

本文引用: 石萌萌, 黄锐, 黄子乐, 等. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞泡沫化和氧化应激的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(9): 747-755. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.09.002.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-09-0747-09

· 实验研究 ·

茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞泡沫化和氧化应激的影响

石萌萌¹, 黄锐¹, 黄子乐¹, 胡军威¹, 肖靖杰², 刘艳红³, 武军驻¹

1. 武汉大学泰康医学院(基础医学院), 湖北省武汉市 430071; 2. 武汉大学中南医院心血管内科, 湖北省武汉市 430071; 3. 武汉大学人民医院检验科(武汉大学人民医院转化医学研究院), 湖北省武汉市 430060

[摘要] [目的] 探索茶黄素对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的 THP-1 巨噬细胞泡沫化和氧化应激的影响及机制。[方法] 使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素、10 $\mu\text{mol/L}$ 核因子 E2 相关因子 2(NRF2) 抑制剂 ML385 预处理 THP-1 来源的巨噬细胞, 随后加入 100 mg/L ox-LDL 刺激细胞 24 h 建立泡沫细胞模型。通过 CCK-8 法和 LDH 释放量检测茶黄素对 THP-1 巨噬细胞活力的影响。通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测炎症因子白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达; ELISA 法检测炎症因子的释放。采用油红 O 染色检测细胞内脂质积累, DiI 标记氧化型低密度脂蛋白(DiI-ox-LDL) 染色检测脂质摄取, DCFH-DA 探针检测活性氧(ROS) 水平。通过 Western blot 和 RT-qPCR 检测脂质摄取、胆固醇外排及氧化应激相关蛋白的表达。[结果] 经 100 mg/L 的 ox-LDL 处理, THP-1 巨噬细胞活力明显降低, 脂质摄取、积累明显增加, 脂质摄取相关蛋白表达增加, 胆固醇外排相关蛋白表达明显减少, 炎症与 ROS 水平明显增加, 髓过氧化物酶(MPO) 和 NADPH 氧化酶 2(NOX2) 表达增加($P < 0.05$); 加入茶黄素后, 细胞活力升高, 细胞内脂质积累明显减少, 脂质摄取相关蛋白的表达明显减少, 胆固醇外排相关蛋白表达明显增多, 炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达与释放明显降低, ROS 水平降低, MPO 与 NOX2 表达减少($P < 0.05$)。茶黄素预处理改变了 NRF2 信号通路中 NRF2、血红素加氧酶 1(HO-1)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(KEAP1) 的表达, 增加了 NRF2 核易位, 减缓了细胞内氧化应激。ML385 预处理细胞后, NRF2、HO-1、KEAP1 和 CD36 蛋白表达水平明显降低。[结论] 茶黄素可以显著抑制 THP-1 巨噬细胞泡沫化, 抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症并通过 NRF2/HO-1 信号通路减缓了氧化应激。

[关键词] 茶黄素; 泡沫细胞; THP-1 巨噬细胞; 氧化应激

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Effects of theaflavin on ox-LDL-induced foam cell formation and oxidative stress in THP-1 derived macrophages

SHI Mengmeng¹, HUANG Rui¹, HUANG Zile¹, HU Junwei¹, XIAO Jingjie², LIU Yanhong³, WU Junzhu¹

1. Taikang Medical School & School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 2. Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China; 3. Department of Clinical Laboratory & Institute of Translational Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of theaflavin on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced foam cell formation and oxidative stress in THP-1 macrophages and its mechanism. **Methods** THP-1 derived macrophages were pretreated with 50 $\mu\text{mol/L}$ theaflavin and (or) 10 $\mu\text{mol/L}$ nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) inhibitor ML385, then 100 mg/L ox-LDL was added to the cells for 24 h to establish the foam cell model. The effect of theaflavin on THP-1 macrophages viability was evaluated by CCK-8 assay and LDH release. The expression of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were analyzed by real-time

[收稿日期] 2023-11-24

[修回日期] 2024-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82300322)

[作者简介] 石萌萌, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制, E-mail: shimengmeng@whu.edu.cn. 通信作者武军驻, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子机制, E-mail: wujunzhu@whu.edu.cn. 通信作者刘艳红, 博士, 副主任医师, 研究方向为血栓与止血, E-mail: 1376090683@qq.com.

quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot. The release of inflammatory cytokines were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Intracellular lipid accumulation was detected by Oil red O staining, and lipid absorption was observed by DiI-labeled oxidized low density lipoprotein (DiI-ox-LDL) staining. Reactive oxygen species (ROS) level was detected by DCFH-DA probe. The expression of lipid uptake, cholesterol efflux and oxidative stress-related proteins were detected by Western blot and RT-qPCR. **Results** Treatment with 100 mg/L ox-LDL significantly decreased cell viability and cholesterol efflux-related protein expressions, increased lipid uptake, accumulation and lipid uptake-related protein expressions, and significantly promoted inflammation and ROS level, as well as the expressions of myeloperoxidase (MPO), NADPH oxidase 2 (NOX2) in THP-1 macrophages (all $P < 0.05$). After pretreatment with theaflavin, cell viability was increased, intracellular lipid uptake, accumulation and lipid uptake-related protein expressions were significantly reduced, cholesterol efflux-related protein expressions were significantly increased, the expression and release of IL-6, IL-1 β and TNF- α were significantly decreased, ROS level was significantly decreased, and the expression of MPO and NOX2 were decreased (all $P < 0.05$). Pretreatment with theaflavin effectively alleviated intracellular oxidative stress by altering the expression of NRF2, heme oxygenase-1 (HO-1) and Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) in NRF2 signaling pathway, and enhanced the translocation of NRF2 into the nucleus. After pretreatment with ML385, the expression levels of NRF2, HO-1, KEAP1 and CD36 were significantly decreased. **Conclusion** Theaflavin can significantly inhibit ox-LDL-induced foam cell formation, inflammation, and oxidative stress through NRF2/HO-1 signaling pathway in THP-1 macrophages.

[**KEY WORDS**] theaflavin; foam cell; THP-1 macrophages; oxidative stress

作为一种慢性炎症性病变,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是许多心血管疾病的主要病理基础^[1]。在其早期阶段,排列在血管内壁的内皮细胞渗透性增加,使低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)颗粒积聚而发生氧化修饰,产生炎性介质并导致白细胞聚集和炎症^[2]。单核细胞与黏附分子结合后进入血管内膜分化为巨噬细胞,随后通过一系列清道夫受体(scavenger receptor, SR)吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL),从而产生胆固醇充盈的巨噬细胞即泡沫细胞,促进了As的发展^[3]。茶黄素(theaflavin)是一种从红茶中分离得到的多酚类化合物,具有广泛的生物活性如抗癌、抗氧化、抗炎症、抗菌等^[4]。研究表明^[5]大鼠口服茶黄素后可通过激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)/核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)通路增强再生组织的血管化,加速伤口愈合。本研究旨在探索茶黄素对ox-LDL诱导的泡沫细胞形成和氧化应激的影响,揭示茶黄素抗As的新机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

胎牛血清、 β -巯基乙醇、RMPI 1640培养基、THP-1细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司;茶黄素(分析标准品, HPLC $\geq 95\%$)购自上海源叶生物科技有限

公司;佛波醇12-十四酸酯13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自Sigma-Aldrich公司;DiI标记氧化型低密度脂蛋白(DiI-labeled oxidized low density lipoprotein, DiI-ox-LDL)和ox-LDL购自广州奕元生物技术有限公司;CCK-8试剂购自Biosharp公司;油红O染色试剂盒与核蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自碧云天生物研究所;BCA试剂盒和蛋白Marker购自Thermo Fisher公司;RNA提取试剂和2 \times SYBR Green购自艾科瑞生物工程有限公司;反转录试剂盒购自Takara公司;抗体和ELISA试剂盒购自武汉爱博泰克公司;NRF2抑制剂ML385购自Med Chem Express公司。

1.2 细胞培养

使用RMPI 1640培养基(含10%胎牛血清、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -巯基乙醇)培养THP-1悬浮细胞。将生长状态良好的THP-1细胞以 1×10^6 个/mL接种于孔板内,同时加入20 $\mu\text{g/L}$ 的PMA刺激细胞,约36~48 h后分化为巨噬细胞。随后,向THP-1巨噬细胞中加入100 mg/L的ox-LDL刺激24 h来模拟泡沫细胞形成,茶黄素预处理2 h评估其保护作用,10 $\mu\text{mol/L}$ 的ML385预处理1 h以抑制细胞内NRF2表达。

1.3 细胞活力检测

将THP-1巨噬细胞接种于96孔板36 h后,分别加入不同浓度梯度的茶黄素(0~200 $\mu\text{mol/L}$)和ox-LDL(100 mg/L)培养24 h,向每孔中快速加入

10 μL 的 CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h 后使用酶标仪测定 450 nm 处吸光值进行计算。

使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的茶黄素预处理 THP-1 巨噬细胞 2 h, 随后加入 100 mg/L 的 ox-LDL 刺激细胞 24 h, 收集培养上清, 根据说明书流程检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放量。

1.4 油红 O 染色

将各组干预处理好的 THP-1 细胞从培养箱取出, 使用 PBS 清洗 3 次后用 4% 多聚甲醛固定 20 min。使用 60% 异丙醇浸洗细胞后, 加入油红 O 染色液浸染 30 min。最后加入苏木精染液复染细胞核。于正置显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件分析油红 O 染色面积和脂滴大小。

1.5 DiI-ox-LDL 染色

使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的茶黄素预处理细胞 2 h 后, 加入 20 mg/L 的 DiI-ox-LDL 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光孵育 6 h。使用 PBS 清洗 3 次后用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 加入 DAPI 染核 30 min。使用荧光正置显微镜进行拍照, Image J 软件分析荧光强度。

1.6 ELISA 检测炎症细胞因子分泌

将各组干预处理好的 THP-1 细胞从培养箱取出, 收集培养上清 1 000 r/min 离心 10 min。根据说明书的流程, 使用“双抗夹心法”检测细胞因子的释放, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光值并进行计算。

1.7 ROS 检测

将各组干预处理好的 THP-1 细胞从培养箱取出, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 探针避光温育 30 min。RMPI 1640 培养液清洗 3 次后, 使用荧光倒置显微镜进行观察。

1.8 RT-qPCR 检测相关 mRNA 表达

取出各组干预处理好的 THP-1 细胞, PBS 清洗 3 次后加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。定量后取 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA, 根据 Bio-Rad CFX96 系统制造商的说明进行 PCR 扩增。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 mRNA 的相对表达水平, 内参基因为 β -actin。引物序列: 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 上游为 5'-GATTTACATAAAAATAGTCCTTCCTACC-3', 下游为 5'-GGTTTGCCGAGTAGATCTCAAAGTG-3'; 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 上游为 5'-ACGATGCACCTGTACGATCA-3', 下游为 5'-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3'; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 上游为 5'-ACAAGCCTGTAGCCACGTC-3', 下游为 5'-AAGACTCCTCCAGGTATATGG-3'; CD36 上游为 5'-CCTCTGGCAACAAACCACAC-3', 下游为 5'-TCCGGTCACAGCCCATTTTT-3'; 巨

噬细胞清道夫受体 1 (macrophage scavenger receptor 1, MSR1) 上游为 5'-GAGCAACATGGAGAAGAGAATC-3', 下游为 5'-ATGTTCCCAATCTTTCAGTCTG-3'; 血凝素样 ox-LDL 受体 1 (lectin-like ox-LDL receptor-1, LOX-1) 上游为 5'-AGATCCAGACTGTGAAGGACCAGC-3', 下游为 5'-CAGGCACCACCATGGAGAGTAAAG-3'; ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 上游为 5'-CTTCTCCGGAAGGCTTGTC-3', 下游为 5'-CAGCTCACAGCAGGGAC-3'; ATP 结合盒转运体 G1 (ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1) 上游为 5'-CAGGGACCTTTCCTATTTCGG-3', 下游为 5'-GGCCACCAACTCACCCTAT-3'; NRF2 上游为 5'-CAGTCAGCGACGGAAAGAGTA-3', 下游为 5'-CTGGGAGTAGTTGGCAGATCC-3'; 血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 上游为 5'-AAGATTGCCAGAAAAGCCCTGGAC-3', 下游为 5'-AACTGTCCACCAGAAAAGCTGAG-3'; Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 上游为 5'-CCTCTGGCCGGTAATAGG-3', 下游为 5'-CCCCTCCCAGGTATCCAAGA-3'; β -actin 上游为 5'-ATGGGTCAGAAGGATTCTAT-3', 下游为 5'-AAGAGTGCCTCAGGGCAG-3'。

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

取出各组干预处理好的 THP-1 细胞, PBS 清洗 3 次后加入 RIPA 裂解液 (含 1% Cocktail 和 1 mmol/L 的 PMSF) 裂解细胞总蛋白。按照说明书方法, 分离核蛋白与胞质蛋白。BCA 法蛋白定量后加入等体积 2 \times 上样缓冲液混匀, 煮沸变性 10 min。30 μg 的蛋白裂解液使用 8% ~ 15% 的 SDS-PAGE 胶进行分离, 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗 (β -actin 1 : 2 000; 其他 1 : 800)。次日回收一抗, 1 \times TBST 清洗 4 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 2 h, 1 \times TBST 清洗 4 次后使用 ECL 进行显影。使用 β -actin 为内参基因, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验至少进行 3 次生物学重复。使用 Graph Pad Prism 9 统计分析实验数据, 采用单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 茶黄素和 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞活力的影响与对照组相比, 低浓度 (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 的茶

黄素对 THP-1 巨噬细胞活力无显著影响 ($P > 0.05$), 而加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素后 THP-1 巨噬细胞活力降低 44.6% ($P < 0.01$); 100 mg/L ox-LDL 干预 24 h 后, THP-1 巨噬细胞活力降低 29.0% ($P < 0.01$)。与 ox-LDL 组相比, 同时加入 20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素使细胞活力分别升高了 10.8% ($P > 0.05$)、

22.8% ($P < 0.05$)、41.4% ($P < 0.01$)。因此, 选择 50 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素来进行后续的实验。与对照组相比, ox-LDL 组 LDH 释放量升高 113.2% ($P < 0.01$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素组则无明显变化 ($P > 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+茶黄素组 LDH 释放量减少 37.0% ($P < 0.01$; 图 1)。

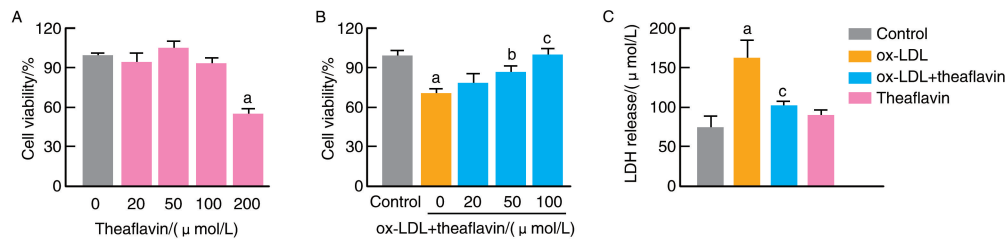


图 1. 茶黄素和 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞活力的影响

A、B 为 CCK-8 检测细胞活力 ($n=5$); C 为 LDH 释放实验检测细胞毒性 ($n=5$)。

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effects of theaflavin and ox-LDL on cell viability in THP-1 macrophages

2.2 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症的影响

与对照组比较, ox-LDL 组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 水平显著升高, 分别升高 385.0%、116.8%、267.1% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+茶黄素组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 水平分别降低 84.9%、39.1%、73.2% (均 $P < 0.01$)。Western blot 结果表明, 与对照组比较, ox-LDL 组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的蛋白表达量显著升高, 分别升高 73.6%、68.6%、119.2% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+茶黄素组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的蛋白表达量分别降低 84.9%、39.1%、55.8% (均 $P < 0.01$)。ELISA 结果表明, 与对照组比较, ox-LDL 组细胞培养上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌量升高 246.9%、87.9%、120.2% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组比较, ox-LDL+茶黄素组细胞培养上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌量降低 19.3%、46.3%、51.4% (均 $P < 0.01$; 图 2)。总的来说, 茶黄素可以减少 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子的表达与分泌。

2.3 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响

油红 O 染色结果表明, ox-LDL 处理可以增加细胞内脂质积累。与对照组相比, ox-LDL 组脂质积累增加 85.4% ($P < 0.01$); 茶黄素预处理减少 THP-1 巨噬细胞中 33.1% 的脂质积累 ($P < 0.01$)。DiI-ox-LDL 染色结果表明, 与 ox-LDL 组相比, 茶黄素预处理可使 THP-1 巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取减少

67.8% ($P < 0.01$; 图 3)。

2.4 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36、MSR1、LOX-1 表达的影响

SR 介导的摄取是胆固醇摄取的主要途径, 包括 MSR1、CD36 和 LOX-1 等^[6]。RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 组 CD36、MSR1 和 LOX-1 的 mRNA 水平分别上调 125.0%、213.9%、112.7% (均 $P < 0.01$); 加入茶黄素后, CD36、MSR1 和 LOX-1 的 mRNA 水平与 ox-LDL 组相比分别降低 38.9%、69.4%、73.1% (均 $P < 0.01$)。Western blot 结果表明, 与对照组相比, ox-LDL 处理分别使 CD36、MSR1 和 LOX-1 蛋白表达量提高 59.4%、110.5%、84.6% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组相比, 茶黄素预处理后 CD36、MSR1 和 LOX-1 蛋白表达量分别降低 24.7%、55.7%、53.2% (均 $P < 0.01$; 图 4)。

2.5 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 ABCA1、ABCG1 表达的影响

在脂质过载时, ABCA1 和 ABCG1 介导胆固醇主动转运出巨噬细胞, 防止细胞内胆固醇过量积累^[7]。RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 组 ABCA1、ABCG1 的 mRNA 水平显著降低, 分别降低 22.2%、65.4% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL+茶黄素组 ABCA1、ABCG1 的 mRNA 水平显著升高, 分别升高 86.8%、74.7% (均 $P < 0.01$)。Western blot 结果表明, THP-1 巨噬细胞暴露于 ox-LDL 后, ABCA1、ABCG1 蛋白表达量分别降低 64.8%、13.0% (均 $P < 0.05$); 加入茶黄素后,

ABCA1、ABCG1 蛋白表达量相较于 ox-LDL 组分别 升高 186.1%、10.3% (均 $P < 0.05$; 图 5)。

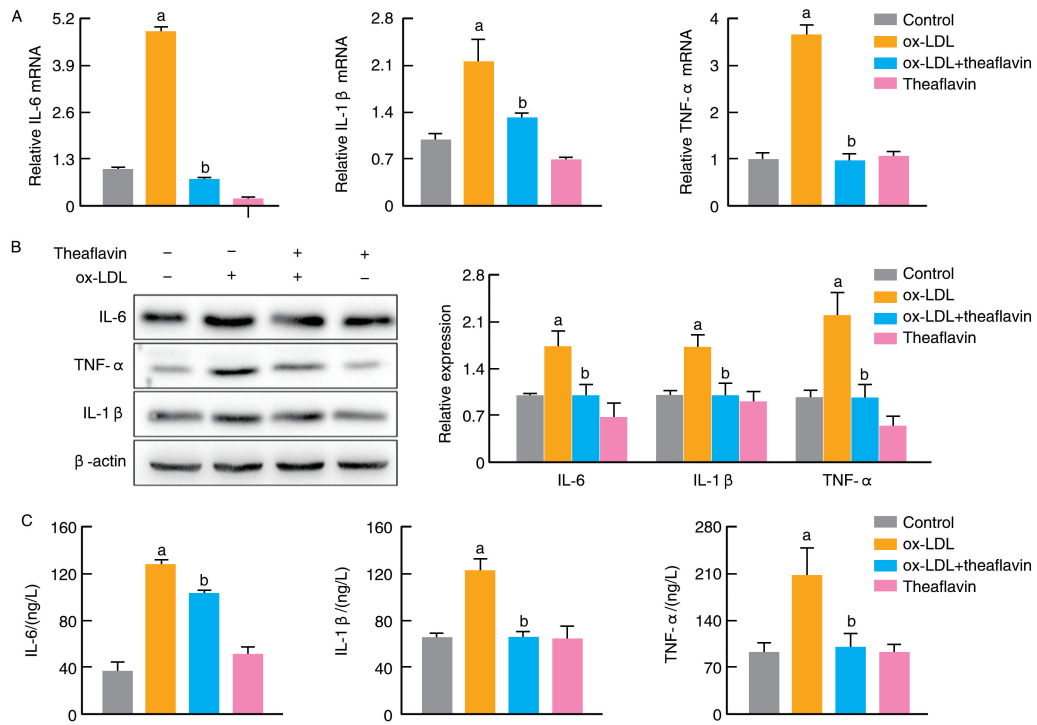


图 2. 茶黄素对 ox-LDL 处理的 THP-1 巨噬细胞炎症的影响

A 为 RT-qPCR 检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达水平 ($n=3$); B 为 Western blot 检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的蛋白表达水平 ($n=3$); C 为 ELISA 检测细胞培养上清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的分泌量 ($n=3$)。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effects of theaflavins on ox-LDL-induced inflammation in THP-1 macrophages

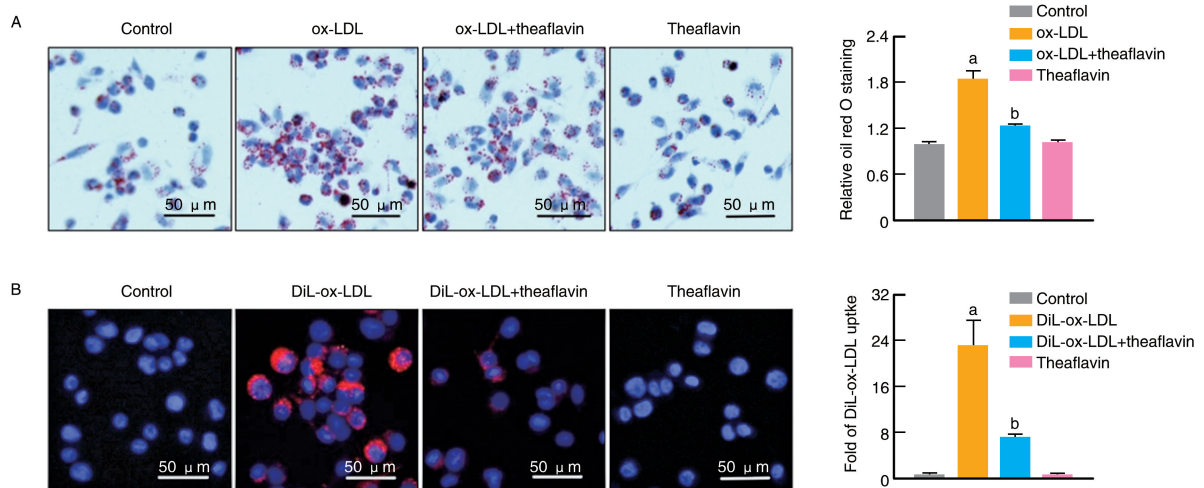


图 3. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响

A 为油红 O 染色检测脂质积累 ($n=5$); B 为 DiI-ox-LDL 染色检测 ox-LDL 摄取 ($n=5$)。

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL (或 DiI-ox-LDL) 组比较。

Figure 3. Effect of theaflavin on ox-LDL-induced foam cell formation in THP-1 macrophages

2.6 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 ROS 及 MPO、NOX2 表达的影响

与对照组相比, ox-LDL 组 ROS 水平及髓过氧化

物酶 (myeloperoxidase, MPO)、NADPH 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2) 表达量明显升高, 分别升高了 155.0%、73.6%、40.7% (均 $P < 0.05$); 加入茶

黄素后,ROS 水平降低,MPO、NOX2 表达量分别降 低了 42.4%、26.6% (均 $P < 0.05$; 图 6)。

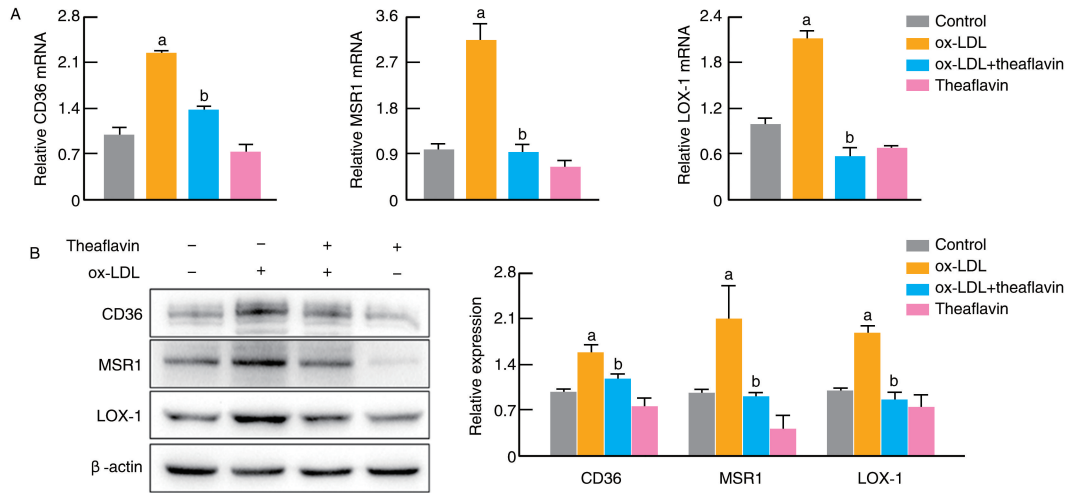


图 4. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 CD36、MSR1、LOX-1 表达的影响

A 为 RT-qPCR 检测 CD36、MSR1、LOX-1 的 mRNA 表达水平 ($n=3$); B 为 Western blot 检测 CD36、MSR1、LOX-1 的蛋白表达 ($n=3$)。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 4. Effect of theaflavin on the expression of CD36, MSR1 and LOX-1 in ox-LDL-induced THP-1 macrophages

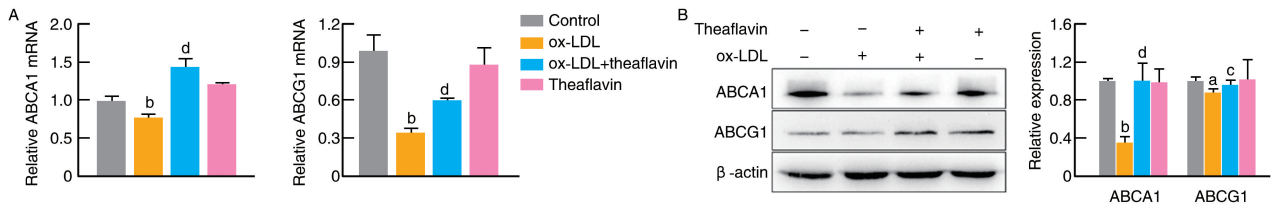


图 5. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 ABCA1、ABCG1 表达的影响

A 为 RT-qPCR 检测 ABCA1、ABCG1 的 mRNA 表达水平 ($n=3$); B 为 Western blot 检测 ABCA1、ABCG1 的蛋白表达 ($n=3$)。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 5. Effect of theaflavin on the expression of ABCA1 and ABCG1 in ox-LDL-induced THP-1 macrophages

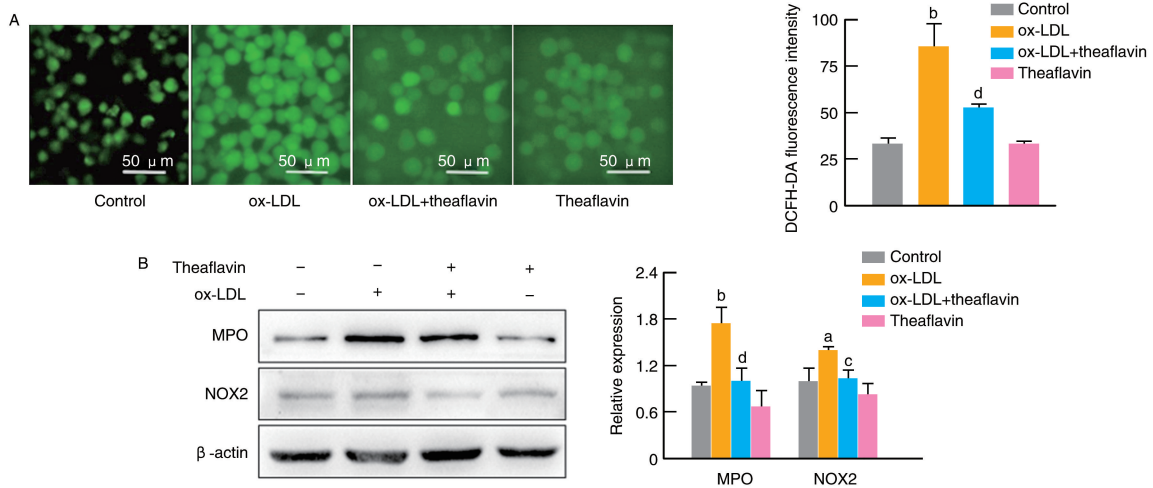


图 6. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 ROS 水平及 MPO、NOX2 表达的影响

A 为 DCFH-DA 探针检测细胞内活性氧水平 ($n=5$); B 为 Western blot 检测 MPO、NOX2 的蛋白表达 ($n=3$)。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 6. Effect of theaflavin on the level of ROS, and the expressions of MPO and NOX2 in ox-LDL-induced THP-1 macrophages

2.7 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 NRF2、HO-1、KEAP1 表达的影响

近年来, NRF2 被认为与不同的心血管疾病相关, 已成为心血管疾病的重要防御机制之一^[8]。RT-qPCR 和 Western blot 结果表明, ox-LDL 处理使 NRF2、HO-1、KEAP1 的 mRNA 表达水平分别增加 135.2%、116.3%、147.1% (均 $P < 0.01$), 蛋白表达量分别增加 130.2%、137.2%、31.2% (均 $P < 0.01$)。加入茶黄素后, NRF2 和 KEAP1 的 mRNA 表达水平分别减少 48.9%、32.0% (均 $P < 0.01$), 蛋白表达量分别减少 21.4%、20.2% (均 $P < 0.01$);

HO-1 的 mRNA 和蛋白水平分别增加 24.8%、25.2% (均 $P < 0.01$; 图 7)。

为了进一步验证 NRF2 在茶黄素缓解 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞氧化应激中的作用, 分离核蛋白观察 NRF2 的表达变化。与对照组相比, ox-LDL 组细胞核内 NRF2 蛋白表达量减少 43.6%, 其在胞质内增加 158.4% (均 $P < 0.01$); 加入茶黄素后, 细胞核内 NRF2 蛋白表达量增加 36.3%, 其在胞质内减少 18.2% (均 $P < 0.01$), 这表明茶黄素能增加 NRF2 核易位 (图 7)。

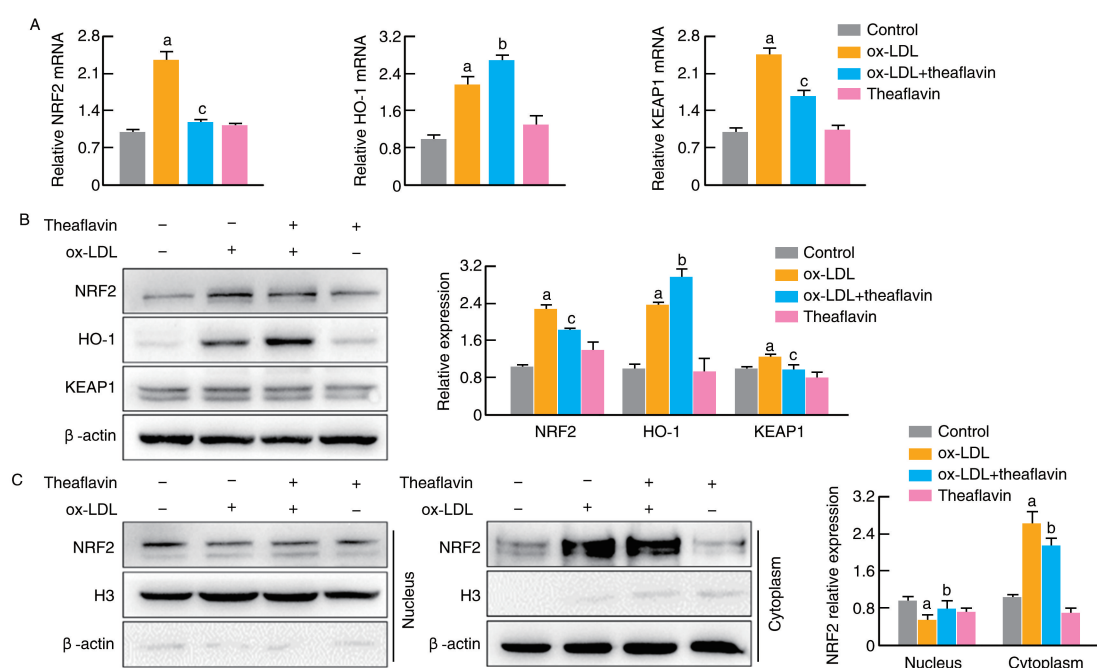


图 7. 茶黄素对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞 NRF2、HO-1、KEAP1 表达的影响

A 为 RT-qPCR 检测 NRF2、HO-1、KEAP1 的 mRNA 表达水平 ($n=3$); B 为 Western blot 检测 NRF2、HO-1、KEAP1 的蛋白表达 ($n=3$); C 为 Western blot 检测细胞核与细胞质中 NRF2 的蛋白表达 ($n=3$)。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较。

Figure 7. Effect of theaflavin on the expression of NRF2, HO-1 and KEAP1 in ox-LDL-induced THP-1 macrophages

2.8 ML385 对茶黄素预处理的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 NRF2、HO-1、KEAP1、CD36 蛋白表达的影响

与对照组比较, ML385 组 NRF2、HO-1、KEAP1、CD36 蛋白表达分别减少 64.9%、45.5%、21.7%、36.3% (均 $P < 0.01$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + ML385 组 NRF2、HO-1、KEAP1、CD36 蛋白表达均减少, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与 ox-LDL + 茶黄素组比较, 加入 ML385 后, NRF2、HO-1、KEAP1、CD36 蛋白表达分别减少 58.5%、26.4%、64.3%、33.7% (均 $P < 0.05$), 进一步表明茶黄素可以通过 NRF2 信号通路缓解 ox-LDL 引起的巨噬细胞氧化应激; 也表明 CD36 蛋白表达受 NRF2 信号调控 ($P < 0.01$; 图 8)。

3 讨论

天然产物是发现新药线索的重要资源。近些年来, 越来越多的天然产物如黄酮类、酚类、萜类化合物、生物碱等被证实可以抑制 As 中泡沫细胞形成^[9]。茶黄素是一种多酚类化合物, 广泛存在于发酵茶中。在体内和体外, 茶黄素可以通过抑制氧化应激和炎症水平显著降低肾缺血再灌注损伤^[10]。此外, 研究发现^[11]茶黄素能有效降低高脂喂养小鼠的血脂水平, 促进抗氧化酶活性, 并通过 NRF2/HO-1 信号通路保护人脐静脉内皮细胞免受胆固醇诱导的氧化损伤。尽管前人的研究表明茶黄素具有抗 As 作

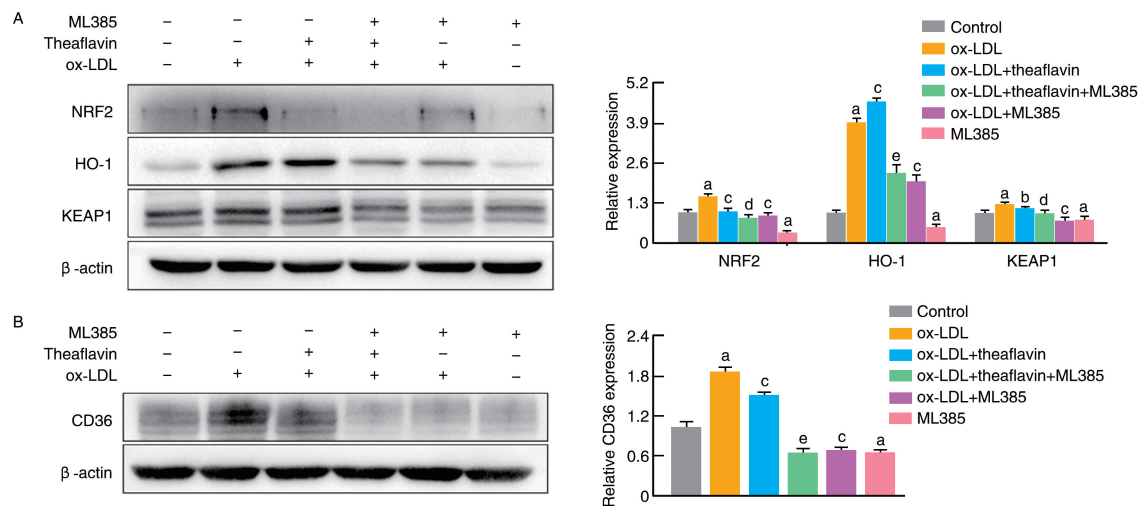


图 8. ML385 对茶黄素预处理的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞 NRF2、HO-1、KEAP1、CD36 蛋白表达的影响

A 为 Western blot 检测 NRF2、HO-1、KEAP1 的蛋白表达 ($n=3$); B 为 Western blot 检测 CD36 的蛋白表达 ($n=3$)。

a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, c 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL 组比较; d 为 $P<0.05$, e 为 $P<0.01$, 与 ox-LDL+茶黄素组比较。

Figure 8. Effect of ML385 on the expression of NRF2, HO-1, KEAP1 and CD36 in THP-1 macrophages-derived foam cells pretreated with theaflavin

用,但对其机制研究仍然有限。因此,本文探讨了茶黄素对胆固醇摄取及外排的影响,并发现茶黄素可以缓解 ox-LDL 引起的巨噬细胞炎症和氧化应激。

As 早期的病变标志是单核细胞来源的巨噬细胞吞噬过量的 ox-LDL 从而转化为泡沫细胞并在内膜下积累^[12]。根据研究^[13],将过量的 ox-LDL (100 mg/L) 添加到 THP-1 巨噬细胞中来诱导泡沫细胞的形成。本研究结果表明,50 $\mu\text{mol/L}$ 茶黄素可以有效减缓 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成。

炎症与 As 的发生和发展密切相关。在 As 早期,LDL 颗粒发生氧化修饰形成 ox-LDL,促进炎症细胞因子的表达和释放,进而促进单核细胞分化为巨噬细胞^[14]。在 As 晚期,大量巨噬细胞和炎症因子浸润血管壁,进而导致斑块破裂和血栓形成^[15]。因此,抑制炎症因子的表达与分泌对治疗 As 具有重要意义^[16]。本研究结果表明,茶黄素可以减少由于 ox-LDL 处理导致的炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达与分泌的增加。

泡沫细胞的形成是脂质摄取及胆固醇酯化、水解和胆固醇外排的综合作用决定的。巨噬细胞可以通过吞噬作用、胞饮作用和 SR 包括 CD36、MSR1 和 LOX-1 等吸收经过修饰的 LDL^[17]。在基础条件下,MSR1 和 CD36 占巨噬细胞内化 ox-LDL 的 75% ~ 90%,而 LOX-1 则贡献了 5% ~ 10% 的 ox-LDL 摄取和脂质积累^[18]。修饰的 LDL 被转运到溶酶体并被脂肪酶水解成游离胆固醇和脂肪酸,而游

离胆固醇在内质网中被乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 (acetyl coenzyme A acyltransferase, ACAT) 重新酯化为胆固醇,储存在细胞质中^[19]。为了维持细胞内胆固醇稳态,过量的胆固醇通过自由扩散和转运体依赖的外排途径被转运出细胞膜^[20]。因此本研究检测了巨噬细胞主要的 SR 和转运体的表达变化,结果显示茶黄素可以显著减少脂质摄取相关蛋白表达,增加胆固醇外排相关蛋白表达,从而抑制泡沫细胞形成。而茶黄素调控相关蛋白的机制尚未可知,这需要在后续研究中进一步探索。

氧化应激也高度参与 As 的发展,与促炎信号通路的激活和炎症因子的表达同时发生^[21]。这主要与 ROS 的异常相关,破坏了促氧化剂与抗氧化剂之间的平衡^[22]。本课题研究表明,ox-LDL 处理后 THP-1 巨噬细胞内 ROS 水平明显升高,茶黄素预处理在一定程度上降低了 ROS 水平。NOX2 是 ROS 的重要来源之一,其表达增加与斑块发展高度相关^[23]。MPO 是一种中性粒细胞颗粒蛋白,可促进斑块发展,从而促进泡沫细胞形成。研究表明^[24],在高胆固醇血症小鼠中给予 MPO 抑制剂可有效减少炎症和氧化应激。本研究表明,茶黄素处理可显著降低 NOX2 和 MPO 的表达。NRF2 在调节氧化应激和炎症因子的表达中起关键作用^[25]。

NRF2 是机体内调节氧化应激的关键转录因子。在正常生理条件下,NRF2 被其特异性抑制剂 KEAP1 泛素化和降解;在应激状态下,NRF2 与

KEAP1 分离,游离 NRF2 从细胞质转到细胞核,与抗氧化反应元件(anti-oxide response element, ARE)结合,激活抗氧化防御基因如 HO-1 的转录,快速清除 ROS 从而减轻氧化损伤^[25]。本研究结果表明,ox-LDL 处理后 NRF2、KEAP1、HO-1 的表达上调,加入茶黄素后 KEAP1 表达降低。本研究结果表明,茶黄素可增加细胞核内 NRF2 水平,从而增加下游基因 HO-1 的表达水平,给予 NRF2 抑制剂 ML385 后 HO-1 表达水平降低,减缓了茶黄素对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞氧化应激的保护作用,这表明茶黄素通过 NRF2 核易位调控下游抗氧化基因表达,减缓细胞内氧化应激反应。研究表明^[8],CD36 是 NRF2 的靶基因之一,本研究表明 NRF2 信号通路在通过 CD36 介导的 ox-LDL 摄取中起着关键作用;但其具体机制仍需进一步研究。

综上所述,茶黄素可以显著抑制 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,减少脂质摄取并增加胆固醇外排,抑制 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞炎症并通过 NRF2/HO-1 信号通路减缓氧化应激。

[参考文献]

- [1] CHISTIakov D A, MELNICHENKO A A, MYASOEDOVA V A, et al. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(11): 1153-1165.
- [2] BORÉN J, WILLIAMS K J. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity[J]. Curr Opin Lipidol, 2016, 27(5): 473-483.
- [3] TABAS I, BORNfeldt K E. Intracellular and intercellular aspects of macrophage immunometabolism in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2020, 126(9): 1209-1227.
- [4] CHEN S Y, LI Y P, YOU Y P, et al. Theaflavin mitigates acute gouty peritonitis and septic organ injury in mice by suppressing NLRP3 inflammasome assembly[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(10): 2019-2036.
- [5] CHEN D, WU Z, WU L N, et al. Theaflavin attenuates TBHP-induced endothelial cells oxidative stress by activating PI3K/AKT/Nrf2 and accelerates wound healing in rats[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 830574.
- [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] DIMARCO D M, FERNANDEZ M L. The regulation of reverse cholesterol transport and cellular cholesterol homeostasis by microRNAs[J]. Biology (Basel), 2015, 4(3): 494-511.
- [8] ALONSO-PIÑEIRO J A, GONZALEZ-ROVIRA A, SÁNCHEZ-GOMAR I, et al. Nrf2 and heme oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(9): 1463.
- [9] 雷雪丽, 王震. 中药天然产物调控内皮细胞防治动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1): 70-79.
- [10] LEI X L, WANG Z. Research progress on the regulation of endothelial cells by natural products of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(1): 70-79.
- [11] LI Z, ZHU J, WAN Z, et al. Theaflavin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2 signalling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 134: 111097.
- [12] ZENG J, DENG Z, ZOU Y, et al. Theaflavin alleviates oxidative injury and atherosclerosis progress via activating microRNA-24-mediated Nrf2/HO-1 signal[J]. Phytother Res, 2021, 35(6): 3418-3427.
- [13] ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [14] DENG Q, LI H, YUE X, et al. Smooth muscle liver kinase B1 inhibits foam cell formation and atherosclerosis via direct phosphorylation and activation of SIRT6[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(8): 542.
- [15] BATTY M, BENNETT M R, YU E. The role of oxidative stress in atherosclerosis[J]. Cells, 2022, 11(23): 3843.
- [16] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.
- [17] 杨梦, 胡思远, 李琳, 等. 巨噬细胞极化在心血管疾病中的作用及中药干预研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(3): 261-270.
- [18] YANG M, HU S Y, LI L, et al. The role of macrophage polarization in cardiovascular disease and Chinese medicine intervention[J]. Chin J Arterioscler, 2023, 31(3): 261-270.
- [19] MOORE K J, SHEEDY F J, FISHER E A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 709-721.
- [20] SCHAEFFER D F, RIAZY M, PARHAR K S, et al. LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma[J]. J Lipid Res, 2009, 50(8): 1676-1684.
- [21] GROENEN A G, HALMOS B, TALL A R, et al. Cholesterol efflux pathways, inflammation, and atherosclerosis[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2021, 56(4): 426-439.
- [22] CASTAÑO D, RATTANASOPA C, MONTEIRO-CARDOSO V F, et al. Lipid efflux mechanisms, relation to disease and potential therapeutic aspects[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 159: 54-93.
- [23] PELUSO I, MORABITO G, URBAN L, et al. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2012, 12(4): 351-360.
- [24] VILLALPANDO-RODRIGUEZ G E, GIBSON S B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9912436.
- [25] VERMOT A, PETIT-HÄRTLEIN I, SMITH S M E, et al. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(6): 890.
- [26] TIYERILI V, CAMARA B, BECHER M U, et al. Neutrophil-derived myeloperoxidase promotes atherogenesis and neointima formation in mice[J]. Int J Cardiol, 2016, 204: 29-36.
- [27] SUN Y Y, ZHU H J, ZHAO R Y, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice[J]. Redox Biol, 2023, 66: 102852.

(此文编辑 许雪梅)