

鼠、人源巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及比较

祁芳菲¹ 楼 滨² 杨 青^{1Δ}

(¹ 复旦大学生命科学学院生物化学系 上海 200433; ² 复旦大学药学院药理学与生物化学教研室 上海 201203)

【摘要】 目的 建立鼠、人源巨噬细胞源性泡沫细胞模型并比较其生物学特征。**方法** 体外培养鼠源 RAW264.7 和人源 THP-1 巨噬细胞,经氧化型低密度脂蛋白(oxidized lowdensity lipoprotein,ox-LDL)刺激后,油红 O 染色,于荧光倒置显微镜下观察泡沫细胞形态及脂质富集情况。采用 qRT-PCR 技术检测 ox-LDL 对细胞内炎症因子表达的影响;流式细胞术检测 ox-LDL 对细胞凋亡的影响;酶标仪分别检测 ox-LDL 对细胞内脂质过氧化标志物活性氧(reactive oxygen species,ROS)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)水平的影响;HPLC 检测 ox-LDL 对鼠、人源巨噬细胞内催化色氨酸沿犬尿氨酸途径(kynurenine pathway,KP)分解代谢的限速酶吲哚胺 2,3-双加氧化酶 1(indoleamine 2,3 dioxygenase 1,IDO1)活性的影响。**结果** 鼠源 RAW264.7 和人源 THP-1 巨噬细胞经 ox-LDL 处理后,大量脂质在细胞内富集沉积,形成泡沫细胞。ox-LDL 既可诱发巨噬细胞内炎症因子高表达,也会引起 ROS 和 MDA 水平显著升高,表明 ox-LDL 可以诱导鼠源 RAW264.7 和人源 THP-1 巨噬细胞内炎症反应和脂质过氧化产生。ox-LDL 更容易引发人源 THP-1 巨噬细胞的凋亡,而对鼠源 RAW264.7 巨噬细胞凋亡却无明显影响。ox-LDL 在鼠源 RAW264.7 和人源 THP-1 巨噬细胞中均可激活 KP。**结论** 鼠源 RAW264.7 和人源 THP-1 巨噬细胞均可通过 ox-LDL 处理来建立稳定的鼠、人源巨噬细胞源性泡沫细胞模型。

【关键词】 泡沫细胞; RAW264.7; THP-1; 炎症因子; 活性氧(ROS); 丙二醛(MDA); 吲哚胺 2,3-双加氧化酶 1(IDO1)

【中图分类号】 R543 **【文献标识码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2019.04.003

Establishment and comparative analysis of mouse/human macrophages derived foam cell models

QI Fang-fei¹, LOU Bin², YANG Qing^{1Δ}

(¹ Department of Biochemistry, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China;

² Department of Pharmacology and Biochemistry, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 Objective To establish mouse/human macrophages derived foam cell models were established and to compare their biological characteristics. **Methods** Mouse RAW264.7 and human THP-1 macrophages were cultured *in vitro*. After incubating with oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) for 24 h, the cell morphology was observed under the microscope after oil red O staining. qRT-PCR was used to detect the effects of ox-LDL on the inflammatory factors of mouse/human macrophages. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of mouse/human macrophages induced by ox-LDL. The effect of ox-LDL on the levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in mouse/human macrophages was detected by microplate reader. Finally, HPLC was used to detect the effect of ox-LDL on the activity of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1), which was the first and rate-limiting enzyme of tryptophan catabolism through the kynurenine pathway (KP) in mouse/human macrophages. **Results** Lipid deposition was observed in the cytoplasm of mouse RAW264.7 and human THP-1 macrophages when induced by ox-LDL. The addition of ox-LDL not

国家重点研发计划(2016YFC1303503);上海市生物医药重点课题(17431902200,18431902600)

ΔCorresponding author E-mail: yangqing68@fudan.edu.cn

only caused a significant increase in inflammatory factors in mouse/human macrophages, but also significantly up-regulated levels of ROS and MDA, which indicated that ox-LDL could induce intracellular inflammatory reaction and lipid peroxidation. When induced by ox-LDL, apoptosis of THP-1 macrophages increased significantly, while apoptosis of RAW264.7 macrophages did not have significant change. In addition, ox-LDL could activate the kynurenine pathway in RAW264.7 and THP-1 macrophages. **Conclusions** Mouse RAW264.7 and human THP-1 macrophages could successfully establish mouse/human macrophages-derived foam cell models induced by ox-LDL.

【Key words】 foam cell; RAW264.7; THP-1; inflammatory factor; reactive oxygen species (ROS); malondialdehyde (MDA); indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (IDO1)

* This work was supported by the National Key R&D Program of China (2016YFC1303503) and the Key Biomedical Program of Shanghai (17431902200, 18431902600).

心肌梗死和卒中是目前致死率最高的两大心脑血管疾病(cardiovascular disease, CVD),其本质原因是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)^[1]。巨噬细胞的泡沫化是早期AS形成的标志之一^[2-4]。研究表明泡沫细胞的形成过程与动脉硬化斑块区的炎症、氧化应激及凋亡等密切相关^[5-8]。建立稳定的泡沫细胞模型对研究动脉硬化发生发展的机制至关重要^[9-10]。

目前构建泡沫细胞模型最有效的手段是使用氧化性低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)孵育单核-巨噬细胞,单核-巨噬细胞以THP-1和RAW264.7最为常用^[11-12]。利用巨噬细胞源性泡沫细胞模型进行的研究常应用不同的泡沫细胞模型^[13-14]。RAW264.7巨噬细胞普遍用于研究泡沫细胞形成过程中的炎症信号通路以及相关分子作用机制^[15-17];而THP-1巨噬细胞通常用于研究细胞凋亡、自噬及脂质代谢异常等^[14,18-19]。明确不同来源的泡沫细胞的生物学特征(如炎症反应、细胞凋亡、氧化应激等)尤为重要。

本研究旨在使用ox-LDL分别孵育RAW264.7和THP-1来源的巨噬细胞,以模拟体内泡沫细胞的形成与发展过程。从泡沫细胞中炎症因子的分泌、细胞凋亡以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平来比较不同来源的巨噬细胞源性泡沫细胞模型的生物学特征。催化色氨酸(tryptophan, Trp)分解代谢的犬尿氨酸代谢途径(kynurenine pathway, KP)在AS发生中起重要作用,但作用机制尚不明确^[28]。吲哚胺2,3-双加氧化酶1(indoleamine 2,3 dioxygenase 1, IDO1)作为KP首个限速酶,其在不同泡沫细胞模型中的活性变化及系统比较在国内外仍无报道。

本研究首次在不同巨噬细胞源性泡沫细胞内检测并比较IDO1的活性变化,旨在为AS的发病机制及治疗方法提供新思路。

材 料 和 方 法

试剂和药品 人类单核细胞系THP-1为复旦大学药学院楼滨教授所赠;鼠单核细胞系RAW264.7(中国科学院细胞库);ox-LDL(上海经科化学科技有限公司);佛波酯(PMA)(美国Sigma-Aldrich公司);油红O(上海源叶生物科技有限公司);RPMI 1640细胞培养基、胎牛血清(美国Gibico公司);细胞凋亡检测试剂盒(上海翊盛生物科技有限公司);MDA检测试剂盒、ROS检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);实时定量PCR试剂盒(日本Takara公司);Trizol(美国Thermo Fisher公司);AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)。其余试剂为国产分析纯或色谱纯。

仪器和设备 Calibur流式细胞仪(美国BD公司);CFX96 Touch基因扩增仪(美国Bio-Rad公司);超低温冰箱、恒温培养箱、高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司);高效液相色谱仪(美国Agilent公司);倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);多功能酶标仪(美国BioTek公司)。

THP-1细胞培养及泡沫细胞模型构建 在恒温培养箱(37℃、5% CO₂)中,采用含有RPMI 1640培养基(含50 mg/mL链霉素、50 U/mL青霉素和20% FBS)培养THP-1单核细胞至指数生长期。按照10⁴~10⁵个/mL的密度接种于6孔培养板内。

为使 THP-1 单核细胞分化形成 THP-1 巨噬细胞,更换无血清培养基继续培养细胞,并加入 10 nmol/L PMA 处理细胞 48 h。对照组用 RPMI 1640 基础培养基培养。建模组待细胞贴壁后,吸去上清,更换为含 3% FBS 的 RPMI 1640 培养基,并加入 ox-LDL (终浓度为 25 mg/L)处理 24 h,即得人源 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型^[30]。

RAW264.7 细胞培养及泡沫细胞模型构建

在恒温培养箱(37 ℃、5 %CO₂)中,采用 RPMI 1640 培养基(含 50 mg/mL 链霉素、50 U/mL 青霉素和 10% FBS)培养 RAW264.7 细胞至指数生长期。按照 10⁴~10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板内。对照组用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。建模组待细胞贴壁后,吸去上清,更换为含 3% FBS 的 RPMI 1640 培养基,并加入 ox-LDL (终浓度为 25 mg/L)处理 24 h,即得鼠源 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞模型^[31]。

油红 O 染色 将 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞均匀接种于 6 孔板内,待 ox-LDL 诱导建模结束后吸去上清,用预冷的 PBS 多次洗涤细胞,在细胞表面加入 4 % 甲醛固定液,室温孵育 30 min 后用 PBS 洗涤,再用预冷的 60% 异丙醇清洗 1 次。在细胞表面加入 60% 油红 O 染色液,室温下染色 30 min。去除细胞表面油红 O 染色液,并用预冷的 60% 异丙醇清洗 2 次,将油红 O 染料完全洗净。加入 200 μL PBS,在荧光倒置显微镜下观察泡沫细胞形态及脂质富集情况^[13]。

qRT-PCR 检测炎症因子表达 利用 Trizol 法提取 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞总 RNA,取 2 μg RNA,利用基因扩增仪进行逆转录,获得 cDNA 模板,按照 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 说明书对样品进行处理,使用 CFX96Touch 基因扩增仪进行 qRT-PCR,在 Bio-Rad CFX Manager 软件中分析结果^[13]。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence of qRT-PCR

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>hIL-1β</i>	GCTGAGGAAG ATGCTGGTTC	TCCATATCCTGTCCC TGGAG
<i>hIL-10</i>	CCCTGTGAAAACAAGAGCAAGG	ACCCTGATGTCTCAGTTTCGT
<i>hIL-6</i>	AAATTTCGGTACATCCTCGACGG	GGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCTGC
<i>hTGF-β</i>	AACAGCAGCAGCGACCAG	GGAGTTCAGAGGGAAGGCAC
<i>mIL-1β</i>	CTGGTGTGTGACGTTCCCAT	TCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
<i>mIL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>mIL-6</i>	CAGTGGGATCAGCACTAACAGA	GTTGCCAGGTGGGTAAAGTG
<i>mTGF-β</i>	AAGACTTCACCCAAAGCTGG	TGAGCGCTCTCTGAGATCCAA

流式细胞术检测细胞凋亡 收集经 ox-LDL 处理的 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞,4 ℃ 下 300 × g 离心 100 min 后收集沉淀,加入 1 × 结合缓冲液 (100 μL) 轻轻吹打,待沉淀完全溶解后分别加入 Annexin V-FITC (5 μL) 和 PI (10 μL),剧烈震荡,混匀细胞,室温下避光静置 15 min,加入 1 × 结合缓冲液,通过 FACS Calibur 流式细胞仪进行流式细胞术分析^[13]。

ROS 水平测定 将 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞均匀接种在 96 孔板内,加入 ox-LDL 孵育 24 h 后,更换 RPMI1640 基础培养基配制的 DCFH-DA 工作液 (1:3 000 稀释),37 ℃ 恒温培养箱内避光培养 20 min。用基础培养基反复洗涤细胞,以 488 nm 为激发波长,530 nm 为检测波长,利用荧光酶标仪检测 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞内荧光强度,以示 ROS 水平。

MDA 含量测定 收集经 ox-LDL 处理的 RAW264.7 和 THP-1 巨噬细胞,沉淀于离心管内,充分裂解细胞,12 000 × g 离心 10 min,弃沉淀,利用 BCA 蛋白质浓度检测试剂盒检测蛋白质浓度并计算 MDA 单位重量的蛋白质含量。在离心管中加入 100 μL 样品上清,加入不同浓度的标准品绘制标准曲线,随后加入等体积的 MDA 检测工作液。在 100 ℃ 预热的干浴锅内加热 15 min,冷却至室温,1 000 × g 离心 10 min 后弃沉淀,在 96 孔板内加入上清,荧光酶标仪以 532 nm 为检测波长测定吸光度值,计算 MDA 摩尔浓度。根据说明书计算公式,计算最初 RAW 264.7 和 THP-1 巨噬细胞的 MDA 含量。

HPLC 检测 IDO1 活性 分别取 100 μL 经 ox-LDL 处理的 RAW 264.7 和 THP-1 巨噬细胞上清液,去蛋白质处理后上机测定 Trp 和 犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 含量,测定值为实际浓度的 1/3。

色谱条件:流动相为乙酸钠-乙酸溶液(15 mmol/L,含体积分数为6%的乙腈,pH=3.6);色谱柱为Agilent Technologies C18柱(250 nm×4.6 mm,5 μm);柱温30℃;进样体积20 μL;流速1.0 mL/min;Trp和Kyn的紫外监测波长分别为280和360 nm^[32]。根据Trp和Kyn的峰面积,利用标准曲线法计算RAW264.7和THP-1巨噬细胞上清中Trp和Kyn含量,以(Kyn/Trp浓度)×100来表示细胞上清中IDO1活性。

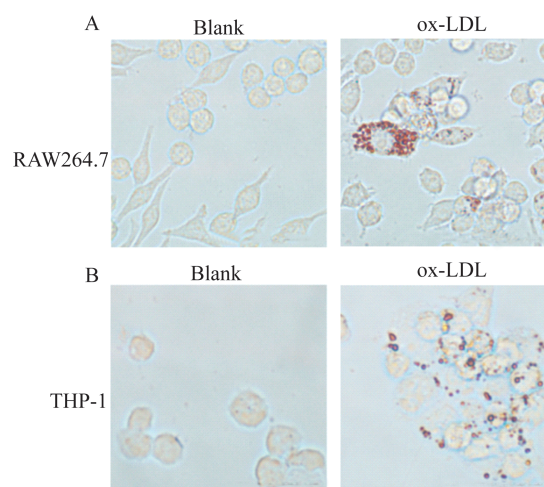
统计学方法 使用SPSS 20.0统计软件进行分析。所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,重复3次以上。用 t 检验分析两组数据间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

鼠、人源巨噬细胞源性泡沫模型建立及泡沫细胞形态变化 油红O染色结果如图1所示。对照组鼠源RAW264.7巨噬细胞内未见红色脂质富集,细胞形态为梭形;而经过ox-LDL诱导的细胞内可见大量红色脂质富集,呈环状整齐排列在细胞膜内侧,细胞多为扁圆形,这一现象表明泡沫细胞已经形成(图1A)。对照组人源THP-1巨噬细胞几乎无红色脂质沉积,细胞形态为圆形;经ox-LDL诱导后,红色脂质明显增多,在细胞内均匀散落分布,细胞仍为圆形成团聚集,表明泡沫细胞已经形成(图1B)。两种巨噬细胞源性泡沫细胞模型均构建成功,并存在不同的脂滴分布及形态变化。

ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞内炎症因子的影响 qRT-PCR的结果如图2所示。对照组鼠源RAW264.7巨噬细胞内IL-10、IL-1β、IL-6和TGF-β等4种炎症因子在mRNA水平的表达均偏低,经ox-LDL诱导后,细胞内炎症因子的表达均升高,其中IL-10、IL-6和TGF-β表达大幅度升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A)。对照组人源THP-1巨噬细胞中,IL-10、IL-1β、IL-6和TGF-β表达水平较低;经ox-LDL诱导后,IL-10、IL-1β和TGF-β表达均明显上调($P < 0.05$,图2B),IL-6表达虽有近2倍的升高,但差异无统计学意义。ox-LDL会引起不同来源的巨噬细胞内炎症因子表达升高,并加剧巨噬细胞中的炎症反应。

ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞凋亡的影响 利用流式细胞术检测细胞凋亡比率,并对3次独立实验



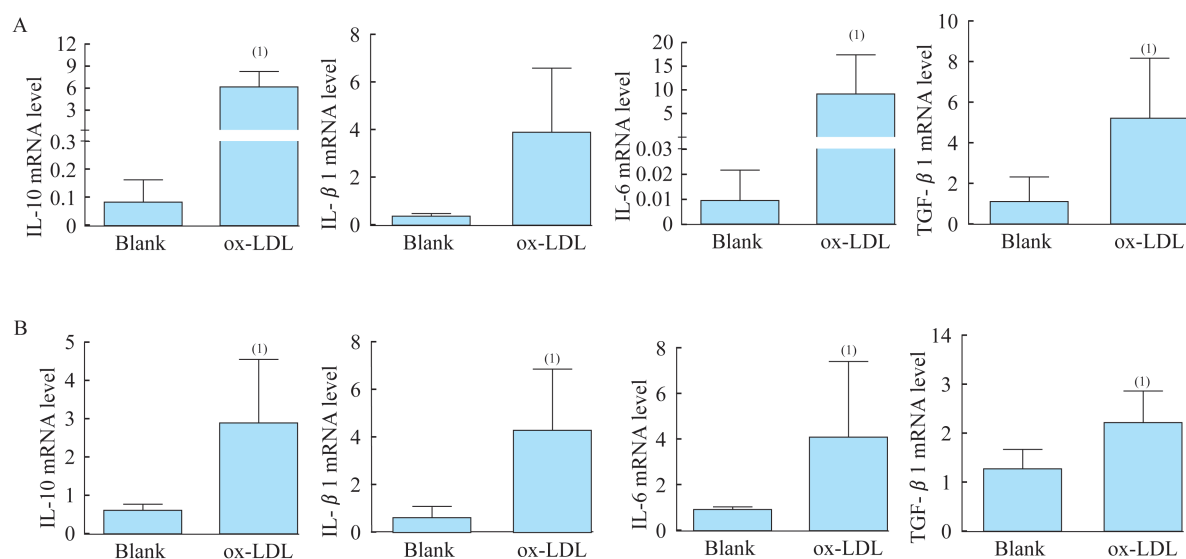
RAW264.7 (A) and THP-1 (B) macrophages were incubated with ox-LDL for 24 h to form foam cells. Data were based on at least 3 independent experiments.

图1 鼠、人源巨噬细胞及泡沫细胞的油红染色结果(×600)

Fig 1 Oil-red staining of mouse/human macrophages and foam cells (×600)

的各别总细胞凋亡率(晚期细胞与早期细胞凋亡百分比之和)进行统计(图3)。发现鼠源RAW264.7巨噬细胞自然凋亡率为 $9.57\% \pm 0.44\%$,经ox-LDL处理后细胞凋亡率有所升高($10.36\% \pm 0.68\%$),但差异无统计学意义(图3A)。人源THP-1巨噬细胞自然凋亡率为 $11.26\% \pm 8.71\%$,经ox-LDL处理24 h后细胞凋亡比率显著增加($26.41\% \pm 13.15\%$, $P < 0.05$,图3B)。ox-LDL可引起两种不同来源的巨噬细胞出现不同程度的凋亡,其中人源THP-1巨噬细胞对ox-LDL更为敏感。

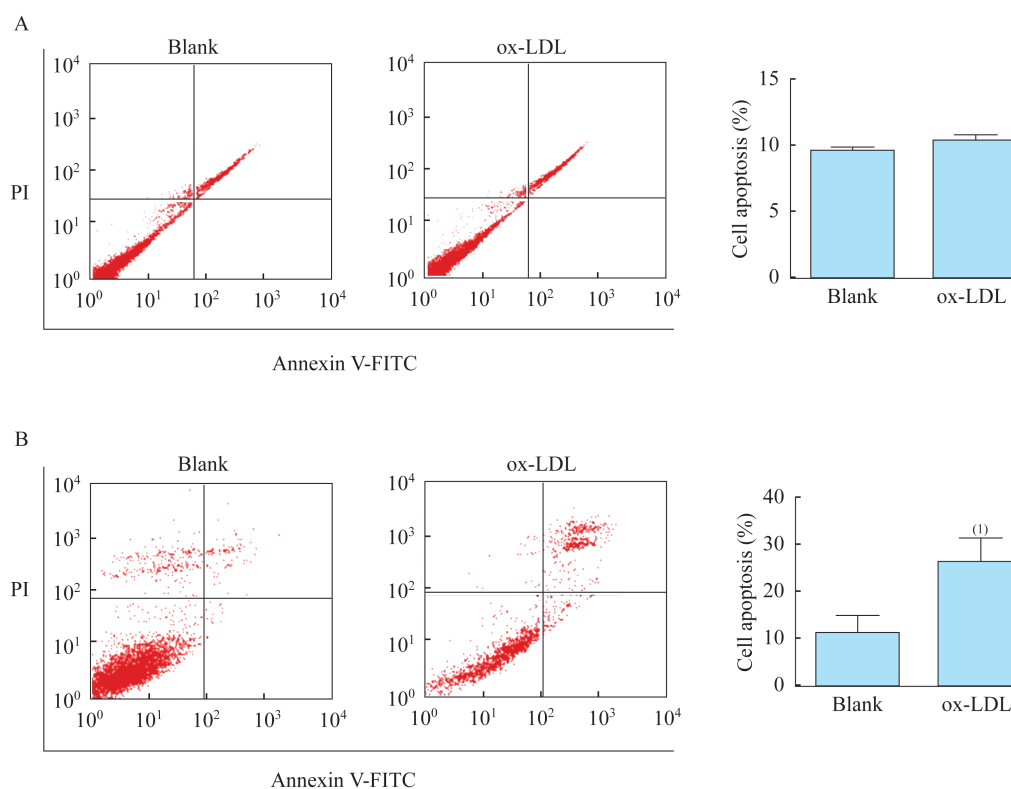
ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞ROS和MDA的影响 ROS检测结果显示,对照组鼠源RAW264.7巨噬细胞的ROS荧光强度为 48.79 ± 6.41 ,加入ox-LDL共孵育24 h后,细胞内ROS荧光强度达到 56.86 ± 9.12 ,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4A)。对照组人源THP-1巨噬细胞的ROS荧光强度为 46.69 ± 3.69 ,加入ox-LDL共孵育24 h后,细胞内ROS荧光强度显著升高(59.50 ± 12.33 , $P < 0.05$,图4B)。MDA检测结果显示,对照组鼠源RAW264.7和人源THP-1巨噬细胞中MDA含量分别为 $(0.511 \pm 0.219) \times 10^3$ 和 $(1.30 \pm 0.081) \times 10^3 \mu\text{mol/mg}$,加入ox-LDL诱导后,两种来源巨噬细胞内MDA水平均明显升高($P < 0.05$,图4C、4D)。ox-LDL可促使不同来源巨噬细胞中ROS和MDA上调,进而引发细胞的脂质过氧化反应。



RAW264.7 (A) and THP-1 (B) macrophages were incubated with ox-LDL for 24 h. The mRNA levels were measured by qRT-PCR. Data were based on at least 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

图2 ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞内炎症因子mRNA水平的影响

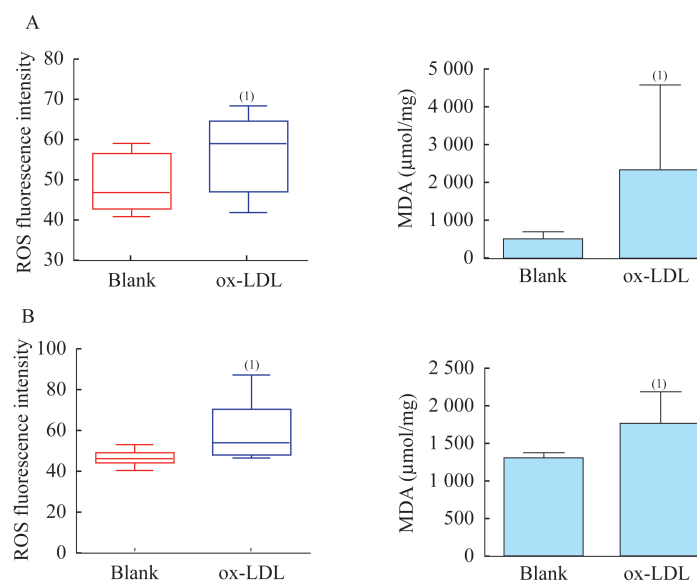
Fig 2 The effect of ox-LDL on the mRNA levels of inflammatory factors in mouse/human macrophages



RAW264.7 (A) and THP-1 (B) macrophages were incubated with ox-LDL for 24 h. PI was used for nucleus staining's and Annexin V-FITC was used for cytomembrane staining. The first quadrant represented cellular debris and damaged cells. The second and the third quadrant represented apoptosis cells in late or early stage respectively. The fourth quadrant represented normal cells. The total cell apoptosis was the sum of the percentage of late cell and early cell apoptosis. Data were based on at least 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

图3 ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞凋亡的影响

Fig 3 The effect of ox-LDL on the apoptosis of mouse/human macrophages



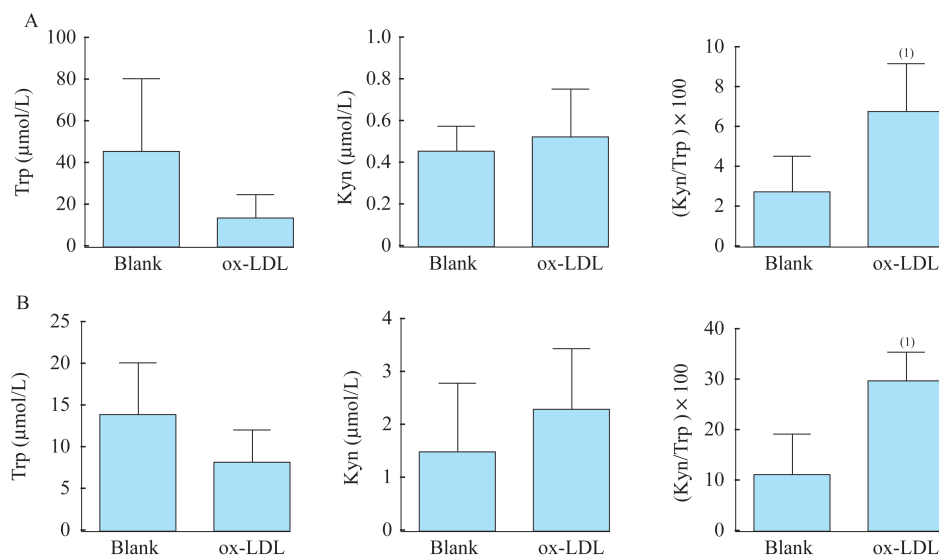
RAW264.7 (A) and THP-1 (B) macrophages were incubated with ox-LDL for 24 h. Data were based on at least 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

图4 ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞内ROS和MDA水平的影响

Fig 4 The effect of ox-LDL on the levels of ROS and MDA in mouse/human macrophages

ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞内IDO1活性的影响 HPLC检测结果显示,相较于对照组,鼠源RAW264.7巨噬细胞加入ox-LDL导致Trp浓度下降近60%,此时Kyn浓度有所升高,但差异无统计学意义。KP代谢限速酶IDO1活性由Kyn/Trp来表示^[20]。与对照组相比,加入ox-LDL使鼠源RAW264.7巨噬细胞内IDO1活性升高近2.4倍,

差异有统计学意义($P < 0.05$,图5A)。人源THP-1巨噬细胞中加入ox-LDL诱导后,细胞内Trp被消耗约40%,随着Kyn浓度升高,IDO1活性(Kyn/Trp)升高近3倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5B,表2)。ox-LDL可上调RAW264.7和THP-1巨噬细胞内IDO1活性并激活KP。



RAW264.7 (A) and THP-1 (B) macrophages were incubated with ox-LDL for 24 h. The activity of IDO1 was represented by the ratio of Kyn/Trp. Data were based on at least 3 independent experiments. ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

图5 ox-LDL对鼠、人源巨噬细胞中KP代谢限速酶IDO1活性的影响

Fig 5 The effect of ox-LDL on the activity of IDO1 (KP rate-limiting enzyme) in mouse/human macrophages

表 2 鼠、人源巨噬细胞中 Trp、Kyn 浓度和 Kyn/Trp 比值
Tab 2 Serum concentrations of Trp, Kyn and the ratio of Kyn/Trp in mouse/human macrophages ($\bar{x} \pm s$)

Index	RAW264. 7	RAW264. 7 + ox-LDL	THP-1	THP-1 + ox-LDL
Trp ($\mu\text{mol/L}$)	45. 4 \pm 35. 3	13. 6 \pm 11. 3	14. 16 \pm 6. 13	8. 31 \pm 3. 84
Kyn ($\mu\text{mol/L}$)	0. 46 \pm 0. 13	0. 53 \pm 0. 24	1. 52 \pm 1. 30	2. 30 \pm 1. 18
(Kyn/Trp) \times 100	2. 82 \pm 1. 73	6. 75 \pm 2. 46	11. 2 \pm 8. 03	29. 6 \pm 6. 07

讨 论

AS 是一种由不良的适应性免疫反应所驱动的慢性炎症疾病^[21]。单核-巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞参与 AS 的发生、发展^[22]。ox-LDL 是公认的诱导血管内壁炎症反应的主要危险因素之一,可以诱导单核细胞分化成巨噬细胞,并激活巨噬细胞内的免疫反应,随后引发脂质积累和泡沫细胞形成,在 AS 的发生、发展过程中起着至关重要的作用^[23-24]。ox-LDL 诱导构建的不同泡沫细胞模型常应用于不同的研究中,因此明确不同来源的泡沫细胞在 AS 发生、发展过程中的生物学特征,对于进一步阐述 AS 机制具有重要意义^[13-14]。本研究通过给予巨噬细胞 ox-LDL 成功建立鼠源 RAW264. 7 和人源 THP-1 巨噬细胞泡沫细胞模型。通过油红 O 染色实验发现,大量红色脂质颗粒在不同来源的巨噬细胞内富集,但分布略有不同,这与以往的研究结果相符合。巨噬细胞大量吞噬脂蛋白形成泡沫细胞后,会分泌各种细胞因子,从而进一步影响局部炎症反应以及细胞黏附、增殖等特征,最终导致 AS 病灶形成^[25]。本研究发现 ox-LDL 可以引发 RAW264. 7 和 THP-1 巨噬细胞大量分泌 IL-10、IL-1 β 、IL-6 和 TGF- β ,从而在细胞内引发剧烈的炎症反应,但这些细胞因子参与的炎症信号传导通路目前尚不清楚。

ox-LDL 会通过一些信号通路诱发较强的细胞毒性作用,最终可导致巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞的退化凋亡^[26]。本研究发现相同浓度 ox-LDL 诱导后,THP-1 凋亡比率增加近 2 倍,而 RAW264. 7 凋亡比率基本不变。这一结果证明,ox-LDL 会引起不同来源的巨噬细胞产生不同的凋亡特性,THP-1 对 ox-LDL 引起的细胞凋亡更为敏感。在今后的研究中,选取人源 THP-1 巨噬细胞探索 ox-LDL 诱导的巨噬细胞凋亡信号通路更具科学性。LDL 是导致 AS 病灶区脂质堆积的主要原因之一,

而 ox-LDL 含有的氧化成分会对巨噬细胞造成额外的氧化损伤,过多摄入 ox-LDL 更易促使巨噬细胞破裂死亡,最终加速 AS 斑块形成^[27]。本研究结果显示,加入 ox-LDL 不仅会造成鼠源 RAW264. 7 和人源 THP-1 巨噬细胞内脂质沉积,同时也显著上调细胞内 ROS 和 MDA 表达,从而诱发脂质过氧化并直接对细胞造成损伤。因此,减少巨噬细胞的氧化损伤,增强巨噬细胞的抗氧化能力对 AS 的防治与治疗具有重要意义。

活化的 KP 对 AS 发生发展至关重要,IDO1 作为 KP 的首个限速酶,其活性与早期 AS 发生呈显著正相关^[28-29]。在鼠源 RAW264. 7 巨噬细胞和人源 THP-1 巨噬细胞中,ox-LDL 都会引起 IDO1 活显著上调,表明 ox-LDL 会激活不同来源的巨噬细胞的 KP。同时在细胞水平上证实,KP 代谢限速酶 IDO1 活性与泡沫细胞的形成呈正相关,我们认为 IDO1 活性可以作为泡沫细胞形成的标志,但其是否可以作为 AS 形成的生物指标还有待进一步研究。抑制 IDO1 活性或 KP 途径的代谢产物或可为阻断 AS 的发展提供新的治疗思路,IDO1 抑制剂或将成为预防 AS 的新型治疗药物。

综上所述,RAW264. 7 和 THP-1 细胞均可作为研究 AS 发生发展机制提供稳定可靠的泡沫细胞模型,不同来源的泡沫细胞模型的生物学特征不完全相同。针对不同的生物学特征,选择合适的细胞模型,将使今后的研究更具有针对性、科学性。通过 ox-LDL 对鼠源 RAW264. 7 和人源 THP-1 巨噬细胞产生的多种影响,我们认为减缓 ox-LDL 引起的炎症反应,防止巨噬细胞内的脂质富集,减少巨噬细胞内脂质氧化损伤,选择性调控 ox-LDL 引发的凋亡和 KP 激活或将成为有效治疗 AS 的手段。

参 考 文 献

[1] HANSSON GK, LIBBY P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(7): 508-519.

- [2] MCLAREN JE, MICHAEL DR, ASHLIN TG, *et al.* Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells; Implications for cardiovascular disease therapy[J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50(4): 331 - 347.
- [3] LUSIS AJ. Atherosclerosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 233 - 241.
- [4] CHINETTI-GBAGUIDI G, STAELS B. Lipid ligand-activated transcription factors regulating lipid storage and release in human macrophages[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(6): 486 - 493.
- [5] HATTORI Y, HATTORI S, KASAI K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor- κ B activation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 481(2-3): 153 - 158.
- [6] TOUSOULIS D, PSARROS C, DEMOSTHENOUS M, *et al.* Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease; the emerging role of statins[J]. *J Am Cell Cardiol*, 2014, 63(23): 2491 - 2502.
- [7] MOORE KJ, TABAS I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145(19): 341 - 355.
- [8] CHISTIakov DA, OREKHOV AN, BOBRYshev YV. Lox-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1851 - 1859.
- [9] DAIGNEAULT M, PRESTON JA, MARRIOTT HM, *et al.* The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP1 cells and monocyte-derived macrophages[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8668.
- [10] AUWERX J. The human leukemia cell line, THP-1; a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation[J]. *Experientia*, 1991, 47(1): 22 - 31.
- [11] LIU H, WANG X L, QIU Y, *et al.* Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of Ginkgo biloba, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2-3): 138 - 145.
- [12] FU Y, LUO N, LOPES-VIRELLA MF, *et al.* The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages[J]. *Atherosclerosis*, 2003, 165(2): 259 - 269.
- [13] LIANG C, WANG X, HU J, *et al.* PTPRO promotes oxidized low-density lipoprotein induced oxidative stress and cell apoptosis through Toll-like receptor 4/nuclear factor κ B pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*. 2017, 42(2): 495 - 505.
- [14] CHEN L, YANG W, GUO Y, *et al.* Exosomal ncRNA GAS5 regulates the apoptosis of macrophages and vascular endothelial cells in atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185406.
- [15] LIU Q, DAI Z, LIU Z, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein activates adipophilin through ERK1/2 signal pathway in RAW264. 7 cells. [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(9): 635 - 645.
- [16] KIM JS, PARK DW, LEE HK, *et al.* Early growth response-1 is involved in foam cell formation and is upregulated by the TLR9-MyD88-ERK1/2 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(2): 196 - 200.
- [17] XIE S, LEE YF, KIM E, *et al.* TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation[J]. *Proc Natl Sci USA*, 2009, 106(32): 13353 - 13358.
- [18] HONG-FENG GU, HAI-ZHE LI, YA-LING TANG, *et al.* Nicotinate-curcumin impedes foam cell formation from THP-1 cells through restoring autophagy flux[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154820.
- [19] HAN XB, LI HX, JIANGYQ, *et al.* Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces autophagy and cholesterol efflux of macrophage-derived foam cells via ROS generation[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2864.
- [20] URATA Y, KOGA K, HIROTA Y, *et al.* IL-1b increases expression of Tryptophan 2, 3-dioxygenase and stimulates Tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2014, 72(5): 496 - 503.
- [21] POLYZOS KA, KETELHUTH DF. The role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease. An emerging field [J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(2): 128 - 136.
- [22] CHERNYAVSKIY I, VEERANKI S, SEN U, *et al.* Atherogenesis; hyperhomocysteinemia interactions with LDL, macrophage function, paraoxonase 1, and exercise[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1363: 138 - 154.
- [23] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis; current pathogenesis and therapeutic options[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410 - 1422.
- [24] TEDGUI A, MALLAT Z. Cytokines in atherosclerosis; pathogenic and regulatory pathways[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 515 - 581.
- [25] SUN Y, ISHIBASHI M, SEIMON T, *et al.* Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K[J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 455 - 465.
- [26] BUSTAMANTE M, DÍAZ F, MUÑOZ M, *et al.* Oxidized low density lipoproteins induce apoptosis in human lymphocytes; involvement of mitogen-activated protein kinases[J]. *Cell Mol Biol*, 2007, 53(5): 954 - 964.
- [27] SEIMON T, TABAS I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S382 - S387.
- [28] NIINISALO P, RAITALA A, PERTOVAARA M, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors; the Health 2000 study[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, 68(8): 767 - 770.
- [29] ZHANG L, OVCHINNIKOVA O, JONSSON A, *et al.* The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(16): 2025 - 2034.

- [30] REISS AB, CARSONS SE, ANWAR K, *et al.* Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 58(12):3675-3683.
- [31] 周云, 沃兴德, 卢德赵. RAW264. 7 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(9):687-690.
- [32] 陈月, 康宏艳, 胡楠. 基于 HPLC 的标准加入法同时测定小鼠血清中犬尿氨酸和色氨酸[J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(6):704-709.
- (收稿日期:2018-08-31;编辑:段佳)

(上接第 444 页)

- [17] WU X, WANG R, JIAO J, *et al.* Transglutaminase 3 contributes to malignant transformation of oral leukoplakia to cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 104:34-42.
- [18] WU X, CAO W, WANG X, *et al.* TGM3, a candidate tumor suppressor gene, contributes to human head and neck cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1):151.
- [19] STACEY SN, SULEM P, GUDBJARTSSON DF, *et al.* Germline sequence variants in TGM3 and RGS22 confer risk of basal cell carcinoma[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(11):3045-3053.
- [20] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN-ATALAY R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7):1946-1954.
- [21] BUROTTI M, CHIOU VL, LEE JM, *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective [J]. *Cancer*, 2014, 120(22):3446-3456.
- [22] ZHANG Q, LENARDO M J, BALTIMORE D. 30 years of NF-kappaB: a blossoming of relevance to human pathobiology[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2):37-57.
- [23] GONZALEZ DM, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344):re8.
- [24] ZHOU SL, ZHOU ZJ, HU ZQ, *et al.* CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3beta/Snail signaling[J]. *Cancer letters*, 2015, 358(2):124-135.
- [25] VLAHOPOULOS SA. Aberrant control of NF-kappaB in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode [J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(3):254-270.
- [26] VLAHOPOULOS SA, CEN O, HENGGEN N, *et al.* Dynamic aberrant NF-kappaB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(4):389-403.
- [27] SMITH BN, BHOWMICK NA. Role of EMT in metastasis and therapy resistance[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(2):E17.
- [28] MICALIZZI DS, FARABAUGH SM, FORD HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2):117-134.
- [29] 王颢, 刘锋. COL3A1 促进结直肠癌生长及潜在调控机制 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2018, 45(3):285-290.
- (收稿日期:2019-01-04;编辑:王蔚)