

本文引用: 侯亮, 丁彦春. RIP2 对巨噬细胞炎性活化及极性转化的调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(1): 30-37.
DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.01.005.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-01-0030-08

RIP2 对巨噬细胞炎性活化及极性转化的调控

侯亮¹, 丁彦春²

1. 长江航运总医院心内科, 湖北省武汉市 430000; 2. 大连医科大学附属第二医院心内 2 科, 辽宁省大连市 116000

[摘要] [目的] 观察受体相互作用蛋白 2(RIP2) 对巨噬细胞炎性活化及极性转化的影响, 探讨 RIP2 在巨噬细胞吞噬氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)过程中的作用机制。[方法] 用不同剂量(10、25 和 50 mg/L)的 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h, 及用 50 mg/L ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 8、16 及 24 h, 应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 THP-1 源性巨噬细胞中 RIP2 mRNA 和蛋白的表达, 应用 ELISA 检测细胞肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) 的分泌。设计 3 对 RIP2 siRNA, 应用 hipefect 转染试剂转染 RIP2 siRNA 进入细胞, 应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 THP-1 源性巨噬细胞转染后 RIP2 mRNA 和蛋白的表达, 从而筛选最适 siRNA 转染浓度和最有效的一对 siRNA。用最有效 RIP2 siRNA 转染细胞后, 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h, 应用 ELISA 检测 TNF- α 、MCP-1、白细胞介素 10(IL-10)、白细胞介素 12(IL-12) 的分泌, 应用实时荧光定量 PCR 检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶 1(Arg-1) 的表达, 应用流式细胞术检测细胞表面抗原 CD86、CD80 和 CD163 的表达。[结果] ox-LDL 以剂量和时间依赖的方式诱导巨噬细胞中 RIP2 的表达, 随着 ox-LDL 处理剂量及时间的增加, RIP2 mRNA 及蛋白的表达增加, 其中 50 mg/L 组 RIP2 蛋白的表达是对照组的 7.6 倍, 24 h 组 RIP2 蛋白的表达是对照组的 17.9 倍($P < 0.001$)。ELISA 结果显示, 随着 ox-LDL 处理剂量及时间的增加, TNF- α 和 MCP-1 的分泌升高($P < 0.05$)。RIP2 siRNA 转染细胞后, ELISA 检测结果显示, ox-LDL 组 TNF- α 、MCP-1、IL-10 的分泌是对照组的 2.4 倍、2.9 倍、1.8 倍($P < 0.01$), IL-12 的分泌较对照组下降了 34.2% ($P < 0.01$); siRNA+ox-LDL 组 TNF- α 、MCP-1、IL-10 的分泌较 ox-LDL 组分别下降了 37.4%、45.3%、27.4% ($P < 0.01$), IL-12 的分泌增加了 31.4% ($P < 0.05$)。流式细胞术和实时荧光定量 PCR 结果显示, ox-LDL 组 CD86、CD80 和 iNOS mRNA 的表达分别是对照组的 14.2 倍、33.8 倍和 4.5 倍, CD163 和 Arg-1 mRNA 的表达较对照组分别下降了 33.4% 和 43.0% ($P < 0.05$); siRNA+ox-LDL 组 CD86、CD80 和 iNOS mRNA 的表达较 ox-LDL 组分别下降了 27.6%、29.3% 和 34.3%, CD163 和 Arg-1 mRNA 的表达分别升高了 30.3% 和 38.6% ($P < 0.05$)。[结论] 巨噬细胞中 RIP2 能被 ox-LDL 以剂量和时间依赖的方式诱导表达。RIP2 基因沉默后可以抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞 M1 型转化。[关键词] 受体相互作用蛋白 2; 氧化型低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞 [中图分类号] R5; R363 [文献标识码] A

Role of RIP2 in macrophage inflammatory activation and polarization transformation

HOU Liang¹, DING Yanchun²

1. Department of Cardiology, General Hospital of the Yangtze River Shipping, Wuhan, Hubei 430000, China; 2. Department 2 of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116000, China

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of receptor interacting protein 2 (RIP2) on macrophage inflammatory activation and polarity transformation, and to explore the mechanism of RIP2 in macrophage phagocytosis of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** THP-1 derived macrophages were treated with different doses (10, 25 and 50 mg/L) of ox-LDL for 24 hours, and treated with 50 mg/L ox-LDL for 8, 16 and 24 hours. Real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of RIP2 mRNA and protein in THP-1 derived macrophages, and ELISA was used to detect the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1).

[收稿日期] 2024-03-28

[修回日期] 2024-06-03

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(2019023015); 武汉市卫生健康委员会项目(WX20Q10)

[作者简介] 侯亮, 主治医师, 主要从事心血管病的基础与临床研究, E-mail: drhou@foxmail.com. 通信作者丁彦春, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病研究, E-mail: yanchunding@aliyun.com.

Three pairs of RIP2 siRNA were designed, transfecting them into cells using hiperfict transfection reagent, real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of RIP2 mRNA and protein in THP-1 derived macrophages after transfection, in order to screen for the optimal siRNA transfection concentration and the most effective pair of siRNA. After transfection with the most effective RIP2 siRNA, cells were treated with 50 mg/L ox-LDL for 24 hours, ELISA was used to detect the secretion of TNF- α , MCP-1, interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12), real-time quantitative PCR was used to detect the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase-1 (Arg-1), flow cytometry was used to detect the expression of cell surface antigens CD86, CD80 and CD163. **Results** Ox-LDL induced the expression of RIP2 in macrophages in a dose-dependent and time-dependent manner. With the increase of ox-LDL treatment dose and time, the expression of RIP2 mRNA and protein increased. Among them, the expression of RIP2 protein in the 50 mg/L group was 7.6 times of the control group, and the expression of RIP2 protein in the 24 h group was 17.9 times of the control group ($P<0.001$). The ELISA results showed that with the increase of ox-LDL treatment dose and time, the secretion of TNF- α and MCP-1 increased ($P<0.05$). After transfection of RIP2 siRNA into cells, ELISA results showed that the secretion of TNF- α , MCP-1 and IL-10 in the ox-LDL group was 2.4 times, 2.9 times and 1.8 times of the control group ($P<0.01$), and the secretion of IL-12 decreased by 34.2% compared to the control group ($P<0.01$); the secretion of TNF- α , MCP-1 and IL-10 in the siRNA+ox-LDL group decreased by 37.4%, 45.3% and 27.4%, respectively, compared to the ox-LDL group ($P<0.01$), while the secretion of IL-12 increased by 31.4% ($P<0.05$). The results of flow cytometry and real-time quantitative PCR showed that the expression of CD86, CD80 and iNOS mRNA in the ox-LDL group was 14.2 times, 33.8 times and 4.5 times of those of the control group, respectively, while the expression of CD163 and Arg-1 mRNA decreased by 33.4% and 43.0%, respectively, compared with the control group ($P<0.05$); the expression of CD86, CD80 and iNOS mRNA in the siRNA+ox-LDL group decreased by 27.6%, 29.3% and 34.3%, respectively, compared to the ox-LDL group, while the expression of CD163 and Arg-1 mRNA increased by 30.3% and 38.6%, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** RIP2 expression in macrophages can be induced by ox-LDL in a dose-dependent and time-dependent manner. RIP2 gene silencing can inhibit ox-LDL induced M1 macrophage transformation.

[KEY WORDS] receptor interacting protein 2; oxidized low density lipoprotein; atherosclerosis; macrophage

许多研究已证明,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性病变,炎症贯穿动脉粥样硬化全过程。虽然原因尚不明确,但普遍认为动脉粥样硬化的炎症反应源自人体免疫系统^[1]。在动脉粥样硬化的形成和发展中,巨噬细胞的炎性激活至关重要。单核细胞分化为巨噬细胞,摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)颗粒形成泡沫细胞。激活的巨噬细胞可产生多种炎症因子、趋化因子及多种酶的激活剂和抑制剂,连接先天和获得免疫,调节脂质积累,参与血管重塑及斑块形成与发展^[2]。动脉粥样硬化斑块微环境中的脂质、细胞因子、趋化因子和其他分子调控巨噬细胞表型,促使巨噬细胞向促动脉粥样硬化或抗动脉粥样硬化表型转变,巨噬细胞的极性转化成为一个热点^[3]。

受体相互作用蛋白 2(receptor interacting protein 2, RIP2)含有 540 个氨基酸,在人类心脏、脾脏、胎盘、肺和外周血白细胞中高表达。核苷酸结合寡聚结构域样受体(nucleotide-binding oligomerization domain like receptor, NLR)是固有免疫反应模式识别受体的主要成员,其中核苷酸结合寡聚结构域(nucleotide-

binding oligomerization domain, NOD)1 和 2 是 NLR 家族的两大主要成员。NLR 与配体结合后可激活下游的 RIP2,通过核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)途径或丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径诱导细胞因子、趋化因子等的表达,引发炎症反应^[4]。研究指出,在肺炎衣原体感染的内皮细胞中, NOD1、NOD2、RIP2 和 NF- κ B 的表达上调,同时抑制白细胞介素 8(interleukin-8, IL-8)的释放,提示 RIP2 可能参与与炎症相关的动脉粥样硬化^[5]。本研究团队早期研究发现, RIP2 参与大鼠颈动脉损伤后的再狭窄过程及血管平滑肌细胞的增殖和表型变化,表明 RIP2 可能参与动脉粥样硬化的形成,但具体机制尚待阐明。

本研究使用 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞,观察 RIP2 的表达变化;随后沉默 RIP2 基因,观察 RIP2 siRNA 对 ox-LDL 处理的 THP-1 源性巨噬细胞肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)等炎症因子分泌及极性转化的影响,旨在探讨 RIP2 在巨噬细胞炎性活化和极性转化中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

THP-1 细胞购于中国科学院细胞库; RPMI 1640 培养基购于 HyClone 公司; 胎牛血清购于北京全式金生物有限公司; ox-LDL 购于广州亿源生物科技有限公司; 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司; hiperfect 转染试剂购于 Qiagen 生物公司; 佛波酯购于 Sigma 公司; 兔抗人 RIP2 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology Inc 生物公司; 兔抗人 β -actin 单克隆抗体购于 Proteintech 生物公司; 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于凯基生物科技有限公司; 人 MCP-1、TNF- α 、IL-10、IL-12 ELISA 试剂盒购于优尔生生物科技有限公司; 流式细胞抗体 CD86-FITC、CD163-FITC、CD206-PE 购于美国 BD 生物公司; 其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 细胞培养及 THP-1 细胞的诱导分化

细胞置于组织培养瓶或培养皿中, 以 37 °C、含 5% CO₂ 的空气条件下培养。THP-1 细胞悬浮在含有 10% 胎牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养基中, 呈单个圆形悬浮细胞。细胞经过 2~3 天后进行 1 次继代, 经过 3~4 次传代后, 以 1×10⁶/mL 的密度分装到六孔板中, 并用 160 nmol/L 佛波酯处理。24 h 后, 细胞附着在培养皿上, 形状变得不规则或梭形, 伸出伪足, 最终分化为巨噬细胞。THP-1 源性巨噬细胞经 10、25 及 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h, 或 50 mg/L ox-LDL 处理 8、16 及 24 h。

1.3 THP-1 源性巨噬细胞中 RIP2、诱导型一氧化氮合酶及精氨酸酶 1 mRNA 的表达检测

用 Trizol 试剂提取各组样本总 RNA, 反转录为 cDNA, 并进行 PCR 循环, 引物由 Invitrogen 公司合成。引物序列: RIP2 正义链为 5'-GCTGCATCACTGTCCTGGAA-3', 反义链为 5'-CCAGGCTGCAGACGTTCTG-3'; 诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 正义链为 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3', 反义链为 5'-GGAGTAGCCTGTGTCACCTGGAA-3'; 精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 正义链为 5'-TGCATATCTGCCAAAGACATCG-3', 反义链为 5'-TCCATCACCTTGCCAAATCCC-3'。反应体系为 20 μ L, 其中 SYBR Premix 10 μ L, PCR 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, PCR 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, ROX 0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 灭菌蒸馏水 5.6 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 3 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 以 β -actin 为内

参对照, 采用比较循环阈值法分析样本中各基因 mRNA 的相对表达。

1.4 THP-1 源性巨噬细胞中 RIP2 蛋白的表达检测

收集细胞, 进行蛋白质裂解, 加等体积 SDS 缓冲液; 样品煮沸后, 以 220 mA 的恒定电流在聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离 100 min; 将蛋白质转移至 PVDF 膜上; 孵育一抗 4 °C 过夜, 室温孵育二抗 2 h, 膜经 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 检测系统检测, 结果用 Image J 分析软件进行灰度扫描, 测定吸光度值, 以目的蛋白与 β -actin 的吸光度值的比值作为目的蛋白表达水平。

1.5 RIP2 siRNA 的设计制备及细胞转染

依据 RIP2 mRNA 序列, 设计 3 对 RIP2 siRNA。RIP2 siRNA-1 正义链: 5'-GAGAACAUAUGAAGAGAUAdTdT-3', 反义链: 3'-dTdT CUCUUGUAAACUUCUCUUAU-5'; RIP2 siRNA-2 正义链: 5'-CAAUAUGACUCCUCCUUA dTdT-3', 反义链: 3'-dTdT GUUAUACUGAGGAGGAAU-5'; RIP2 siRNA-3 正义链: 5'-GAAAGAGGACUAUGAACUU dTdT-3', 反义链: 3'-dTdT CUUUCUCCUGAUACUUGAA-5'。阴性对照 siRNA 由公司提供。以 30、50 及 80 nmol/L siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞, 荧光显微镜用于初步观察转染效率。用实时荧光定量 PCR 检测各组 RIP2 mRNA 的表达, 从而筛选出转染效果最佳的 siRNA 浓度。用 Western blot 检测各组 RIP2 蛋白的表达, 筛选出转染效果最佳的 siRNA。

1.6 ELISA 检测 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1、IL-10 及 IL-12 的分泌

收集样品上清液, -80 °C 保存待用。将标准品在临用前 15 min 倍比稀释。在试剂盒提供的酶标板中设立空白孔、标准品孔、待测样品孔, 加标准品 100 μ L, 待测样品 100 μ L, 酶标板覆膜, 37 °C 温育 2 h; 弃液、甩干, 每孔加入 100 μ L 检测溶液 A, 37 °C 温育 1 h; 弃液, 洗板 3 次, 每孔加入 100 μ L 检测溶液 B, 37 °C 温育 30 min; 弃液, 甩干, 洗板 5 次, 每孔加入底物溶液 90 μ L, 37 °C 避光显色; 每孔加入终止液 50 μ L, 终止反应。在确保酶标板底部无水滴及气泡后, 立即用酶标板在 450 nm 波长下读 OD 值。算出标准曲线回归方程, 得出 TNF- α 、MCP-1、IL-10 及 IL-12 的浓度。

1.7 流式细胞术检测 THP-1 源性巨噬细胞表面抗原 CD86、CD80 及 CD163 的表达

RIP2 siRNA 转染细胞后, 50 mg/L ox-LDL 处理

24 h,胰蛋白酶消化细胞后,细胞计数,每管 1×10^6 个细胞;离心,弃上清,PBS 清洗 2 遍,100 μ L PBS 重悬细胞;再分别加入 20 μ L 荧光素标记的 CD86、CD80、CD163 单克隆抗体,室温避光孵育 15 min,振荡混匀,室温避光孵育 10 min;2 500 r/min 离心 3 min 后,弃上清,加入 0.5 mL PBS 混匀,重悬细胞,采用流式细胞仪检测,用 Flow J 软件分析结果,以荧光阳性细胞的百分比作为观察指标。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 RIP2 表达的影响

以不同剂量(10、25 及 50 mg/L)的 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h,检测结果显示,ox-LDL 能以剂量依赖的方式诱导巨噬细胞中 RIP2 的表达,其中 50 mg/L 组 RIP2 蛋白的表达是对照组的 7.6 倍($P < 0.001$)。用 50 mg/L ox-LDL 分别处理 THP-1 源性巨噬细胞不同时间(8、16 及 24 h),检测结果显示,ox-LDL 能以时间依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞中 RIP2 的表达,其中 24 h 组 RIP2 蛋白的表达是对照组的 17.9 倍($P < 0.001$; 图 1)。

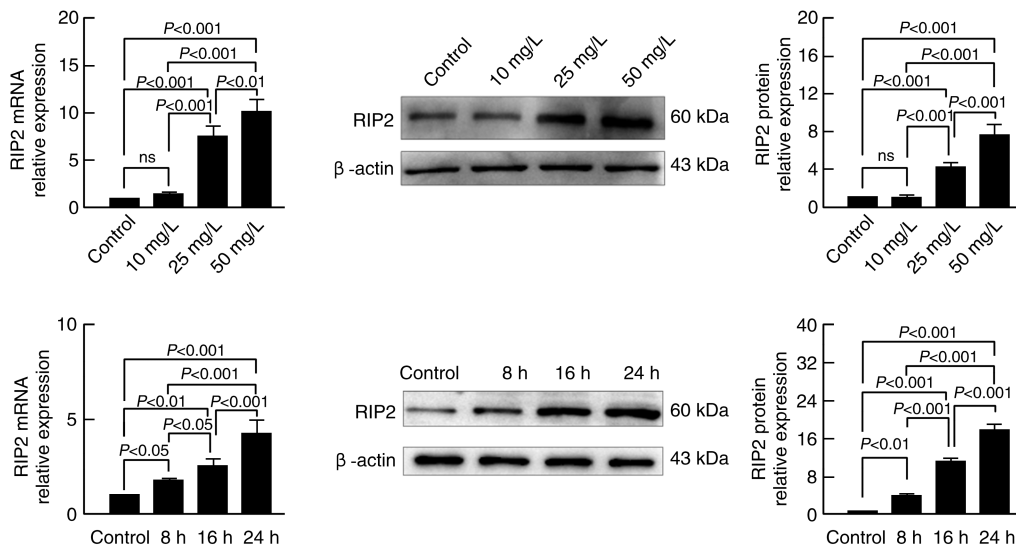


图 1. ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 RIP2 mRNA 和蛋白表达的影响($n = 3$)

Figure 1. The effect of ox-LDL on RIP2 mRNA and protein expression in THP-1 derived macrophages($n = 3$)

2.2 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1 分泌的影响

ox-LDL 以不同剂量和不同时间处理 THP-1 源性巨噬细胞,ELISA 检测结果显示,随着 ox-LDL 处

理浓度的增加,TNF- α 、MCP-1 的分泌增加,以 50 mg/L 组分分泌量最高;随着 ox-LDL 处理时间的增加,TNF- α 、MCP-1 的分泌增加,以 24 h 组分分泌量最高(表 1 和表 2)。

表 1. 不同剂量的 ox-LDL 处理对 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1 分泌的影响($n = 3$)

Table 1. The effect of different doses of ox-LDL treatment on the secretion of TNF- α and

MCP-1 in THP-1 derived macrophages($n = 3$)

单位:ng/L

指标	对照组	10 mg/L ox-LDL	25 mg/L ox-LDL	50 mg/L ox-LDL
TNF- α	18.51 \pm 0.77	24.7 \pm 2.47 ^a	30.64 \pm 1.96 ^{ab}	71.53 \pm 2.35 ^{acd}
MCP-1	49.11 \pm 4.03	108.54 \pm 4.96 ^a	127.91 \pm 4.13 ^{ac}	163.4 \pm 7.22 ^{acd}

注:a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 10 mg/L ox-LDL 组比较;d 为 $P < 0.01$,与 25 mg/L ox-LDL 组比较。

表 2. 50 mg/L ox-LDL 处理不同时间对 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1 分泌的影响 ($n=3$)
 Table 2. The effect of 50 mg/L ox-LDL treatment at different times on the secretion of TNF- α and MCP-1 in THP-1 derived macrophages ($n=3$)

指标	对照组	8 h	16 h	24 h
TNF- α	19.51 \pm 0.89	27.01 \pm 0.95 ^a	44.71 \pm 2.06 ^{ab}	71.53 \pm 2.35 ^{abc}
MCP-1	50.01 \pm 3.11	74.51 \pm 3.93 ^a	77.76 \pm 7.24 ^a	163.4 \pm 7.22 ^{abc}

注:a 为 $P<0.01$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 8 h 组比较; c 为 $P<0.01$, 与 16 h 组比较。

2.3 RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 RIP2 mRNA 和蛋白表达的影响

在荧光显微镜下, 大部分细胞发出红色荧光, 表明大部分细胞成功转入 siRNA, 初步判定转染效果良好 (图 2)。以不同剂量 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞, 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 与对照组相比, 50 nmol/L 的 siRNA 基因沉默效应最明显, 下降了 88.2% ($P<0.001$), 故选取 50 nmol/L 作为实验浓度。3 对 siRNA 转染后, Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, 3 对 siRNA 均可以在蛋白水平抑制 RIP2 的表达, 其中 RIP2 siRNA-3 抑制效果最好, 较对照组下降了 83% ($P<0.001$), 故选

取 RIP2 siRNA-3 作为实验 siRNA (图 3)。

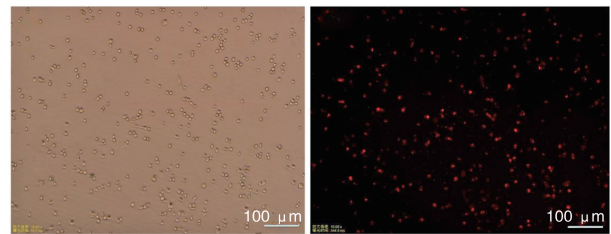


图 2. 荧光显微镜观察 RIP2 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞情况

左图为光学显微镜图片, 右图为荧光显微镜图片。

Figure 2. Fluorescence microscope observation of RIP2 siRNA transfection into THP-1 derived macrophages

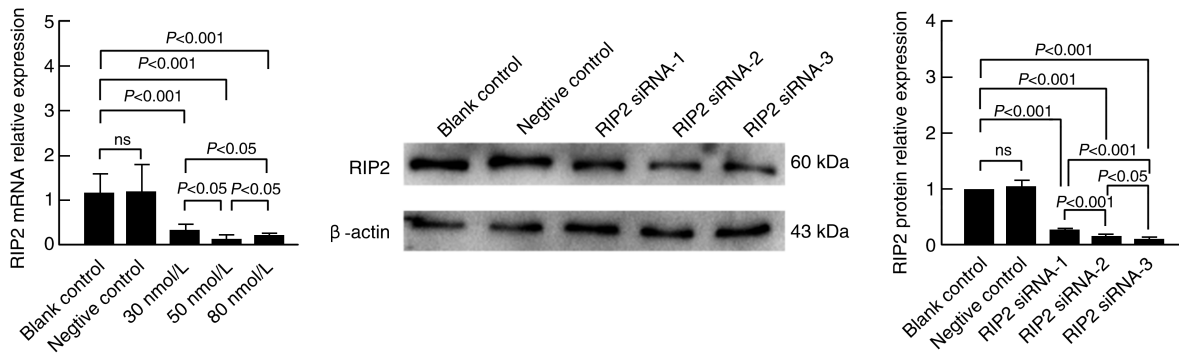


图 3. RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 RIP2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n=3$)

Figure 3. The effect of RIP2 siRNA on RIP2 mRNA and protein expression in THP-1 derived macrophages ($n=3$)

2.4 RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1、IL-10 及 IL-12 分泌的影响

与对照组相比, ox-LDL 组 TNF- α 、MCP-1、IL-10 的分泌显著增加, IL-12 的分泌显著减少 ($P<0.01$)。与 ox-LDL 组相比, siRNA+ox-LDL 组 TNF- α 、MCP-1、IL-10 的分泌显著减少, IL-12 的分泌显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$; 表 3)。

2.5 RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 CD86、CD80、CD163、iNOS 及 Arg-1 表达的影响

流式细胞仪检测结果显示, ox-LDL 组 CD86 的表达是对照组的 14.2 倍, CD80 的表达是对照组的

表 3. RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 TNF- α 、MCP-1、IL-10 及 IL-12 分泌的影响 ($n=3$)

Table 3. The effect of RIP2 siRNA on TNF- α , MCP-1, IL-10 and IL-12 secretion in THP-1 derived macrophages ($n=3$)

指标	对照组	ox-LDL 组	siRNA+ox-LDL 组
TNF- α	12.77 \pm 0.67	30.68 \pm 1.31 ^a	19.31 \pm 1.65 ^c
MCP-1	17.29 \pm 2.34	50.77 \pm 5.20 ^a	27.74 \pm 1.17 ^c
IL-10	40.14 \pm 1.06	74.15 \pm 2.56 ^a	53.84 \pm 2.78 ^c
IL-12	28.16 \pm 0.89	18.53 \pm 1.34 ^a	24.36 \pm 2.29 ^b

注: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。

33.8 倍,CD163 的表达较对照组下降了 33.4% ($P < 0.001$);与 ox-LDL 组相比,siRNA+ox-LDL 组 CD86 的表达下降了 27.6%,CD80 的表达下降了 29.3%,CD163 表达升高了 30.3% ($P < 0.01$)。实时荧光定量 PCR 结果显示,ox-LDL 组 iNOS mRNA 的表达是

对照组的 4.5 倍,Arg-1 mRNA 的表达较对照组下降了 43.0%;与 ox-LDL 组相比,siRNA+ox-LDL 组 iNOS mRNA 的表达下降了 34.3%,Arg-1 mRNA 的表达增加了 38.6% ($P < 0.05$;图 4)。

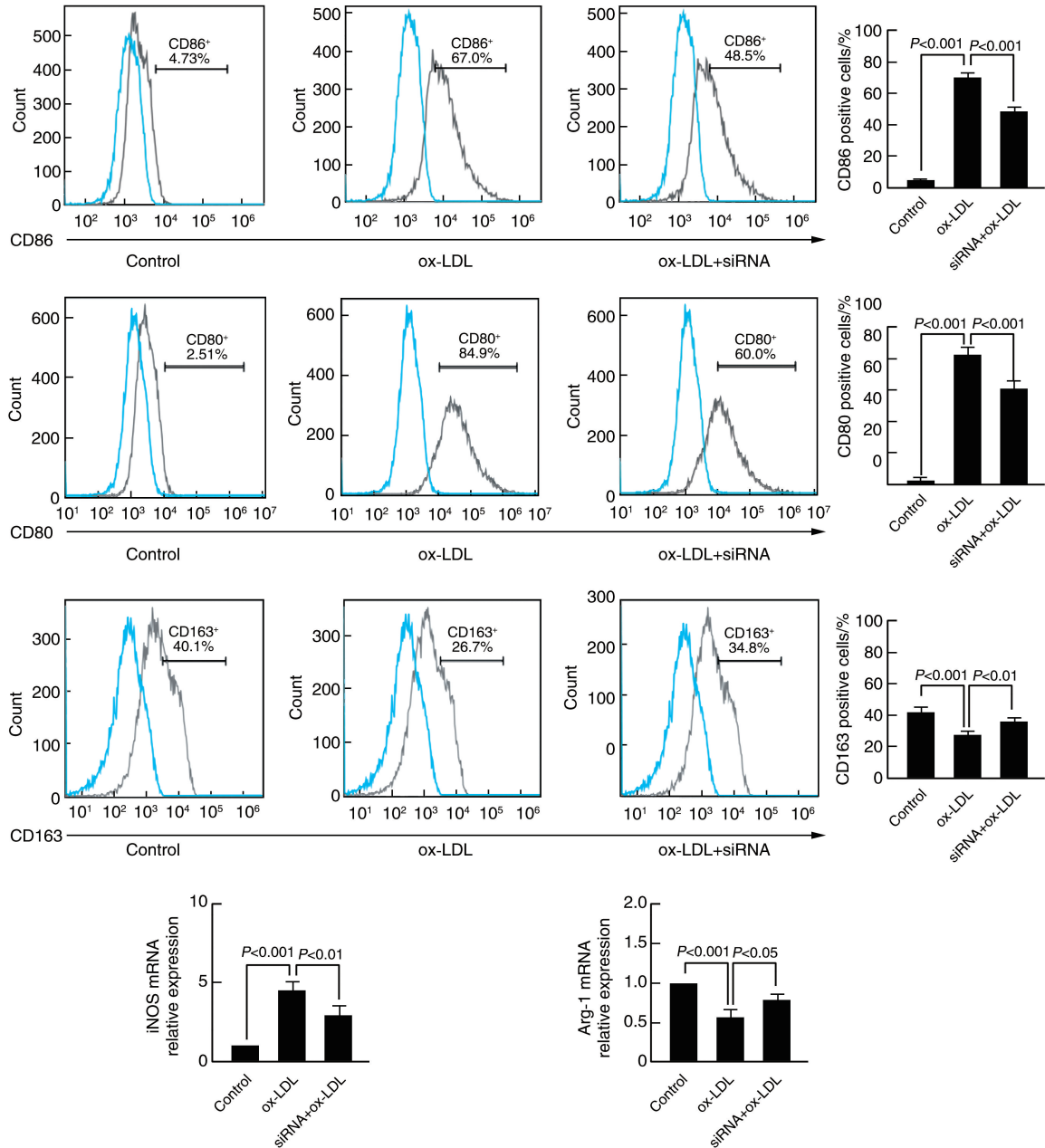


图 4. RIP2 siRNA 对 THP-1 源性巨噬细胞 CD86、CD80、CD163、iNOS 及 Arg-1 表达的影响 ($n=3$)
 Figure 4. The effect of RIP2 siRNA on the expression of CD86, CD80, CD163, iNOS and Arg-1 in THP-1 derived macrophages ($n=3$)

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应性病变,且

关于先天免疫参与动脉粥样硬化形成和发展已得到普遍认同^[6],ox-LDL 作为与动脉粥样硬化相关的抗原,是导致动脉粥样硬化的重要因素。巨噬细胞

摄取 ox-LDL 形成泡沫细胞并释放炎症因子、趋化因子以及酶的激活剂/抑制剂,被认为是动脉粥样硬化发生和进展的关键因素^[7]。RIP2 作为固有免疫重要的调节因子,在免疫监测和细胞防御中发挥着重要作用,在动脉粥样硬化免疫机制研究中已有提及。本研究发现,ox-LDL 能够以剂量依赖和时间依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞 RIP2 mRNA 和蛋白的表达,ox-LDL 还能够以剂量和时间依赖的方式引起巨噬细胞培养物上清液中 TNF- α 、MCP-1 的分泌增加;将 RIP2 基因沉默后,TNF- α 、MCP-1 的分泌下降。TNF- α 能够促进血管内皮细胞和平滑肌细胞分泌黏附因子,促进成纤维细胞、巨噬细胞分泌 IL-1、IL-6 等,广泛参与炎症反应以及平滑肌细胞的迁移增殖,在动脉粥样硬化中发挥着关键的作用^[8]。MCP-1 是趋化细胞因子 β 家族中的一员,目前研究表明 MCP-1 可以由内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞分泌,这些细胞都和动脉粥样硬化的发生、发展有着广泛的联系^[9]。这些结果表明 RIP2 参与了巨噬细胞的炎症激活过程。

关于 RIP2 在动脉粥样硬化发生和发展过程中的作用已有报道。Moreno 等^[10]的研究发现,当血管平滑肌细胞感染大肠杆菌时,会激活 NOD1 信号通路,从而增加一氧化氮合酶 2 的表达;此外,RIP2 抑制剂吡唑啉可以抑制 NOD1 介导的炎症反应,表明 RIP2 在血管炎症中扮演重要角色。González-Ramos 等^[11]发现,在载脂蛋白 E 敲除的小鼠中沉默 NOD1 基因能减轻动脉粥样硬化,其机制是内皮细胞中的 NOD1 通过 RIP2/NF- κ B 通路上调血管细胞黏附因子 1 的表达,增强髓系细胞对血管的黏附作用,促进动脉粥样硬化斑块的形成。Yan 等^[12]研究发现,小鼠接受 RIP2 敲除供体的骨髓移植后,尽管其局部和全身的炎症反应被抑制,但动脉粥样硬化病变增加,其机制是小鼠巨噬细胞中 Toll 样受体 4 依赖的脂质摄取增加,该研究提示巨噬细胞在动脉粥样硬化的整个过程中表现出高度的异质性,进一步证明 RIP2 在巨噬细胞极性转化中的作用。

巨噬细胞的极性转化是目前研究的热点,研究者们效仿辅助性 T 细胞的表型分类方式将巨噬细胞分为两大类:促进炎症反应的经典活化型(M1 型)和抗炎的选择性活化型(M2 型)^[13]。M1 型巨噬细胞主要发挥促炎作用,分泌 TNF- α 、IL-6、MCP-1 及 IL-10 等炎症因子^[14]。在动脉粥样硬化炎症进展过程中,M1 型巨噬细胞占主导,表达高水平的 CD86、CD80、iNOS 等因子,促进动脉粥样硬化的发展,CD86、CD80、iNOS 目前被认为是 M1 型巨噬细

胞的标志物^[15]。相反,在炎症减退阶段,M2 型巨噬细胞占主导地位,表达高水平的甘露糖受体 CD163、Arg-1 等细胞因子,并可以分泌 IL-12,发挥抗炎作用,这些细胞因子也被认为是 M2 型巨噬细胞的标志物^[16]。本研究发现,ox-LDL 处理后 CD163、Arg-1、IL-12 的表达减少,CD86、CD80、iNOS、IL-10 的表达增加,提示 ox-LDL 可以促进巨噬细胞向 M1 型转化。Luo 等^[17]同样发现 ox-LDL 可以促进 M1 型巨噬细胞形成,并释放大量的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎细胞因子,从而加速斑块的发展和易损性。Wu 等^[18]的研究也得出类似结果。Song 等^[19]的体外和体内研究证实,miR-30a-5p 的过表达减少 M1/M2 型巨噬细胞比例,从而降低血浆中的 IL-6 和 TNF- α 等促炎因子水平。Bosmans 等^[20]的研究发现,靶向敲除 CD40 导致与 M2 型巨噬细胞标志物相关基因上调,进而减少与炎症相关基因的表达,与动脉粥样硬化斑块的严重程度和稳定性有关。本研究进一步观察了 RIP2 siRNA 对巨噬细胞表型标志物 CD86、CD80、CD163、iNOS、Arg-1 表达的影响以及对 IL-10、IL12 分泌的影响,结果显示 RIP2 基因沉默后抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞向 M1 型转化。这也表明 RIP2 可以调节巨噬细胞的极性转化,促进向 M1 型巨噬细胞转化,抑制向 M2 型巨噬细胞极化,从而抑制炎症并影响巨噬细胞活化。

综上,本研究证实了 RIP2 在巨噬细胞的炎症活化中起着重要作用。这一效果可能是通过改变巨噬细胞的极性转化实现的,并且这可能是 RIP2 在巨噬细胞吞噬 ox-LDL 过程中的关键机制。这为了解固有免疫反应在动脉粥样硬化中的作用提供了新的数据,也为未来预防动脉粥样硬化提供了新的线索。

[参考文献]

- [1] LUO M, ZHAO F, CHENG H, et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1352946.
- [2] 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.
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.
- [3] LIN P, JI H H, LI Y J, et al. Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 679797.

- [4] CHEN L, CAO S Q, LIN Z M, et al. NOD-like receptors in autoimmune diseases[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(11): 1742-1756.
- [5] SHAO Y, SAREDY J, YANG W Y, et al. Vascular endothelial cells and innate immunity[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(6): e138-e152.
- [6] 李丹丹, 梅俊, 周庆兵, 等. 固有免疫介导的炎症反应在动脉粥样硬化发病机制中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(1): 71-76.
- LI D D, MEI J, ZHOU Q B, et al. Research progress of innate immune mediated inflammatory response in pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(1): 71-76.
- [7] MILLER Y I, TSIMIKAS S. Oxidation-specific epitopes as targets for biotheranostic applications in humans: biomarkers, molecular imaging and therapeutics [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24(5): 426-437.
- [8] TOKUYAMA M, MABUCHI T. New treatment addressing the pathogenesis of psoriasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7488.
- [9] GEORGAKIS M K, BERNHAGEN J, HEITMAN L H, et al. Targeting the CCL2-CCR2 axis for atheroprotection[J]. *Eur Heart J*, 2022, 43(19): 1799-1808.
- [10] MORENO L, MCMASTER S K, GATHERAL T, et al. Nucleotide oligomerization domain 1 is a dominant pathway for NOS2 induction in vascular smooth muscle cells: comparison with Toll-like receptor 4 responses in macrophages [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(8): 1997-2007.
- [11] GONZÁLEZ-RAMOS S, PAZ-GARCÍA M, RIUS C, et al. Endothelial NOD1 directs myeloid cell recruitment in atherosclerosis through VCAM-1[J]. *FASEB J*, 2019, 33(3): 3912-3921.
- [12] LEVIN M C, JIRHOLT P, WRAMSTEDT A, et al. RIP2 deficiency leads to increased atherosclerosis despite decreased inflammation [J]. *Circ Res*, 2011, 109(11): 1210-1218.
- [13] ZHANG Y, KONG X, LIANG L, et al. Regulation of vascular remodeling by immune microenvironment after the establishment of autologous arteriovenous fistula in ESRD patients[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1365422.
- [14] CHEN S, YANG J, WEI Y, et al. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 36-49.
- [15] CUI K, GAO X, WANG B, et al. Epsin nanotherapy regulates cholesterol transport to fortify atheroma regression [J]. *Circ Res*, 2023, 132(1): e22-e42.
- [16] BÄCK M, YURDAGUL A J R TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(7): 389-406.
- [17] LUO Y, LU S, GAO Y, et al. Araloside C attenuates atherosclerosis by modulating macrophage polarization via Sirt1-mediated autophagy [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(2): 1704-1724.
- [18] WU J, LIU T, XIE W, et al. Ox-LDL promotes M1-like polarization of macrophages through the miR-21-5p/SKP2/EP300 pathway[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(1): e23516.
- [19] SONG F, LI J Z, WU Y, et al. Ubiquitinated ligation protein NEDD4L participates in miR-30a-5p attenuated atherosclerosis by regulating macrophage polarization and lipid metabolism [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 1303-1317.
- [20] BOSMANS L A, VAN TIEL C M, AARTS S A B M, et al. Myeloid CD40 deficiency reduces atherosclerosis by impairing macrophages' transition into a pro-inflammatory state[J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(5): 1146-1160.
- (此文编辑 文玉珊)