使用扫描电子显微镜和透射电子显微镜观察并拍照保存。

1.15 统计学分析

使用 Graph Pad Prism 8.0、SPSS 25.0 软件进行统计学分析,采用 student-*T* 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 oxLp(a) 促进 HUVEC 焦亡

HUVEC 经 100 mg/L oxLp(a) 孵育 24 h 后,焦亡相关分子 NLRP3、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$),其中 NLRP3 升高 2.5 倍,pro-Caspase-1 升高 1.94 倍,Caspase-1 升高 2.97 倍,GSDMD 升高 2.35 倍,GSDMD-N 升高 1.82 倍,且 Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白水平显著高于 Lp(a) 组 ($P < 0.05$);炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平及 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$),其中 IL-1 β mRNA 表达水平升高 8.55 倍,IL-18 mRNA 表达水平升高 2.84 倍,且显著高于 Lp(a) 组 ($P < 0.05$)。扫描电镜显示 HUVEC 膜上出现破裂膜孔,PI 阳性细胞率升高 9.78 倍 ($P < 0.0001$),且显著高于 Lp(a) 组 ($P < 0.05$;图 1)。以上结果表明,oxLp(a) 可促进 HUVEC 焦亡,且作用强于 Lp(a)。

2.2 oxLp(a) 致 HUVEC 线粒体功能障碍

经 oxLp(a) 处理后,线粒体功能标志物过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ,PGC-1 α)、核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1,NRF1)、核呼吸因子 2 (nuclear respiratory factor 2,NRF2) 蛋白水平均显著下降 ($P < 0.05$),其中 NRF1 下降 57.5%,NRF2 下降 69.4%,PGC-1 α 下降 87.3%,且作用显著强于 Lp(a) ($P < 0.05$);mtROS、钙离子水平显著增加 ($P < 0.05$),其中 mtROS 升高 2.11 倍,钙离子水平升高 3.56 倍,且作用显著强于 Lp(a) ($P < 0.05$);透射电镜下显示线粒体形态异常,可见线粒体肿胀、基质颗粒消失、嵴缩短、减少甚至消失、嵴间腔扩张,极度肿胀时线粒体可变为大泡状结构,提示线粒体形态结构异常(图 2);MMP 及 ATP 水平显著下降,mPTP 值显著升高 ($P < 0.05$),其中 MMP 下降 85.3%,ATP 水平下降 68.7%,且作用显著强于 Lp(a) ($P < 0.05$;图 2)。以上结果表明,oxLp(a) 可损伤线粒体及线粒体功能,且 oxLp(a) 的作用显著强于 Lp(a)。

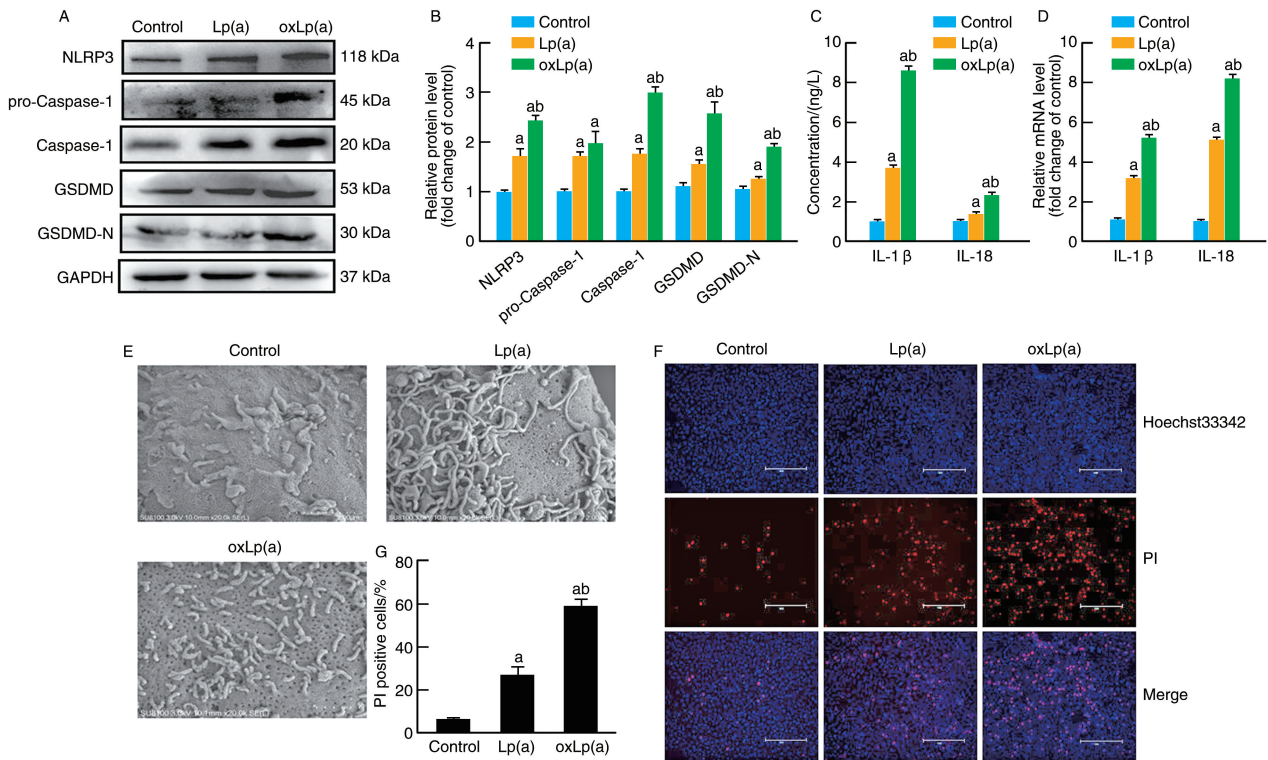


图 1. oxLp(a) 对 HUVEC 焦亡的影响 (n=3)

A、B 为 Western blot 检测焦亡相关分子 NLRP3、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达及灰度值统计分析, C 为 ELISA 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平, D 为 RT-qPCR 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达, E 为扫描电镜检测细胞膜破裂 (比例尺 = 1 μ m), F 为 Hoechst33342 和 PI 双重染色检测细胞凋亡和死亡情况 (比例尺 = 300 μ m), G 为 PI 阳性细胞统计分析。
a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Lp(a) 组比较。

Figure 1. The effect of oxLp(a) on the pyroptosis of HUVEC (n=3)

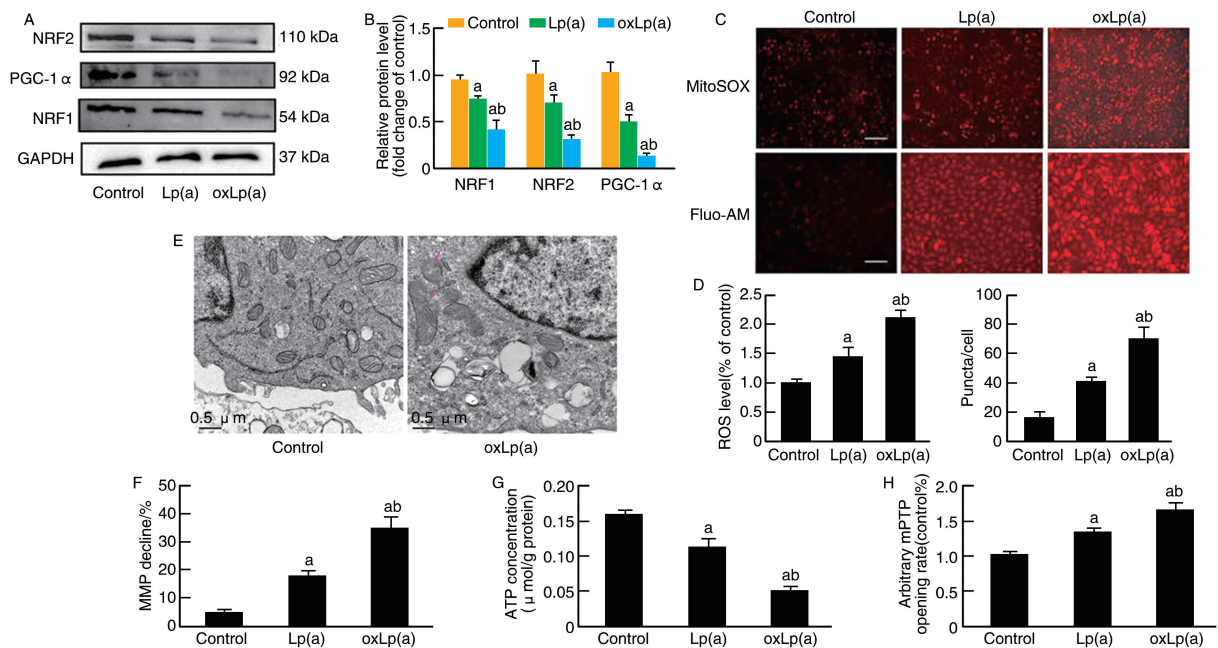


图 2. oxLp(a) 对 HUVEC 线粒体功能的影响 (n=3)

A、B 为 Western blot 检测线粒体功能蛋白 NRF1、NRF2、PGC-1 α 蛋白表达及灰度值统计分析, C、D 为 MitoSOX 法检测细胞内 mtROS 水平、Fluo-4AM 免疫荧光检测法测定线粒体钙离子水平 (比例尺 = 300 μ m) 及其统计分析, E 为透射电镜分析线粒体形态 (比例尺 = 0.5 μ m, 粉红色箭头示线粒体形态异常), F 为 JC-1 探针检测 MMP, G 为酶标仪检测 ATP, H 为 Calcein AM 染色检测 mPTP。
a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Lp(a) 组比较。

Figure 2. The effect of oxLp(a) on the mitochondrial function of HUVEC (n=3)

2.3 oxLp(a) 抑制 CYTB 蛋白的表达

用 100 mg/L oxLp(a) 处理 HUVEC, 观察其对线粒体基因 CYTB 表达的影响。结果发现, CYTB 的蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 其中 CYTB 蛋白水平下降 78.1%, 且 oxLp(a) 对 CYTB 蛋白表达的抑制作用显著强于 Lp(a) ($P < 0.05$; 图 3)。因此推测, oxLp(a) 致 HUVEC 线粒体功能障碍可能与其抑制 CYTB 蛋白表达有关。

2.4 CYTB 过表达抑制 oxLp(a) 诱导的 HUVEC 焦亡

oxLp(a) 下调 CYTB 蛋白表达, 但其是否介导 oxLp(a) 的作用尚不清楚, 为了进一步探究 CYTB 在 oxLp(a) 诱导的 HUVEC 焦亡及 mtROS 生成中是否发挥作用, 向 HUVEC 转染 CYTB 过表达慢病毒。Western blot 分析结果表明, 过表达 CYTB 效率较高 ($P < 0.05$), oxLp(a) 上调细胞焦亡相关分子 NLRP3、GSDMD、GSDMD-N、pro-Caspase-1、Caspase-1 蛋白水平, 但可显著被 CYTB 过表达逆转 ($P < 0.05$), 其中 NLRP3 下降 44.0%, GSDMD 下降 40.0%, GSDMD-N 下降 34.7%, pro-Caspase-1 下降

54.1%, Caspase-1 下降 47.5%; 炎症因子 IL-1 β 、IL-18 的释放及其表达水平、PI 阳性细胞百分比表现趋势相同 ($P < 0.05$), 其中 IL-1 β 蛋白水平下降 31.4%, IL-18 蛋白水平下降 54.5%, PI 阳性细胞百分比下降 45.7% (图 4)。

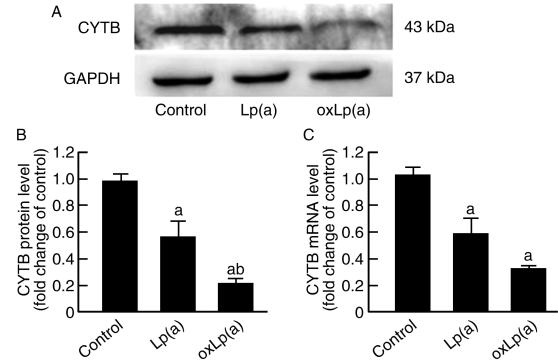


图 3. oxLp(a) 对 HUVEC CYTB 蛋白及 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Lp(a) 组比较。

Figure 3. Effects of oxLp(a) on CYTB protein and mRNA expression in HUVEC ($n = 3$)

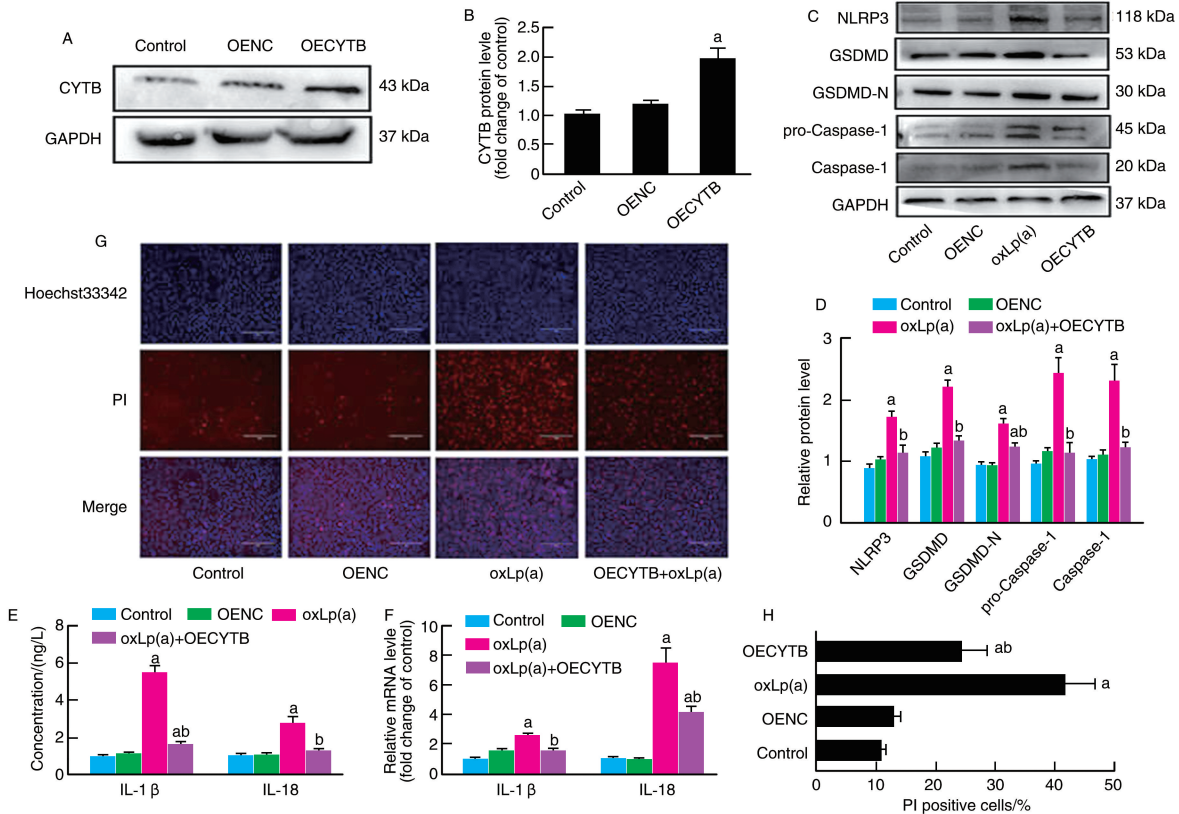


图 4. CYTB 过表达对 oxLp(a) 诱发 HUVEC 焦亡的影响 ($n = 3$)

A、B 为 Western blot 检测 CYTB 慢病毒转染后 CYTB 表达及其灰度值统计分析, C、D 为 Western blot 检测焦亡相关分子 NLRP3、pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、GSDMD-N 表达及其灰度值统计分析, E 为 ELISA 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18 水平, F 为 RT-qPCR 检测炎症因子 IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达, G 为 Hoechst33342 和 PI 双重染色检测细胞凋亡和死亡情况 (比例尺 = 300 μ m), H 为 PI 阳性细胞统计分析。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 oxLp(a) 组比较。

Figure 4. The effect of CYTB overexpression on oxLp(a) induced pyroptosis in HUVEC ($n = 3$)

2.5 CYTB 过表达抑制 oxLp(a) 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍

过表达 CYTB 后 mtROS、钙离子水平及 mPTP 值显著下降 ($P < 0.05$), ATP 水平及 MMP 均显著升

高 ($P < 0.05$), 但 ATP 水平及 MMP 仍然显著低于对照组 ($P < 0.05$)。其中 mtROS 下降 40.8%, 钙离子水平下降 28.1%, ATP 水平升高 2.5 倍, MMP 下降 49.2%, mPTP 值下降 44.6% (图 5)。

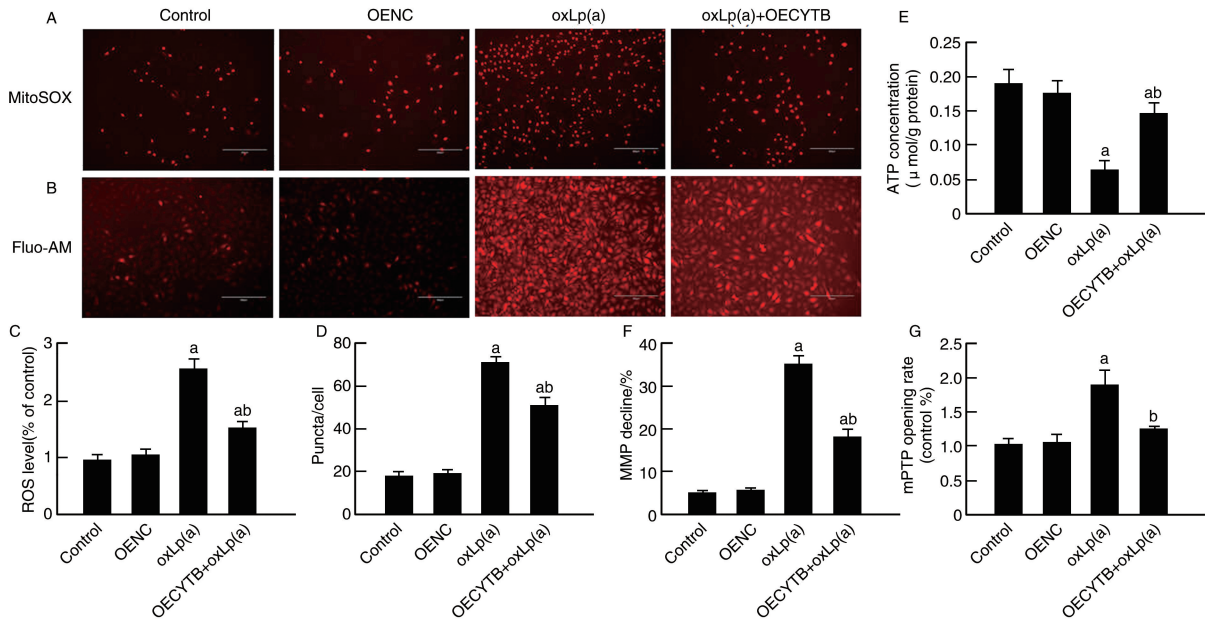


图 5. CYTB 过表达对 oxLp(a) 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍的影响 ($n = 3$)

A、C 为 MitoSOX 法检测细胞内 mtROS 水平 (比例尺 = 300 μm) 及其统计分析, B、D 为 Fluo-4AM 免疫荧光检测法测定线粒体钙离子水平 (比例尺 300 = μm) 及其统计分析, E 为酶标仪检测 ATP, F 为 JC-1 探针检测 MMP, G 为 Calcein AM 染色检测 mPTP。

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 oxLp(a) 组比较。

Figure 5. The effect of CYTB overexpression on oxLp(a) induced mitochondrial dysfunction in HUVEC ($n = 3$)

3 讨论

CYTB 是由线粒体基因组自主编码的 13 个基因之一, CYTB 蛋白为线粒体呼吸链复合物 III 上的核心蛋白, 与细胞色素 c1 形成复合物 III, 维持复合物 III 电子传递和活性, 在维护线粒体功能中起重要作用, CYTB 基因突变^[23]或表达水平下降^[24]可引起 ROS 的大量生成, 用靶向 CYTB 的长链非编码 RNA lncCytb 抑制 CYTB 表达可引起线粒体功能障碍^[25]。本研究证实, oxLp(a) 可以诱发 HUVEC 焦亡及线粒体功能障碍, 并下调 CYTB 的表达, 而过表达 CYTB 可部分恢复线粒体功能并抑制 oxLp(a) 诱发 HUVEC 焦亡, 说明 oxLp(a) 通过下调 CYTB 起作用, 但 oxLp(a) 下调 CYTB 的机制仍需要进一步探索。本课题组以前的研究发现, oxLp(a) 下调去甲基化酶 10, 11-转位酶 2 (ten-eleven translocation 2, TET2) 的表达^[26], 线粒体内发现有 TET2 的存在且线粒体基因组 D-loop 存在 CG 岛^[27], 因此, D-loop 很可能受到 TET2 的去甲基化修饰调控, oxLp(a) 很

可能通过 TET2 下调 CYTB 的表达水平。

Lp(a) 上有其独特的载脂蛋白(a) [apolipoprotein (a), Apo(a)], Apo(a) 与纤维蛋白原高度同源, 包含 KVI, KV 和一个失活的蛋白酶样结构域。由于 Apo(a) 的 KV 有很强的氧化型磷脂 (oxidized phospholipid, oxLP) 结合能力, 是体内 oxLP 主要装载蛋白^[28], oxLP 抑制或耗竭后 Lp(a) 的致血管病变的能力大大减弱^[29], oxLP 在 KV 上的存在也使得 Lp(a) 很容易被氧化成 oxLp(a)^[30], 在心肌梗死患者中 oxLp(a) 比 Lp(a) 更容易沉积在冠状动脉钙化区域^[31-32]。因此, 深入探索 oxLp(a) 的致 As 作用价值更大。Lp(a) 与 oxLp(a) 均对 HUVEC 有损伤作用, 但 oxLp(a) 对 HUVEC 的损伤作用更强^[33], 本研究也证实, oxLp(a) 致 HUVEC 焦亡作用要强于 Lp(a), 这很可能与 oxLp(a) 上的 oxLP 有关, 有必要进一步干预 oxLP, 研究 oxLp(a) 的致 HUVEC 焦亡作用。

焦亡的发生与心血管疾病密切相关^[34-36]。焦亡由炎症小体介导, 并依赖于 Caspase-1 的激活。Caspase-1 的激活将 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 切割成成

熟形式 IL-1 β 和 IL-18^[37]。而 HUVEC 中 Caspase-1 的激活可促进内皮细胞活化、单核细胞募集和 As^[38]。Xu 等^[8]发现 HUVEC 焦亡可以通过 ROS-NLRP3 途径发生并促进 As 病变进展。因此,猜想从诱导细胞焦亡的角度出发,可能抓住 oxLp(a) 致 As 的核心机制。本研究结果与猜想一致,表明 oxLp(a) 可以促进 HUVEC 焦亡的发生。然而,oxLp(a) 引起 ROS 生成的具体机制尚未被阐明。ROS 主要源于线粒体,正常生理条件下机体内 ROS 产生和清除处于动态平衡状态^[18]。但当发生 MDF 时,电子传递链复合物相关基因表达异常,引起 ROS 生成异常^[38]。因此,从 ROS 生成和 MDF 入手可能阐明 oxLp(a) 致 HUVEC 焦亡的机制。

[参考文献]

- [1] LIU Y M, PENG W, QU K, et al. TET2: a novel epigenetic regulator and potential intervention target for atherosclerosis[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(6): 517-523.
- [2] GIMBRONE M A J R, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [3] PENG N, MENG N, WANG S Q, et al. An activator of mTOR inhibits oxLDL-induced autophagy and apoptosis in vascular endothelial cells and restricts atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5519.
- [4] CHEN X, HE W T, HU L C, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis[J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007-1020.
- [5] 曹朝晖, 吴颀, 胡小波. 细胞焦亡参与动脉粥样硬化形成的分子机制新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(7): 560-565.
CAO C H, WU Z, HU X B. Novel advances in the molecular mechanism of pyroptosis involved in atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(7): 560-565.
- [6] LI P, ZHONG X M, LI J, et al. MicroRNA-30c-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated endothelial cell pyroptosis through FOXO3 down-regulation in atherosclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2833-2840.
- [7] WU X X, ZHANG H Y, QI W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 171.
- [8] XU Y J, ZHENG L, HU Y W, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 28-37.
- [9] 李秀珍, 黄孝天, 符民桂. 细胞焦亡在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(1): 1-6.
LI X Z, HUANG X T, FU M G. Role of pyroptosis in atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2018, 26(1): 1-6.
- [10] HIPPE D S, PHAN B A P, SUN J, et al. Lp(a) levels predict progression of carotid atherosclerosis in subjects with atherosclerotic cardiovascular disease on intensive lipid therapy: an analysis of the AIM-HIGH (atherothrombosis intervention in metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on global health outcomes) carotid magnetic resonance imaging substudy-brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(3): 673-678.
- [11] SANTOS H O, KONES R, RUMANA U, et al. Lipoprotein(a): current evidence for a physiologic role and the effects of nutraceutical strategies[J]. *Clin Ther*, 2019, 41(9): 1780-1797.
- [12] GALLE J, SCHNEIDER R, HEINLOTH A, et al. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress[J]. *Kidney Int*, 1999, 55(4): 1450-1461.
- [13] MORISHITA R, ISHII J, KUSUMI Y, et al. Association of serum oxidized lipoprotein(a) concentration with coronary artery disease: potential role of oxidized lipoprotein(a) in the vascular wall[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16(4): 410-418.
- [14] WANG J J, ZHANG C N, MENG Y, et al. Elevated concentrations of oxidized lipoprotein(a) are associated with the presence and severity of acute coronary syndromes[J]. *Clin Chim Acta*, 2009, 408(1/2): 79-82.
- [15] HEERMEIER K, SCHNEIDER R, HEINLOTH A, et al. Oxidative stress mediates apoptosis induced by oxidized low-density lipoprotein and oxidized lipoprotein(a)[J]. *Kidney Int*, 1999, 56(4): 1310-1312.
- [16] JI F, ZHAO C Y, WANG B, et al. The role of 5-hydroxymethylcytosine in mitochondria after ischemic stroke[J]. *J Neurosci Res*, 2018, 96(10): 1717-1726.
- [17] QIU Z, HE Y H, MING H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose-and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9c2 cardiomyocytes[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 8151836.
- [18] LI N, ZHOU H, WU H M, et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3[J]. *Redox Biol*, 2019, 24: 101215.
- [19] HAGEN C M, AIDT F H, Havndrup O, et al. MT-CYB mutations in hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2013, 1(1): 54-65.
- [20] VALNOT I, KASSIS J, CHRETIEN D, et al. A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency[J]. *Hum Genet*, 1999,

- 104(6): 460-466.
- [21] NONAKA I. Complex III (ubiquinone-cytochrome c reductase) deficiency[J]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*, 2001 (36): 135-136.
- [22] HUANG X W, LUO R H, ZHAO Q, et al. Helicobacter pylori induces mitochondrial DNA mutation and reactive oxygen species level in AGS cells[J]. *Int J Med Sci*, 2011, 8(1): 56-67.
- [23] KARI S, KANDHAVELU J, MURUGESAN A, et al. Mitochondrial complex III bypass complex I to induce ROS in GPR17 signaling activation in GBM[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114678.
- [24] MOHAMMAD G, KUMAR J, KOWLURU R A. Mitochondrial genome-encoded long noncoding RNA cytochrome B and mitochondrial dysfunction in diabetic retinopathy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 39(13/15): 817-828.
- [25] 张凯, 邓智敏, 曾召林, 等. ox-Lp(a)通过上调 miR-125a-5p 靶向抑制 10,11-转位酶 2 增加单层血管内皮细胞通透性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(11): 1107-1113.
- ZHANG K, DENG Z M, ZENG Z L, et al. Ox-Lp(a) increases permeability of monolayer vascular endothelial cells by upregulating miR-125a-5p expression and targeted inhibiting 10,11-translocation enzyme 2[J]. *Chin J Arterioscler*, 2017, 25(11): 1107-1113.
- [26] BELLIZZI D, D'AQUILA P, SCAFONE T, et al. The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern[J]. *DNA Res*, 2013, 20(6): 537-547.
- [27] LEE H K, SHIM E B. Extension of the mitochondria dysfunction hypothesis of metabolic syndrome to atherosclerosis with emphasis on the endocrine-disrupting chemicals and biophysical laws[J]. *J Diabetes Investig*, 2013, 4(1): 19-33.
- [28] VAN DER VALK F M, BEKKERING S, KROON J, et al. Oxidized phospholipids on lipoprotein (a) elicit arterial wall inflammation and an inflammatory monocyte response in humans[J]. 2016, 134(8): 611-624.
- [29] KOWLURU R A. Mitochondrial stability in diabetic retinopathy: lessons learned from epigenetics[J]. *Diabetes*, 2019, 68(2): 241-247.
- [30] KOTANI K, YAMADA S, YAMADA T, et al. The relationship between oxidized lipoprotein (a) and carotid atherosclerosis in asymptomatic subjects: a comparison with native lipoprotein (a) [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 174.
- [31] MORISHITA R, ISHII J, KUSUMI Y, et al. Association of serum oxidized lipoprotein (a) concentration with coronary artery disease: potential role of oxidized lipoprotein (a) in the vasculature wall [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16(4): 410-418.
- [32] WEI D H, ZHANG X L, WANG R, et al. Oxidized lipoprotein (a) increases endothelial cell monolayer permeability via ROS generation [J]. *Lipids*, 2013, 48(6): 579-586.
- [33] LI X, DU N, ZHANG Q, et al. MicroRNA-30d regulates cardiomyocyte pyroptosis by directly targeting foxo3a in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(10): e1479.
- [34] JI N, QI Z W, WANG Y Y, et al. Pyroptosis: a new regulating mechanism in cardiovascular disease[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 2647-2666.
- [35] ZHANG Y, LIU X, BAI X, et al. Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(2): e12449.
- [36] MIAO E A, RAJAN J V, ADEREM A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death[J]. *Immunol Rev*, 2011, 243(1): 206-214.
- [37] YIN Y, LI X Y, SHA X J, et al. Early hyperlipidemia promotes endothelial activation via a Caspase-1-sirtuin 1 pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(4): 804-816.
- [38] DESOTI V C, LAZARIN-BIDÓIA D, SUDATTI D B, et al. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction [J]. *Mar Drugs*, 2012, 10(8): 1631-1646.
- (此文编辑 文玉珊)