

本文引用: 陈梦娇, 赵真旺, 王斯琦, 等. ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 抑制 P2X7R 介导的巨噬细胞焦亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(5): 402-411. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.05.005.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2025)33-05-0402-10

ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 抑制 P2X7R 介导的巨噬细胞焦亡

陈梦娇¹, 赵真旺², 王斯琦³, 吴剑锋⁴, 刘丹⁵, 邹瑾⁶, 张敏¹

1. 南华大学衡阳医学院心血管疾病研究所 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 生物信息与医学大数据教研室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖北文理学院医学部基础医学院, 湖北省襄阳市 441053;
3. 曲靖医学高等专科学校基础医学院生理学教研室, 云南省曲靖市 655100; 4. 南华大学附属第二医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001; 5. 广东省人民医院珠海医院(珠海市金湾中心医院) 医务部, 广东省珠海市 519041;
6. 南华大学附属第一医院心血管内科, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探讨载脂蛋白 A I (ApoA I) 和载脂蛋白 A I 结合蛋白 (AIBP) 对 THP-1 源性巨噬细胞焦亡的影响。**[方法]** 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒评估细胞膜完整性, Hoechst33342/PI 染色观察细胞膜通透性, ELISA 检测白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 18 (IL-18) 等炎症因子水平, Western blot 检测细胞焦亡相关蛋白核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3 (NLRP3)、焦孔素 D (GSDMD)、cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 的表达。**[结果]** 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 呈剂量依赖性上调 NLRP3、GSDMD-N、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达, 促进 IL-1 β 、IL-18 和 LDH 释放 (均 $P < 0.01$), 表明 ox-LDL 以剂量依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞发生焦亡。ApoA I 和 AIBP 共同处理巨噬细胞能显著下调 NLRP3、GSDMD-N、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达, 减少 IL-1 β 、IL-18 和 LDH 释放, 抑制 ox-LDL 诱导的细胞焦亡 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转染 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) siRNA 后, ApoA I 和 AIBP 共同处理对细胞焦亡相关蛋白表达和炎症因子分泌无显著影响 ($P > 0.05$)。ApoA I 和 AIBP 共同处理巨噬细胞能显著降低细胞膜上嘌呤能 2X7 受体 (P2X7R) 的表达, 抑制 P2X7R 介导的蛋白激酶 R (PKR) 磷酸化及 NLRP3 炎性小体组装 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。转染 P2X7R siRNA 后, ApoA I 和 AIBP 共同处理对细胞焦亡相关蛋白的表达和炎症因子分泌无显著影响 ($P > 0.05$)。**[结论]** ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 降低细胞膜上 P2X7R 的表达, 抑制 P2X7R/PKR/NLRP3 介导的巨噬细胞焦亡。

[关键词] 载脂蛋白 A I; 载脂蛋白 A I 结合蛋白; ATP 结合盒转运体 A1; 嘌呤能 2X7 受体; 细胞焦亡

[中图分类号] R363.2; R5

[文献标识码] A

ApoA I and AIBP inhibit P2X7R-mediated pyroptosis in macrophages through ABCA1

CHEN Mengjiao¹, ZHAO Zhenwang², WANG Siqi³, WU Jianfeng⁴, LIU Dan⁵, ZOU Jin⁶, ZHANG Min¹

1. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, Department of Bioinformatics and Medical Big Data, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. School of Basic Medicine, Health Science Center, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang, Hubei 441053, China; 3. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Qujing Medical College, Qujing, Yunan 655100, China; 4. Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 5. Medical Education Department, Guangdong Provincial People's Hospital, Zhuhai Hospital (Jinwan Central Hospital of Zhuhai), Zhuhai, Guangdong 519041, China; 6. Department of Cardiovascular Medicine, the First Affiliated Hospital of University of South

[收稿日期] 2024-12-13

[修回日期] 2025-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目 (82400542); 湖南省自然科学基金项目 (2024JJ5347); 湖南省教育厅优秀青年项目 (22B0415); 湖南省卫生健康委卫生科研项目 (W20243007); 湖北省自然科学基金青年基金项目 (2023AFB043); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2022J1522)

[作者简介] 陈梦娇, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: 2027266564@qq.com。通信作者邹瑾, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化防治, E-mail: 81003442@qq.com。通信作者张敏, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治基础, E-mail: mzhangusc@126.com。

China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of apolipoprotein A I (ApoA I) and apolipoprotein A I binding protein (AIBP) on THP-1-derived macrophage pyroptosis. **Methods** The lactate dehydrogenase (LDH) detection kit was used to evaluate cell membrane integrity, Hoechst33342/PI staining was used to observe cell membrane permeability, ELISA was used to detect the levels of inflammatory factors such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18), Western blot was used to detect the expression of pyroptosis-related protein nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), cleaved Caspase-1, IL-1 β and IL-18.

Results Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) upregulated the expression of NLRP3, GSDMD-N, cleaved Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in THP-1-derived macrophages in a concentration-dependent manner, and promoted the release of IL-1 β , IL-18 and LDH ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), indicating that ox-LDL induced pyroptosis in THP-1-derived macrophages in a concentration-dependent manner. Co-treatment of macrophages with ApoA I and AIBP significantly downregulated the expression of NLRP3, GSDMD-N, cleaved Caspase-1, IL-1 β and IL-18, reduced the release of IL-1 β , IL-18 and LDH, and inhibited ox-LDL induced pyroptosis ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) siRNA transfection, co-treatment with ApoA I and AIBP had no significant effect on the expression of pyroptosis-related proteins and secretion of inflammatory factors ($P > 0.05$). Co-treatment of macrophages with ApoA I and AIBP significantly reduced the expression of purinergic 2X7R receptor (P2X7R) on the cell membrane, inhibited P2X7R mediated protein kinase R (PKR) phosphorylation and NLRP3 inflammasome assembly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After P2X7R siRNA transfection, co-treatment with ApoA I and AIBP had no significant effect on the expression of pyroptosis-related proteins and secretion of inflammatory factors ($P > 0.05$). **Conclusion** ApoA I and AIBP reduce the expression of P2X7R on the cell membrane through ABCA1, inhibiting P2X7R/PKR/NLRP3 mediated macrophage pyroptosis.

[KEY WORDS] apolipoprotein A I; apolipoprotein A I binding protein; ATP-binding cassette transporter A1; purinergic 2X7 receptor; pyroptosis

心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 是全球范围内危害公共健康的一类重大疾病, 不仅能够显著降低患者的生活质量, 还加重家庭和社会的经济负担。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是引发 CVD 的病理学基础, 其发病机制极为复杂, 巨噬细胞在 As 的发生发展过程中发挥重要作用^[1]。研究显示, 来自血液循环的单核细胞可迁入血管内膜下转化为巨噬细胞, 摄入氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 进而形成泡沫细胞, 导致脂质在血管内皮下大量蓄积并引起炎症反应, 从而加剧 As 的发生发展^[2]。细胞焦亡是新近发现的一种细胞程序性死亡方式, 在 As 发生发展中的作用受到广泛关注, 但其具体机制尚未完全阐明。因此, 进一步研究巨噬细胞的焦亡及其潜在调控机制对 As 的防治具有重要意义。

细胞焦亡是指在炎症或感染等应激条件下, 激活核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体 3 (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3), 切割 pro-Caspase-1 产生成熟的 Caspase-1, 活化的 Caspase-1 切割焦孔素 D (gasdermin D, GSDMD), 在细胞膜上形成孔洞, 导致细胞胀大和破裂死

亡^[3]。同时, Caspase-1 也能切割促炎因子前体白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18) 并释放到胞外, 引发炎症反应, 促进 As 的发生发展^[4-5]。因此, 研究 NLRP3 激活及其介导的巨噬细胞焦亡机制对于 As 防治具有重要意义。

载脂蛋白 AI 结合蛋白 (apolipoprotein AI binding protein, AIBP) 是一种能与载脂蛋白 AI (apolipoprotein AI, ApoAI) 结合的分泌蛋白。ApoAI 和 AIBP 共同作用可以上调 ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 表达, 调控膜蛋白的分布, 促进胆固醇流出, 增加胆固醇逆向转运, 发挥抗 As 作用^[5]。嘌呤能 2X7 受体 (purinergic 2X7 receptor, P2X7R) 是一种膜蛋白, 与 NLRP3 炎性小体激活、细胞因子和趋化因子释放、转录因子激活和细胞死亡等密切相关。蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 作为 P2X7R 的下游效应分子, 其磷酸化激活对于调控细胞病毒感染、凋亡及炎症反应至关重要^[6]。因此, 本研究通过构建脂质蓄积的巨噬细胞模型, 探究 ApoA I 和 AIBP 共同作用对 P2X7R 在细胞膜上的表达、NLRP3 介导的巨噬细胞焦亡的影响及其潜在机制, 以期 As 的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

Nano Drop 超微量紫外分光光度计和荧光显微镜 (Thermo Fisher Scientific); iMark 酶标仪 (BIO-RAD); 全自动化学发光成像系统 (上海天能生命科学有限公司)。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒、MTT 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒、含 Hoechst 33342 和 PI 的抗荧光淬灭封片液、IL-1 β 和 IL-18 ELISA 试剂盒 (碧云天); ApoA I (PeproTech); AIBP (TargetMol); ABCA1、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 、IL-18、p-PKR、PKR、NLRP3 及 P2X7R 一抗 (Abcam); Caspase-1 和 cleaved Caspase-1 一抗 (Zenbio); 二抗 (Abways)。

1.2 细胞处理

将处于对数生长期的 THP-1 细胞置于含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养

基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。随后,使用 100 μ g/L 佛波酯处理 24 h,诱导其分化为巨噬细胞。接着,加入 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h,诱导细胞荷脂。最后,采用含有 25 mg/L ApoA I 和 0.2 mg/L AIBP 的培养基继续培养 24 h。

1.3 MTT 检测细胞活性

取对数生长期细胞,接种于 96 孔板中,分为 0、25、50、75 和 100 mg/L ox-LDL 组。每孔加入 20 μ L MTT (5 g/L) 溶液孵育 4 h,弃去细胞培养液,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷,用酶标仪检测 490 nm 处吸光度值。

1.4 shRNA 转染

shRNA 引物由金斯瑞生物科技股份有限公司合成 (表 1)。在 6 孔板内,按 1:1 比例混合核酸与转染试剂,吹打 10~15 次后,室温孵育 10~15 min 制备复合物,确保管壁无残留。加入复合物至 6 孔板,混匀后置于 CO₂ 培养箱中继续培养。

表 1. 靶基因的 shRNA 序列

Table 1. The shRNA sequences of target genes

引物名称	引物序列
shABCA1	正向:5'-CCGGCCTCCGAGTCAAGAAGTTAATCTCGAGATTAACCTTCTTGACTCGGAGGTTTTTG-3' 负向:5'-AATTCAAAAACCTCCGAGTCAAGAAGTTAATCTCGAGATTAACCTTCTTGACTCGGAGG-3'
shP2X7R	正向:5'-CCGGGCATGAATTATGGCACCATTACTCGAGTAATGGTGCCATAATTCATGCTTTTTG-3' 负向:5'-AATTCAAAAAGCATGAATTATGGCACCATTACTCGAGTAATGGTGCCATAATTCATGC-3'
shPKR	正向:5'-CCGGTGCACCTAACACATCTGAAATCTCGAGATTTTCAGATGTGTTAGGTTCGATTTTTG-3' 负向:5'-AATTCAAAAATCGACCTAACACATCTGAAATCTCGAGATTTTCAGATGTGTTAGGTTCGA-3'

1.5 Western blot 检测蛋白表达

细胞处理后,用 RIPA 和 PMSF 提取细胞蛋白质,用 Bradford 法测定总蛋白浓度。使用 SDS-PAGE 对蛋白样品进行分离,每个泳道上样 30 μ g 蛋白质。根据不同的蛋白分子量采用不同的恒定电流将分离的蛋白样品转移至 0.45 μ m PVDF 膜上。随后,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 4~6 h,再用一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,用二抗室温孵育 2 h,然后再用全自动化学发光图像分析系统显影,并对蛋白条带进行灰度值统计分析。

1.6 LDH 释放实验

将细胞接种于 96 孔板中,加入 LDH 检测试剂,按照试剂盒说明进行孵育。孵育完成后,使用酶标仪在 490 nm 处检测各孔吸光度值。最后计算 LDH 释放率以评估细胞损伤。

1.7 ELISA 检测

使用无菌管收集细胞培养的上清液,3 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液至另一新的 EP 管中。分别将样品或不同剂量标准品按照 100 μ L/孔加入相应孔中,封膜孵育 2 h。洗板 5 次后,加抗体孵育 60 min,再洗板 5 次,加链霉抗生物素蛋白孵育 20 min。加 TMB 显色 20 min,最后加入终止液 50 μ L/孔,混匀后立即使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.8 Hoechst33342/PI 染色

实验结束后,去除上清液。滴一滴抗荧光淬灭封片液 (含 Hoechst33342 和 PI) 试剂于孔板中,让细胞接触封片液,尽量避免气泡,随后在荧光显微镜下观察细胞样品。

1.9 油红 O 染色

将细胞固定后,用 60% 异丙醇预处理,再加入油红 O 工作液染色 5~10 min,再用 60% 异丙醇洗去多余染料。封片后,直接在显微镜下观察,细胞内中性脂肪呈深橙红色。

1.10 统计学分析

使用 Image J 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件进行绘图和统计分析。实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 以剂量依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞焦亡

MTT 检测结果显示,随着 ox-LDL 剂量的增加,细胞活力显著降低 ($P < 0.05$),表明 ox-LDL 以剂量依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞死亡。Western blot 检测结果显示,当 ox-LDL 的处理剂量为 50 mg/L 时,细胞焦亡标志蛋白 NLRP3、GSDMD-N、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。细胞培养上清液中成熟的 IL-1 β 、

IL-18 和 LDH 的释放显著增加,Hoechst33342/PI 染色双阳性细胞比例明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 1 和图 2)。综上,50 mg/L ox-LDL 可显著诱导 THP-1 源性巨噬细胞焦亡,因此采用此剂量进行后续实验。

2.2 ApoA I 和 AIBP 抑制 ox-LDL 诱导的细胞焦亡

用 ApoA I、AIBP 及 ApoA I+AIBP 处理 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞,结果显示,与对照组相比,ApoA I 组 NLRP3、cleaved Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 表达降低,细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-18 分泌量和 LDH 释放降低,Hoechst33342/PI 双染色显示死亡的细胞减少,油红 O 染色显示细胞内脂滴减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示 ApoA I 能够抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡和脂质蓄积。单独使用 AIBP 处理后,上述指标均无显著改变 ($P > 0.05$)。与 ApoA I 组相比,ApoA I+AIBP 组 NLRP3、GSDMD-N、cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著抑制了巨噬细胞焦亡相关蛋白表达和脂质蓄积(图 3 和图 4)。以上结果表明,ApoA I 与 AIBP 共同处理能更显著抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡。

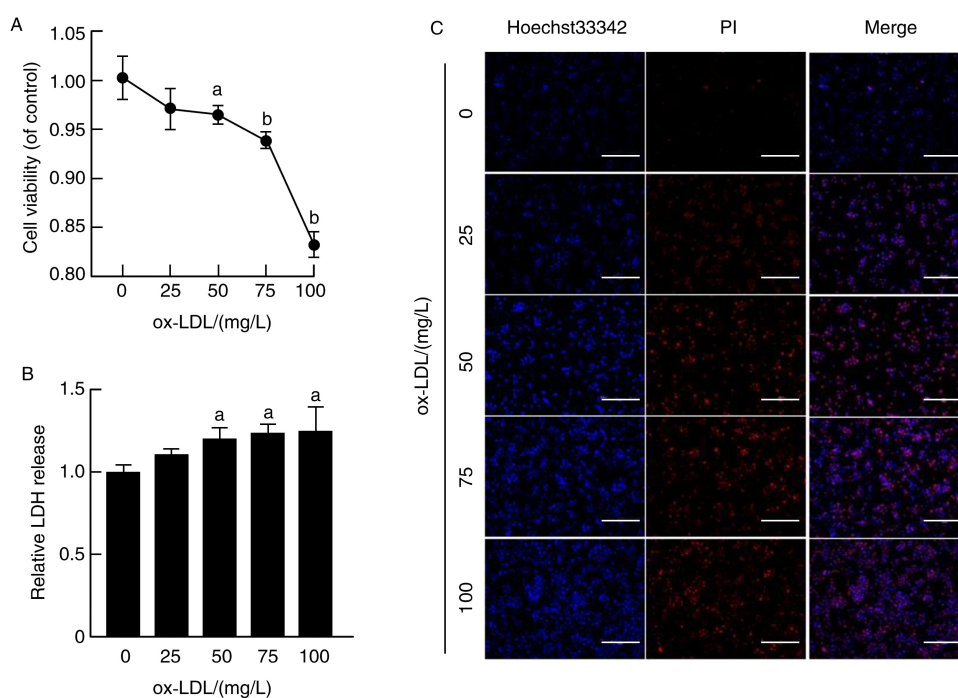


图 1. 不同剂量 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞死亡的影响

A 为不同剂量 ox-LDL 对细胞活力的影响,B 为不同剂量 ox-LDL 对细胞培养上清液中 LDH 释放的影响,C 为不同剂量 ox-LDL 对细胞 Hoechst33342/PI 染色的影响。Bar=150 μ m。a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effect of different doses of ox-LDL on THP-1-derived macrophage death

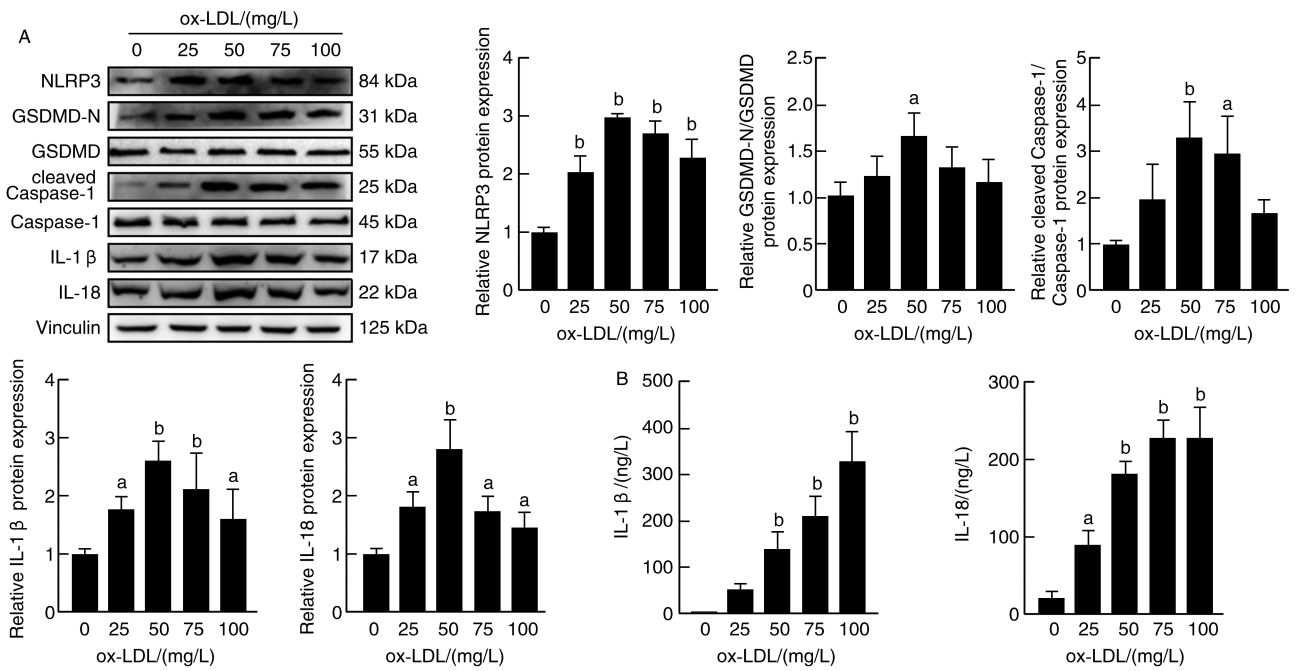


图 2. 不同剂量 ox-LDL 对 THP-1 源性巨噬细胞焦亡的影响

A 为 Western blot 检测不同剂量 ox-LDL 对细胞焦亡相关蛋白表达的影响, B 为 ELISA 检测不同剂量 ox-LDL 对细胞培养上清液中成熟的 IL-1β 和 IL-18 分泌的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effect of different doses of ox-LDL on THP-1-derived macrophage pyroptosis

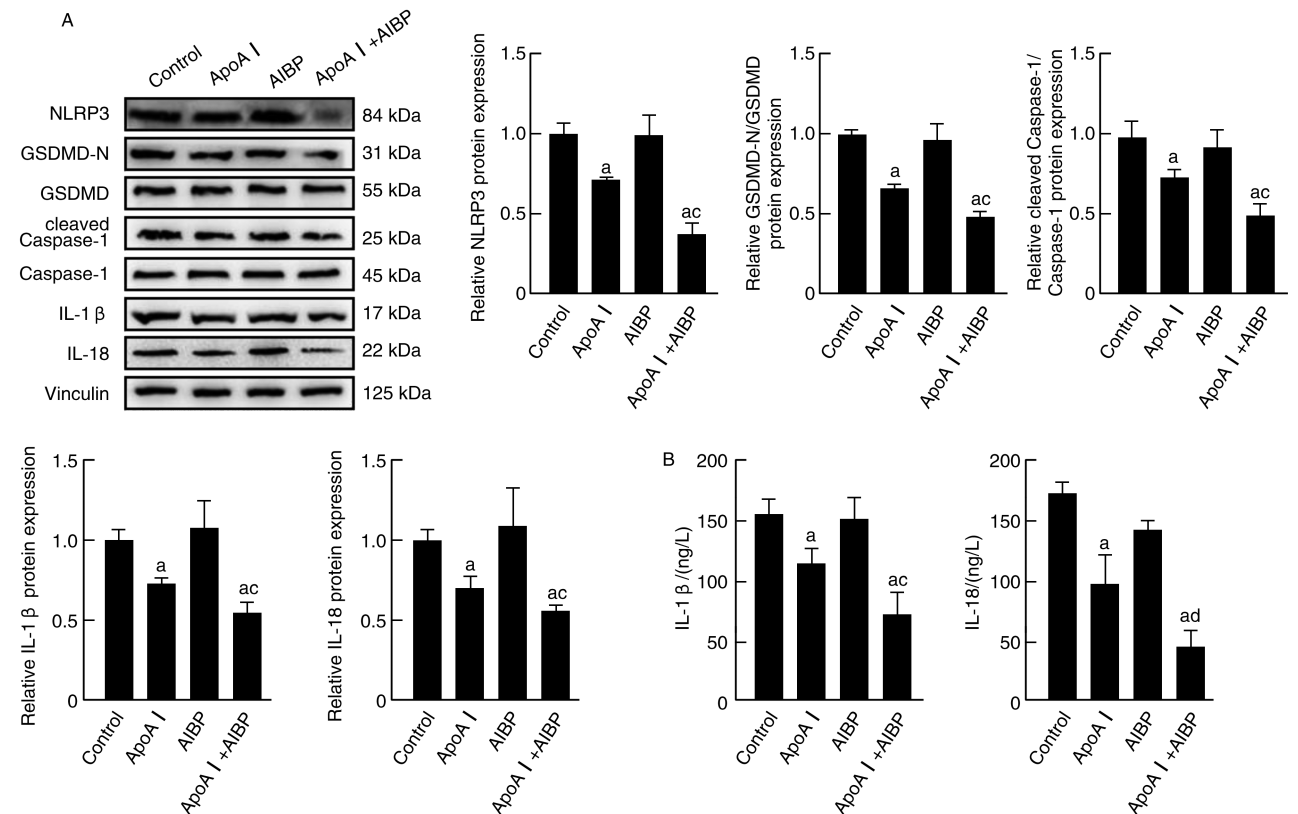


图 3. ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞焦亡的影响

A 为 Western blot 检测 ApoA I 和 AIBP 对细胞焦亡相关蛋白表达的影响, B 为 ELISA 检测 ApoA I 和 AIBP 对细胞培养上清液中成熟 IL-1β 和 IL-18 分泌的影响。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 ApoA I 组比较。

Figure 3. Effect of ApoA I and AIBP on THP-1-derived macrophage pyroptosis

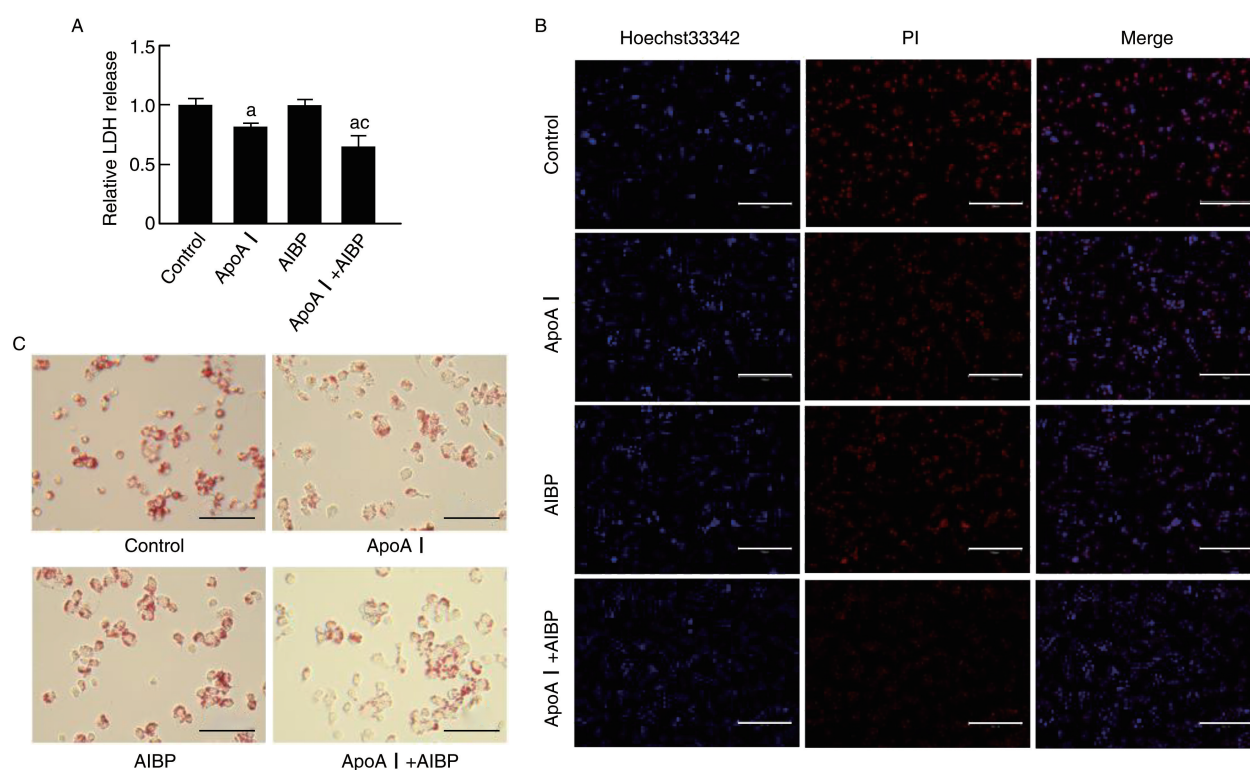


图 4. ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞死亡和脂质蓄积的影响

A 为 ApoA I 和 AIBP 对细胞 LDH 释放的影响;B 为 ApoA I 和 AIBP 对细胞 Hoechst33342/PI 染色的影响,Bar=150 μm ;

C 为 ApoA I 和 AIBP 对细胞内脂质蓄积的影响,Bar=75 μm 。

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 ApoA I 组比较。

Figure 4. Effect of ApoA I and AIBP on the death and lipid accumulation of THP-1-derived macrophages

2.3 ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 抑制巨噬细胞焦亡

ApoA I 和 AIBP 联合使用可以上调 ABCA1 蛋白表达,促进 ABCA1 介导的胆固醇流出,减少细胞内脂质蓄积^[7-9]。为了探究 ApoA I 和 AIBP 抑制 ox-LDL 诱导的细胞焦亡是否依赖于 ABCA1,通过 siRNA 来敲低 ABCA1 表达,进而开展后续实验。结果显示,敲低 ABCA1 后,ApoA I 组和 ApoA I +AIBP 组 NLRP3、cleaved Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 和 IL-18 的表达差异均无统计学意义,细胞培养上清液中成熟的 IL-1 β 、IL-18 分泌和 LDH 释放也无显著变化(均 $P > 0.05$);Hoechst33342/PI 染色结果显示,各组间的阳性细胞比例差异无统计学意义($P > 0.05$;图 5 和图 6)。以上结果表明,ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡。

2.4 ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 降低细胞膜上 P2X7R 表达抑制巨噬细胞焦亡

ABCA1 介导胆固醇流出、调节细胞膜脂质含量和分布,影响膜蛋白功能^[9]。P2X7R 作为一种能够激活 NLRP3 的膜蛋白^[10-11],是否参与 ApoA I 和 AIBP 抑制巨噬细胞焦亡有待于进一步研究。因此,

本研究检测了 ApoA I 和 AIBP 共同处理后细胞膜上 P2X7R 表达。结果发现,P2X7R 的表达显著降低($P < 0.01$;图 7)。为了进一步论证 ApoA I 和 AIBP 共同处理调节 P2X7R 在细胞膜上的表达是否与 ABCA1 相关,敲低 ABCA1 进行验证。结果发现,敲低 ABCA1 后,ApoA I 和 AIBP 共同处理后细胞膜上 P2X7R 的表达无显著改变($P > 0.05$;图 8)。为了验证 ApoA I 和 AIBP 是否通过 P2X7R 抑制细胞焦亡,敲低 P2X7R 进行验证。结果发现,敲低 P2X7R 的巨噬细胞中,ApoA I 和 AIBP 共同处理后细胞焦亡相关指标无显著改变($P > 0.05$;图 9)。以上结果表明,ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 降低细胞膜上 P2X7R 表达,进而抑制 ox-LDL 介导的细胞焦亡。

2.5 ApoA I 和 AIBP 抑制 P2X7R/PKR/NLRP3 介导的巨噬细胞焦亡

Lu 等^[12]证实,ATP 促进 PKR 与 NLRP3 相互作用,是 NLRP3 炎性小体组装及激活的关键因子。P2X7R 作为 ATP 门控离子通道,其调控巨噬细胞焦亡是否与 PKR 激活相关,有待于进一步研究。

Western blot 检测结果显示, ApoA I 和 AIBP 共同处理后 p-PKR 的表达降低 ($P < 0.01$; 图 10); 转染 P2X7R siRNA 后, p-PKR 的表达无显著变化 ($P > 0.05$; 图 11), 提示 ApoA I 和 AIBP 可以通过 P2X7R

抑制 PKR 活化。转染 PKR siRNA 后, ApoA I 和 AIBP 共同处理并未显著影响 NLRP3 表达 ($P > 0.05$; 图 12)。以上结果表明, ApoA I 和 AIBP 通过 P2X7R/PKR/NLRP3 信号通路抑制巨噬细胞焦亡。

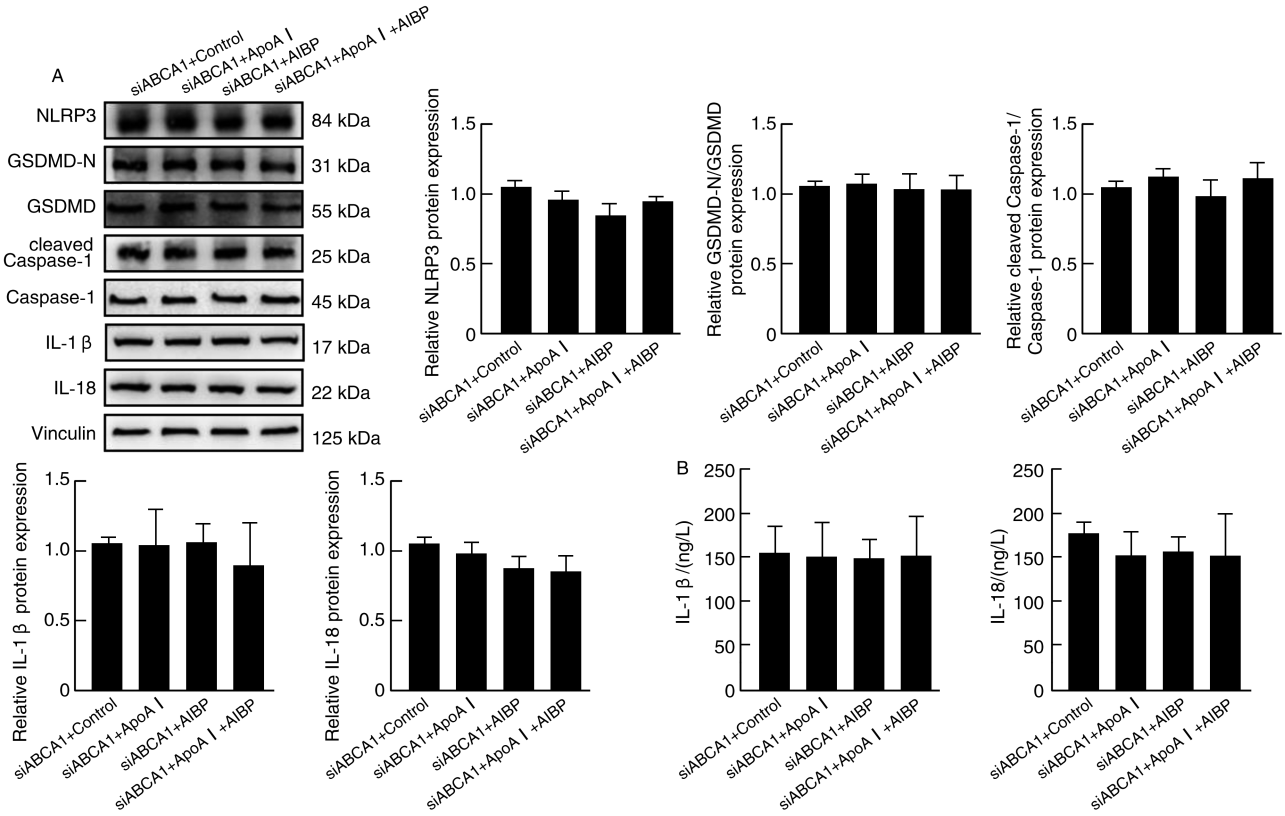


图 5. 转染 ABCA1 siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞焦亡的影响

A 为 Western blot 检测细胞焦亡相关蛋白表达, B 为 ELISA 检测细胞培养上清液中成熟 IL-1β、IL-18 的分泌量。

Figure 5. Effect of ApoA I and AIBP on THP-1-derived macrophage pyroptosis after ABCA1 siRNA transfection

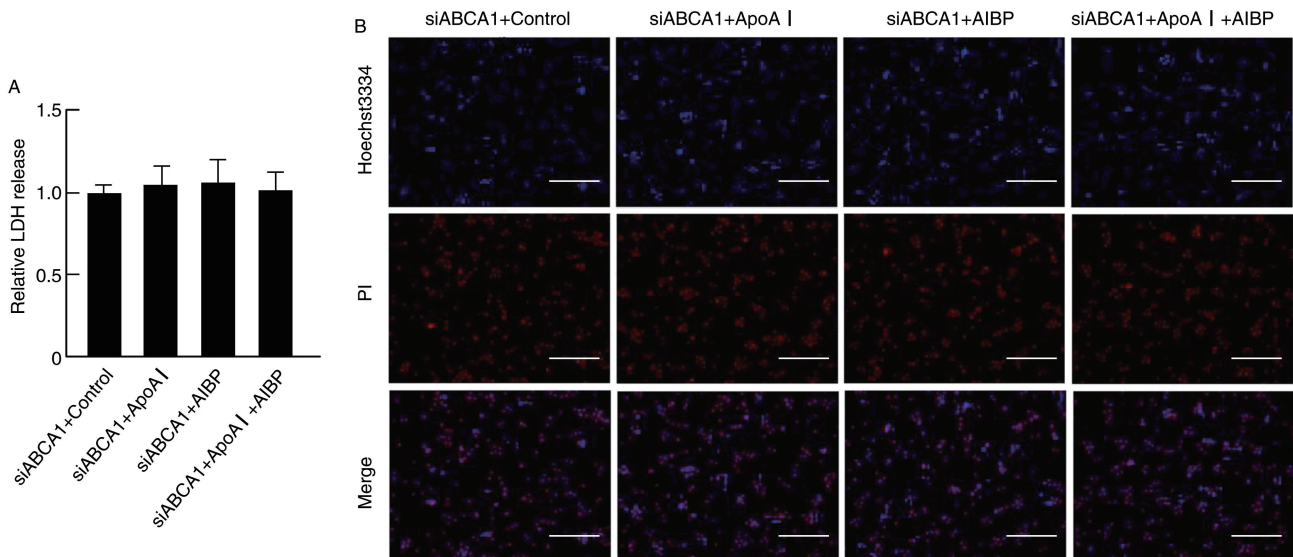


图 6. 转染 ABCA1 siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞死亡的影响

A 为转染 ABCA1 siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞 LDH 释放的影响, B 为转染 ABCA1 siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞 Hoechst33342/PI 染色的影响, Bar = 150 μm。

Figure 6. Effect of ApoA I and AIBP on THP-1-derived macrophage death after ABCA1 siRNA transfection

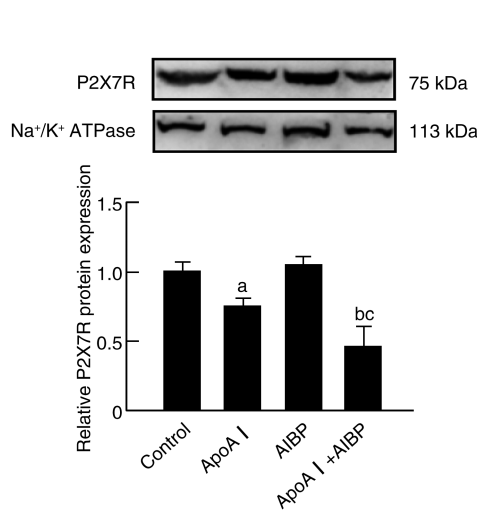


图 7. ApoA I 和 AIBP 对细胞膜上 P2X7R 表达的影响
a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较;
c 为 $P < 0.05$, 与 ApoA I 组比较。

Figure 7. Effect of ApoA I and AIBP on the expression of P2X7R on cell membrane

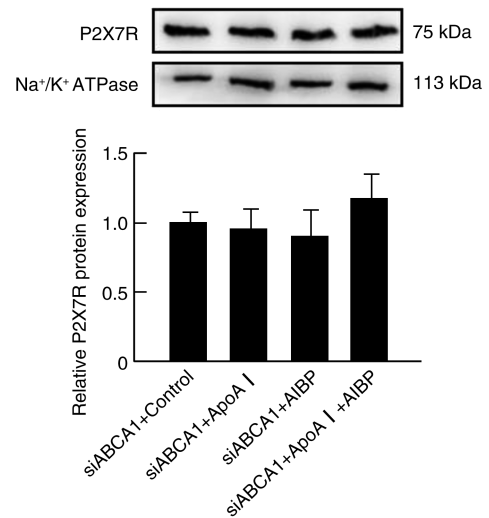


图 8. 转染 ABCA1 siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞膜上 P2X7R 表达的影响

Figure 8. Effect of ApoA I and AIBP on the expression of P2X7R on cell membrane after ABCA1 siRNA transfection

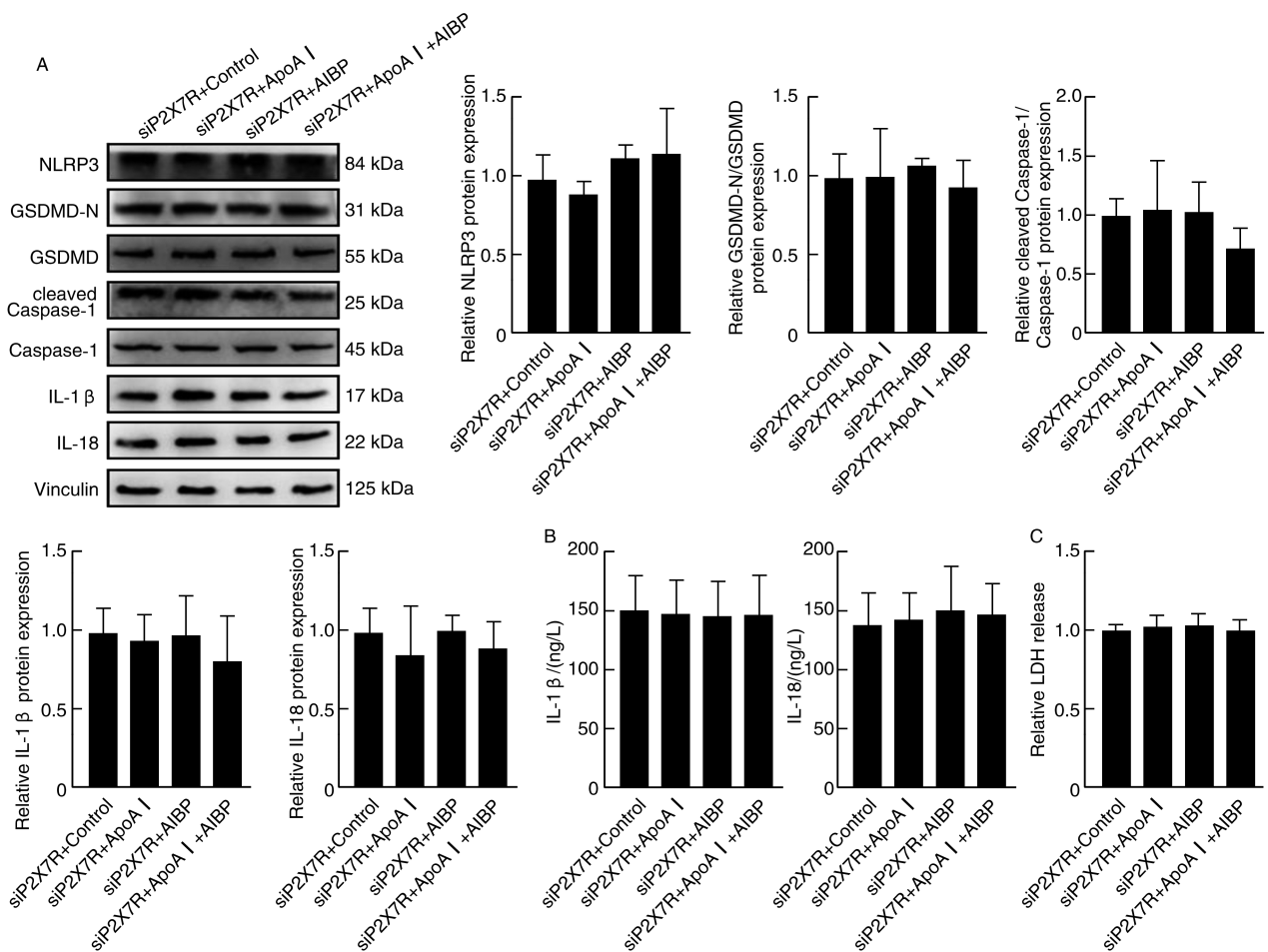


图 9. 转染 P2X7R siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞焦亡的影响

A 为 Western blot 检测干扰 P2X7R 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞焦亡相关蛋白表达的影响, B 为 ELISA 检测干扰 P2X7R 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞培养上清液中成熟的 IL-1β、IL-18 分泌的影响, C 为干扰 P2X7R 后 ApoA I 和 AIBP 对细胞 LDH 释放的影响。

Figure 9. Effect of ApoA I and AIBP on THP-1-derived macrophage pyroptosis after P2X7R siRNA transfection

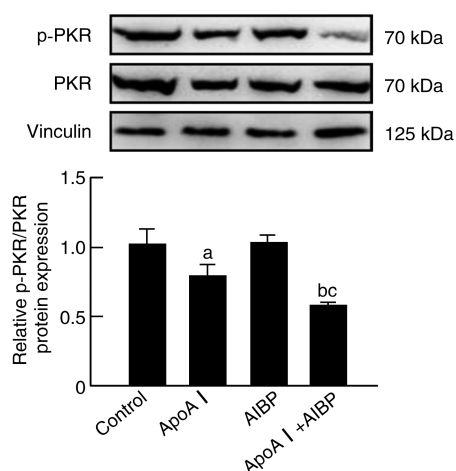


图 10. ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞 p-PKR 表达的影响

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较;
c 为 $P < 0.05$, 与 ApoA I 组比较。

Figure 10. Effect of ApoA I and AIBP on the expression of p-PKR in THP-1-derived macrophages

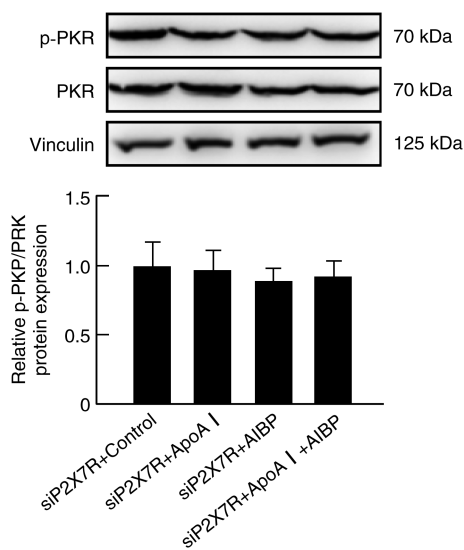


图 11. 转染 P2X7R siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞 p-PKR 表达的影响

Figure 11. Effect of ApoA I and AIBP on the expression of p-PKR in THP-1-derived macrophages after P2X7R siRNA transfection

3 讨论

As 作为 CVD 的重要诱因,其发病机制复杂且多样,巨噬细胞在其中发挥着重要的作用。研究显示,斑块内的巨噬细胞能够通过焦亡过程释放大量炎症因子,例如 IL-1 β 和 IL-18,从而促进 As 的发展。因此,探究巨噬细胞焦亡的机制是降低 As 发生

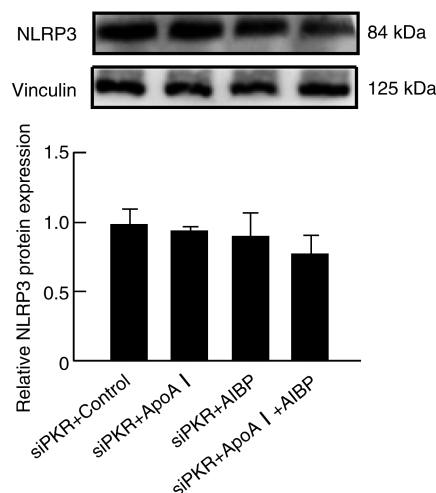


图 12. 转染 PKR siRNA 后 ApoA I 和 AIBP 对 THP-1 源性巨噬细胞 NLRP3 表达的影响

Figure 12. Effect of ApoA I and AIBP on the expression of NLRP3 in THP-1-derived macrophages after PKR siRNA transfection

发展的重要研究课题。细胞焦亡是一种新近发现的细胞程序性死亡方式。近年来,相关研究表明抑制巨噬细胞焦亡能减缓 As 的发生发展^[13-14]。Duewell 等^[15]的研究指出,细胞内脂质蓄积会诱导巨噬细胞 NLRP3 炎性小体活化,激活 Caspase-1,导致巨噬细胞释放 IL-1 β 和 IL-18。Rajamaki 等^[16]发现,抑制巨噬细胞中 NLRP3 的表达能减少 IL-1 β 的分泌。本研究发现,ox-LDL 以剂量依赖的方式诱导 THP-1 源性巨噬细胞焦亡,提示减少细胞内脂质蓄积可抑制巨噬细胞焦亡。前期研究发现,ApoA I 和 AIBP 能通过调节 ABCA1 表达,促进细胞内胆固醇流出,抑制脂质蓄积,发挥抗 As 作用^[17];且 Li 等^[18]证实,细胞内胆固醇蓄积可通过 NF- κ B/ABCA1 激活 NLRP3 炎性小体,提示 ABCA1 可能是连接巨噬细胞脂质蓄积与炎症反应的桥梁。此外,本研究还发现 ApoA I 和 AIBP 抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡依赖于 ABCA1,说明 ABCA1 在 ApoA I 和 AIBP 减少细胞内脂质蓄积、抑制细胞焦亡中发挥重要作用。ABCA1 介导的胆固醇流出对多种细胞膜蛋白的分布和功能具有重要影响。研究显示,AIBP 能够显著降低 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的膜蛋白水平,抑制炎症信号传导,进而发挥抗 As 的作用。因此,本研究专注于靶向调节细胞膜蛋白的表达,证实 ApoA I 和 AIBP 通过减少细胞膜上 P2X7R 的表达,抑制细胞焦亡,为探究细胞焦亡的机制提供了新的研究方向。

细胞焦亡受到多种细胞膜蛋白的影响,其中

P2X7R 扮演核心角色,其激活可诱导 NLRP3 炎性小体的组装和活化,进而引起细胞焦亡^[19-20]。新近研究发现,PKR 是激活 NLRP3、协助 NLRP3 炎性小体各组分组装的重要因子^[12]。研究发现,P2X7R 促进 PKR 的磷酸化可调节 NLRP3 炎性小体的组装。本研究发现,当 ApoA I 和 AIBP 共同处理巨噬细胞时,通过调节 P2X7R 在细胞膜上的表达,减少 PKR 的磷酸化水平,抑制巨噬细胞焦亡。研究发现,神经诱导损伤蛋白 1 (ninjurin-1, NINJ1) 作为一种膜蛋白,参与调控细胞焦亡^[21-22], ApoA I 和 AIBP 是否通过 NINJ1 影响细胞焦亡,尚需进一步的实验来进一步探究。

综上所述,ApoA I 和 AIBP 通过 ABCA1 调节细胞膜上 P2X7R 的表达,有效地抑制了 P2X7R 介导的巨噬细胞焦亡,为未来 As 防治相关药物研发提供了新的思路和靶点。

[参考文献]

- [1] BLAGOV A V, MARKIN A M, BOGATYREVA A I, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 522.
- [2] WEI Y, LAN B, ZHENG T, et al. GSDME-mediated pyroptosis promotes the progression and associated inflammation of atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 929.
- [3] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 941-955.
- [4] 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 Z 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.
- [5] ZHANG M, ZHAO G J, YIN K, et al. Apolipoprotein A-1 binding protein inhibits inflammatory signaling pathways by binding to apolipoprotein A-1 in THP-1 macrophages [J]. *Circ J*, 2018, 82(5): 1396-1404.
- [6] PENG K, LIU L, WEI D, et al. P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5): 1179-1188.
- [7] 王斯琦, 张 敏, 陈凌燕, 等. ABCA1 结构对胆固醇流出的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2017, 44(9): 806-808.
WANG S Q, ZHANG M, CHEN L Y, et al. The impact of ABCA1 structure on cholesterol efflux [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2017, 44(9): 806-808.
- [8] ZHAO Z W, ZHANG M, CHEN L Y, et al. Heat shock protein 70 accelerates atherosclerosis by downregulating the expression of ABCA1 and ABCG1 through the JNK/Elk-1 pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(8): 806-822.
- [9] SCHUMACHER T, BENNDORF R A. ABC transport proteins in cardiovascular disease: a brief summary [J]. *Molecules*, 2017, 22(4): 589.
- [10] SUN W, WANG Q, ZHANG R, et al. Ketogenic diet attenuates neuroinflammation and induces conversion of M1 microglia to M2 in an EAE model of multiple sclerosis by regulating the NF- κ B/NLRP3 pathway and inhibiting HDAC3 and P2X7R activation [J]. *Food Funct*, 2023, 14(15): 7247-7269.
- [11] LI S, ZHANG Y, WANG Y, et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation modulates depression-like phenotype induced by high-fat diet via P2X7R/NLRP3/IL-1 β in the prefrontal cortex [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(5): e14755.
- [12] LU B, NAKAMURA T, INOUE K, et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release [J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 670-674.
- [13] BUŁDAK Ł. Cardiovascular diseases: a focus on atherosclerosis, its prophylaxis, complications and recent advancements in therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4695.
- [14] JIA C, CHEN H, ZHANG J, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 311-318.
- [15] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [16] RAJAMÄKI K, LAPPALAINEN J, ÖÖRNI K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11765.
- [17] ZHANG M, LI L, XIE W, et al. Apolipoprotein A-1 binding protein promotes macrophage cholesterol efflux by facilitating apolipoprotein A-1 binding to ABCA1 and preventing ABCA1 degradation [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 248: 149-159.
- [18] LI J, LIU J, YU Y, et al. NF- κ B/ABCA1 pathway aggravates ox-LDL-induced cell pyroptosis by activation of NLRP3 inflammasomes in THP-1-derived macrophages [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(7): 6161-6171.
- [19] CHEN Z, HE L, LI L, et al. The P2X7 purinergic receptor: an emerging therapeutic target in cardiovascular diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 479: 196-207.
- [20] KONG H, ZHAO H, CHEN T, et al. Targeted P2X7/NLRP3 signaling pathway against inflammation, apoptosis, and pyroptosis of retinal endothelial cells in diabetic retinopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 336.
- [21] DAVID L, BORGES J P, HOLLINGSWORTH L R, et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture by cutting and releasing membrane disks [J]. *Cell*, 2024, 187(9): 2224-2235.
- [22] 吴昭瑜, 许之珏, 蒲蕻吉, 等. 神经损伤诱导蛋白 1 的生理功能及其在相关疾病中的作用 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2023, 43(3): 358-364.
WU Z Y, XU Z J, PU H J, et al. Physiological function of nerve injury-induced protein 1 and its role in relevant diseases [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2023, 43(3): 358-364.

(此文编辑 文玉珊)