

## PHF-2 在氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 源性巨噬细胞核因子 $\kappa$ B 激活中的作用

涂光辉<sup>1</sup>, 李金凤<sup>2</sup>, 谢 笛<sup>2</sup>, 桂庆军<sup>2</sup>, 唐朝克<sup>2</sup>, 尹 凯<sup>2</sup>

(1. 南县人民医院病理科, 湖南省益阳市 413200; 2. 南华大学医学院诊断学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 植物同源结构域指蛋白 2; 炎症因子

[摘要] **目的** 观察氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 巨噬细胞植物同源结构域指蛋白 2(PHF-2)表达的影响, 探讨表观遗传调节在氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞炎症反应中的作用。**方法** 用不同浓度(0、50、100、150 mg/L)氧化型低密度脂蛋白处理 THP-1 巨噬细胞 4 h, 采用酶联免疫吸附法检测肿瘤坏死因子  $\alpha$  和巨噬细胞炎症蛋白 1 $\beta$  的表达; 采用实时荧光定量聚合酶链反应和 Western blot 分别检测 PHF-2 mRNA 和蛋白质的表达; 采用免疫共沉淀法检测 PHF-2 和 p65 核因子  $\kappa$ B 的结合。**结果** 100 ~ 150 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理 THP-1 巨噬细胞 4 h 后, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  和巨噬细胞炎症蛋白 1 $\beta$  的表达明显上调; 氧化型低密度脂蛋白呈浓度依赖性上调 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 mRNA 和蛋白质的表达, 并促进 PHF-2 和 p65 核因子  $\kappa$ B 的结合。**结论** PHF-2 参与氧化型低密度脂蛋白诱导 THP-1 巨噬细胞核因子  $\kappa$ B 激活和炎症因子表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Role of Plant Homeodomain Finger-2 in Oxidized Low Density Lipoprotein-induced Activation of Nuclear Factor-kappa B in THP-1 Macrophages

TU Guang-Hui<sup>1</sup>, LI Jin-Feng<sup>2</sup>, XIE Di<sup>2</sup>, GUI Qing-Jun<sup>2</sup>, TANG Chao-Ke<sup>2</sup>, and YIN Kai<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, Nan Xian People's Hospital, Yiyang, Hunan 413200, China; 2. Department of Diagnosis, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Macrophages; Plant Homeodomain Finger-2; Inflammatory Cytokines

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on the expression of plant homeodomain finger-2 (PHF-2) and explore the potential effect of epigenetic regulation on ox-LDL-induced inflammatory response in macrophages. **Methods** THP-1 macrophages were exposed to ox-LDL with different levels (0, 50, 100, 150 mg/L) for 4 h. Enzyme linked immunosorbent assay was used to determine levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ). Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to determine mRNA and protein levels of PHF-2. Coimmunoprecipitation was used to determine the interaction of PHF-2 and p65 nuclear factor-kappa B (p65 NF- $\kappa$ B). **Results** ox-LDL from 100 mg/L to 150 mg/L increased the levels of TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . PHF-2 mRNA and protein were induced by ox-LDL in a concentration-dependent manner in THP-1 macrophages. Ox-LDL promoted the interaction of PHF-2 and p65 NF- $\kappa$ B. **Conclusion** PHF-2 may play a crucial role in the NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory cytokines expression in THP-1 macrophages.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种炎症疾病,多种炎症因子参与了 As 的发生发展<sup>[1]</sup>。低

密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是促进 As 进展的主要危险因素,其表达水平与冠心病患者体

[收稿日期] 2013-05-13

[基金项目] 国家自然科学基金(81100213);湖南省研究生科研创新项目(2012SCX13);国家级大学生创新创业训练计划(201210555018)

[作者简介] 涂光辉,硕士,副主任医师,研究方向为临床与分子病理诊断,E-mail 为 807146095@qq.com。李金凤,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化的病因及防治。通讯作者尹凯,博士,副教授,研究方向为动脉粥样硬化的发病机制,E-mail 为 kaiyinby@hotmail.com。

内炎症状态密切相关<sup>[2]</sup>。LDL 促炎的机制尚不明确,研究认为其主要修饰产物氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是促进 As 相关炎症的关键因素<sup>[3]</sup>。除了与细胞表面的清道夫受体结合外,ox-LDL 可与内源性免疫识别受体 TOLL 样受体 4 (Toll-like receptor-4, TLR-4) 结合,通过促进核因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 转录激活,上调多种炎症因子的表达<sup>[4]</sup>。

植物同源结构域指蛋白 2 (plant homeodomain finger-2, PHF-2) 是新发现的含有 Jmj C 结构域的组蛋白去甲基化酶<sup>[5]</sup>。在细胞内,PHF-2 主要通过调节组蛋白去甲基化参与多种核受体的转录功能<sup>[6]</sup>。近来研究发现,PHF-2 是巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 促炎信号转录激活的关键辅因子<sup>[7]</sup>,提示 PHF-2 可能在 ox-LDL 促进 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎性激活中起着关键作用。因此,本研究观察不同浓度 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 及其炎症因子表达的影响,以便进一步探讨 PHF-2 在高脂血症诱发 As 及血管壁炎症反应中的作用和表观遗传调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞中心;健康人血浆购自衡阳市中心血站;PHF-2 兔抗人-1 抗购自 Santa Cruz 公司; $\beta$ -actin 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德公司;肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和巨噬细胞炎性蛋白 1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ ) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海美季生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒为 Hyclone Pierce 公司产品;佛波酯购自美国 Sigma 公司;Western blot 荧光检测试剂盒购自北京中杉金桥公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 低密度脂蛋白的氧化修饰和 THP-1 细胞处理

按照本实验室方法<sup>[8]</sup>,将 210 mL 健康人血浆置超速离心机进行序列超速离心,以制备 LDL。将制备好的 LDL 置于无乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 的 PBS 溶液中,4 $^{\circ}$ C 透析 36 h,充分去除 EDTA,然后用含 10  $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 溶液 (pH 7.2) 于 37 $^{\circ}$ C 透析 20 h,进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL 置含 100  $\mu$ mol/L EDTA 的 PBS 中,4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,终止氧化,过滤除菌,BCA 试剂盒定量蛋白。采用鲎试剂法检测 ox-LDL 中脂多

糖 (lipopolysaccharide, LPS) 水平 ( $< 0.3$  mg/g ox-LDL)。将 THP-1 细胞接种于 24 孔板,佛波酯诱导分化为巨噬细胞,处理前加无血清培养基培养以去除完全培养基中痕量 ox-LDL 的影响,之后用不同浓度 (0、50、100、150 mg/L) 的 ox-LDL 处理 THP-1 巨噬细胞 4 h。

### 1.3 Western blot

参照本课题前期方法<sup>[8]</sup>,提取不同处理组细胞蛋白质,加入适量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮 10 min,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 后电转移至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂牛奶封闭 4 h,分别加入 1:1 000 PHF-2 一抗和 1:2 000  $\beta$ -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 3 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。用 Western blot 荧光检测试剂盒显示于 X 光片。用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描,以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行半定量分析。

### 1.4 酶联免疫吸附测定

参照本课题组前期方法<sup>[8]</sup>,按不同处理因素处理细胞,处理前加无血清培养基,处理后收集培养基,存储于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。按说明书方法,将 100  $\mu$ L 样品和标准品加入板孔,盖上封板膜,室温孵育 1~2 h。扣去孔内液体,重复洗板 3 次。加入 50~100  $\mu$ L 生物素标记抗体,孵育 1~2 h。扣去孔内液体,又重复洗板 3 次。加入抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶,室温孵育 30 min。重复洗板 3 次后,加入显色剂,室温孵育 10~20 min。终止反应后,在 450 nm 波长处测定吸光度 (absorbance, A)。

### 1.5 实时荧光定量聚合酶链反应

收集各组细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,测得 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 比值在 1.8~2.0 之间。用逆转录试剂盒 (Fermentas 公司) 合成 cDNA,采用 Mx3000 Multiplex Quantitative PCR 系统,以 SYBR 绿色荧光检测试剂盒进行实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR) 分析。定量 PCR 引物序列如下:人 PHF-2: 上游 5'-TACTGCCTGATCTGTGTGAAGGA-3', 下游 5'-CTGCGCCGGATGAGATAGAAGA-3'; 人  $\beta$ -actin: 上游 5'-CCACGAACTACCTTCAACTTC-3', 下游 5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCGTG-3'。所有产物应用 Melt 曲线分析。定量检测采用  $\Delta\Delta$ Ct 方法, $\beta$ -

actin 的表达用做内参照。

## 1.6 免疫共沉淀

按照本课题组之前方法<sup>[9]</sup>,收集不同组细胞,经预冷 PBS 洗涤 2 次,加入冰冷的改良 RIPA 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% NP40、0.25% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟、2 mg/L 亮抑蛋白酶肽,pH 7.5)冰上裂解 20 min,经 4℃、13 000 g 离心力离心 10 min 后收集上清液,BCA 法进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白,加入 5 μg p65 NF-κB 单抗,4℃ 振荡孵育过夜。经 RIPA 缓冲液洗涤蛋白 A 琼脂糖珠 3 次,将 30 μL 蛋白 A 琼脂糖珠加入到与抗体孵育过夜的细胞裂解液中,摇床孵育 4 h,以 4℃、3 000 g 离心力离心 5 min,沉淀琼脂糖珠后弃上清,RIPA 液洗涤琼脂糖珠 3 次,加入 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮

5 min。采用 PHF-2 抗体进行 Western blot 检测。

## 1.7 统计学处理

所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验,由 SPSS 12.0 统计软件完成, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ox-LDL 上调 THP-1 巨噬细胞 TNF-α 和 MIP-1β 的表达

不同浓度(0、50、100、150 mg/L) ox-LDL 处理 THP-1 巨噬细胞 4 h,提取培养基上清液,采用 ELISA 法检测 TNF-α 和 MIP-1β 的表达情况。自 100 mg/L 开始,ox-LDL 呈浓度依赖性上调 TNF-α 和 MIP-1β 的表达水平(图 1)。

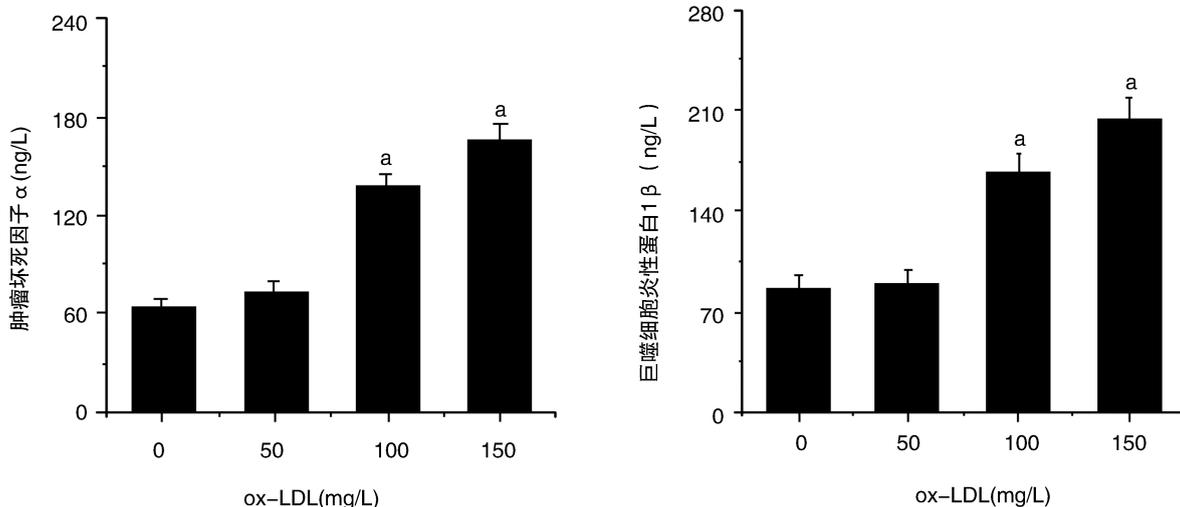


图 1. 不同浓度 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 TNF-α 和 MIP-1β 表达的影响( $n=3$ ) a 为  $P < 0.05$ ,与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 1. The levels of TNF-α and MIP-1β in THP-1 macrophages treated with different concentrations of ox-LDL ( $n=3$ )

### 2.2 ox-LDL 上调 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 的表达

THP-1 巨噬细胞经不同浓度(0、50、100、150 mg/L) ox-LDL 处理 4 h,提取细胞总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 检测 PHF-2 mRNA 的表达情况。结果表明,ox-LDL 呈浓度依赖性上调 PHF-2 mRNA 的表达(图 2)。

THP-1 巨噬细胞经不同浓度(0、50、100、150 mg/L) ox-LDL 处理 4 h,提取细胞总蛋白,采用 Western blot 法检测 PHF-2 蛋白质的表达情况。结果表明,ox-LDL 呈浓度依赖性显著上调 PHF-2 蛋白质的表达(图 3)。

### 2.3 ox-LDL 促进 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 与 p65 NF-κB 结合

THP-1 巨噬细胞经 100 mg/L ox-LDL 处理 4 h

后,采用 IP-Western blot 法检测 PHF-2 与 p65 NF-κB 的结合情况。结果显示,ox-LDL 促进 PHF-2 与 p65NF-κB 的结合(图 4)。

## 3 讨论

循环中过量的 LDL 胆固醇在促进血管壁泡沫细胞形成的同时,其修饰产物也促进了机体炎症反应。ox-LDL 是 LDL 的主要修饰产物,其促进炎症反应的作用一直是研究热点。研究报道,ox-LDL 可与细胞表面 TLR-4 受体结合,激活 NF-κB 依赖的炎症因子表达<sup>[4]</sup>。另有研究发现,ox-LDL 可能通过氧化应激途径激活胞内模式识别受体 Nod 样受体蛋白 3

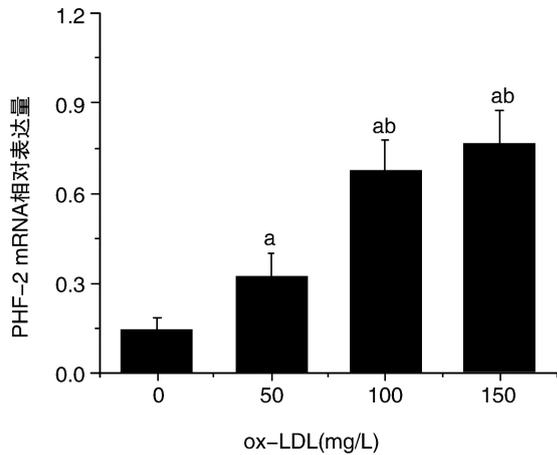


图 2. 不同浓度 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 mRNA 表达的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 0 mg/L ox-LDL 组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 2. The relative mRNA expression of PHF-2 in THP-1 macrophages treated with different concentrations of ox-LDL ( $n=3$ )

理 THP-1 巨噬细胞早期即可迅速上调 TNF- $\alpha$  和 MIP-1 $\beta$  的表达,提示巨噬细胞可能主要通过 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号途径对 ox-LDL 刺激做出早期反应。

作为调节转录的关键核因子, NF- $\kappa$ B 的激活需要多种调节蛋白参与。静息状态下, NF- $\kappa$ B 与核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白 B(I $\kappa$ B) 结合, 以无活性的形式存在于细胞浆中。当细胞受到刺激物激活时, I $\kappa$ B 即从复合物中解离出来, 暴露出 p65 亚基上的 DNA 结合位点, 并从细胞质易位到细胞核中, 与下游靶基因的启动子结合, 发挥转录调控作用<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B 对下游靶基因的转录调控受到多种辅助因子的调节, 在促炎细胞因子的启动子区域通常存在多种辅抑制因子, 如核受体辅助抑制因子 1 (nuclear receptor corepressor-1, NCoR-1), 当 NF- $\kappa$ B 激活时需要去除辅抑制因子或募集辅激活因子才可完成转录<sup>[12]</sup>。近来发现, 组蛋白甲基化是炎症因子基因启动子保持失活状态的关键因素, Stender 等<sup>[7]</sup> 发现有效去除组蛋白 H4 第 20 位赖氨酸的三甲基化是 NF- $\kappa$ B 激活炎症因子转录的必需环节。PHF-2 是新发现的具有组蛋白去甲基化功能的植物同源结构域蛋白家族成员。PHF-2 被发现能促进多种组蛋白去甲基化, 从而调节与代谢和炎症相关的基因表达<sup>[5-7]</sup>。本研究发现 ox-LDL 能够显著上调 PHF-2 的表达, 提示 PHF-2 参与了 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症反应。免疫共沉淀结果显示, ox-LDL 能够促进 PHF-2 和 p65 NF- $\kappa$ B 的结合, 而 PHF-2 被证实与 NF- $\kappa$ B 的激活直接相关<sup>[7]</sup>, 提示 ox-LDL 可能通过 PHF-2 促进 p65 NF- $\kappa$ B 转录激活, 从而促进巨噬细胞炎症反应。Baba 等<sup>[13]</sup> 发现蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号途径能够上调 PHF-2 表达, 而 ox-LDL 也主要通过蛋白激酶信号途径发挥其生物学作用<sup>[14]</sup>, ox-LDL 是否通过蛋白激酶途径上调 PHF-2 表达还有待进一步研究。

总之, 本研究发现了 ox-LDL 激活巨噬细胞炎症反应的一种新的作用途径, 这为明确高脂血症与机体慢性炎症状态以及 As 的形成提供了新的实验依据。ox-LDL 上调 PHF-2 的分子机制以及 PHF-2 调节 TLR-4/NF- $\kappa$ B 促炎信号的确切机制, 我们将在后续研究中进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] 李晶, 裘毅钢, 张蓉, 等. 炎症因子在人动脉粥样硬化组织的表达分析 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2012, 4(3): 215-217.
- [2] Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflam-

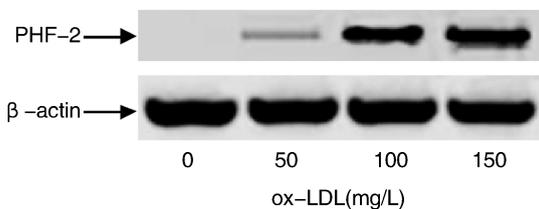


图 3. 不同浓度 ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 蛋白质表达的影响 ( $n=3$ )

Figure 3. The protein expression of PHF-2 in THP-1 macrophages treated with different concentrations of ox-LDL ( $n=3$ )

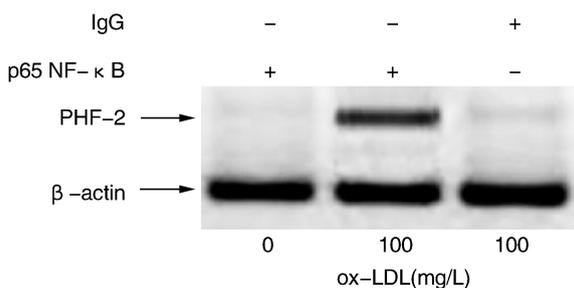


图 4. ox-LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PHF-2 与 p65 NF- $\kappa$ B 结合的影响 ( $n=3$ )

Figure 4. The interaction of PHF-2 and p65 NF- $\kappa$ B in THP-1 macrophages treated with 100 mg/L ox-LDL ( $n=3$ )

(Nod-like receptor protein-3, NLRP-3) 炎性体, 从而上调炎症因子的表达<sup>[10]</sup>。本研究发现, ox-LDL 处

- matory risk markers in acute coronary syndromes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(4): 37-42.
- [3] Wen Y, Leake DS. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9): 1 337-343.
- [4] Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via Toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake[J]. *Circ Res*, 2009, 104(12): 1 355-363.
- [5] Wen H, Li J, Song T, et al. Recognition of histone H3K4 trimethylation by the plant homeodomain of PHF-2 modulates histone demethylation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9 322-326.
- [6] Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, et al. Epigenetic regulation of adipogenesis by PHF-2 histone demethylase[J]. *Diabetes*, 2013, 62(5): 1 426-434.
- [7] Stender JD, Pascual G, Liu W, et al. Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20[J]. *Mol Cell*, 2012, 48(1): 28-38.
- [8] Yin K, Deng X, Mo ZC, et al. Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: Role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16): 13 834-845.
- [9] 邓翔, 尹凯, 涂剑, 等. 小檗碱调节肝 X 受体  $\alpha$  去乙酰化促进 THP-1 巨噬细胞 ATP 结合盒转运体 A1 表达及其胆固醇流出[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(12): 1 074-078.
- [10] Jiang Y, Wang M, Huang K, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1 beta by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP-3 inflammasome activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 121-126.
- [11] Chu H, Mazmanian SK. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(7): 668-675.
- [12] Ghisletti S, Huang W, Jepsen K, et al. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(6): 681-693.
- [13] Baba A, Ohtake F, Okuno Y, et al. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF-2-ARID5B[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(6): 668-675.
- [14] Feng J, Han J, Pearce SF, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(5): 688-696.

(此文编辑 曾学清)