

沉默 CXCL12 抑制 ox-LDL 诱导 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 泡沫化和凋亡

庄红, 张苏川*, 刘慧地, 徐亚宁, 黄璐, 代天, 蒋品
(江汉大学附属医院(武汉市第六医院)心血管内科, 湖北武汉 430015)

摘要:目的 探讨 CXC 趋化因子配体 12(CXCL12)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 泡沫化和凋亡的作用及其机制。方法 用 60 mg/L 的 ox-LDL 诱导 RAW264.7 泡沫化,记为 ox-LDL 组,不添加 ox-LDL 的作为对照(NC)组;将 si-con 和 si-CXCL12 转染至 RAW264.7 细胞中再用 60 mg/L 的 ox-LDL 处理,分别记为 ox-LDL+si-con 组、ox-LDL+si-CXCL12 组。油红 O 染色法检测细胞泡沫化;Western blot 检测 ABCA-1、SRB-1、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、CXCL12、p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达;流式细胞计量术检测细胞凋亡;RT-qPCR 检测 CXCL12 mRNA 表达。结果 ox-LDL 处理的 RAW264.7 细胞体积增大,形状变为圆形,胞质中可明显见到大量红色脂滴;ABCA-1 和 SRB-1 表达水平显著升高($P<0.05$),cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 表达水平显著升高($P<0.05$),细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),CXCL12 表达水平显著升高($P<0.05$),p-p38MAPK 表达水平显著升高($P<0.05$)。沉默 CXCL12,大部分细胞内未见红染脂滴,仅少数细胞内有部分脂滴,ABCA-1 和 SRB-1 表达水平显著降低($P<0.05$),cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 表达水平显著降低($P<0.05$),细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),p-p38MAPK 表达水平显著降低($P<0.05$)。结论 沉默 CXCL12 抑制 ox-LDL 诱导巨噬细胞 RAW264.7 泡沫化和细胞凋亡,其可能与 p38MAPK 信号通路有关。

关键词: CXC 趋化因子配体 12;氧化低密度脂蛋白;巨噬细胞泡沫化;凋亡

中图分类号:R541.4 文献标志码:A

Silenced CXCL12 inhibits ox-LDL-induced foaming and apoptosis in mouse macrophage cell line RAW264.7

ZHUANG Hong, ZHANG Su-chuan*, LIU Hui-di, XU Ya-ning, HUANG Lu, DAI Tian, JIANG Pin
(Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Jianghan University(Wuhan Sixth Hospital), Wuhan 430015, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL)-induced foaming and apoptosis of macrophages. **Methods** RAW264.7 was incubated with 60 mg/L of ox-LDL to induce foaming of macrophages, which was recorded as ox-LDL group, and to compare with the control without ox-LDL; si-con and si-CXCL12 were transfected to RAW264.7 cells and then incubated with ox-LDL at 60 mg/L as ox-LDL+si-con group and ox-LDL+si-CXCL12 group, respectively. Oil Red O staining was used to detect cellular foaming; Western blot was used to detect ABCA-1, SRB-1, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, CXCL12, p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and phosphorylated p38MAPK (p-p38MAPK) protein expression; flow cytometry is used to detect apoptosis; CXCL12 mRNA expression was measured by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** The size of ox-LDL-treated

macrophages increased, the shape became round, and a large number of red lipid droplets were found in the cytoplasm; the expression of ABCA-1 and SRB-1 and cleaved caspase-3 as well as cleaved caspase-9 were all significantly increased; the apoptosis rate and the expression of CXCL12 and p-p38MAPK were significantly increased ($P < 0.05$). Silencing CXCL12, no red-stained lipid droplets were found in most cells, only a few cells had partial lipid droplets, the expressions of ABCA-1 and SRB-1 were significantly reduced, and the expression of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9, apoptosis rate and the expression of p-p38MAPK significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** Silencing CXCL12 inhibits ox-LDL-induced foaming and apoptosis of mouse macrophage cell line RAW264.7, which may be related to the p38MAPK signaling pathway.

Key words: CXC chemokine ligand 12; oxidized low density lipoprotein; macrophage foaming; apoptosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康和生活质量的疾病之一,揭示 AS 发生发展的关键因素,对有效预防和治疗 AS 具有重要意义^[1]。巨噬细胞参与的脂质代谢障碍是 AS 的病变基础;巨噬细胞泡沫化和凋亡是导致 AS 斑块不稳定的重要因素;干预巨噬细胞泡沫化和凋亡可对阻止 AS 进展、防治心脑血管病的发生具有重要意义^[2]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)是 AS 的重要危险因素,其可以结合巨噬细胞表面的清道夫受体,促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL,造成脂质积聚,进而形成泡沫细胞^[3]。CXC 趋化因子配体 12(CXC chemokine ligand 12, CXCL12)是 CXC 趋化因子家族的成员,又称基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1),稳定和不安定的颈动脉粥样斑块中 CXCL12 的表达增加,且定位在巨噬细胞中^[4]。p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)是调控免疫炎症反应最主要的 MAPK 家族成员之一,可通过调节炎症反应影响 AS 的进展^[5]。本实验旨在研究 CXCL12 对 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化和凋亡作用及其机制是否与 p38MAPK 信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7(上海北诺生物科技有限公司);胎牛血清和 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司);氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)(广州奕源生物科技有限公司);油红 O(Sigma-Aldrich 公司);苏木精(上海源叶生物科技有限公司);异丙醇(天津市化学试剂

三厂);蛋白提取试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒(碧云天生物技术研究);抗体(Cell Signaling Technology 公司);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);Trizol 试剂、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒(Progema 公司);载体质粒(北京普瑞金科技有限公司);Lipofectamine™ 2000 转染试剂(Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养与分组:用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 RAW264.7 细胞,待细胞汇合至 90%左右时,进行传代,取对数增殖期 RAW264.7 细胞,接种于 6 孔板,培养 24 h 后用 60 mg/L 的 ox-LDL 处理 24 h 诱导巨噬细胞泡沫化,记为 ox-LDL 组,不添加 ox-LDL 的作为对照(NC)组;将 si-con、si-CXCL12 转染至 RAW264.7 细胞中再用 60 mg/L 的 ox-LDL 处理,分别记为 ox-LDL+si-con 组、ox-LDL+si-CXCL12 组。

1.2.2 油红 O 染色观察细胞形态:细胞去上清后用 PBS 洗涤 3 次,10%甲醛固定 30 min,再用 PBS 洗涤 2 次,用 60%异丙醇浸洗 5 min,吸去异丙醇,加入油红 O,置于 60 °C 烤箱中染色 30 min,蒸馏水清洗 3 次,苏木精染色 5 min,蒸馏水洗蓝化 1~3 min,控干,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.3 Western blot 检测三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A1(ABCA-1)、B 类 1 型清道夫受体(SRB-1)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(cleaved

caspase-9)、CXCL12、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 和磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 蛋白表达:培养细胞 48 h 后提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 后转至聚偏二氟乙烯膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,再分别加入一抗(1:1 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜;加入二抗(1:2 000)室温孵育 90 min, TBST 洗涤,用 ECL 发光液显影,用 ChemiDoc XRS+ 系统成像,用 Quantity One 凝胶分析软件测定各组蛋白条带的吸光度值,蛋白相对表达水平=目的条带吸光度值/ β -actin 条带吸光度值。每个蛋白样品设 3 个重复。

1.2.4 流式细胞计量术检测细胞凋亡:培养细胞 48 h 后用预冷的 PBS 漂洗 2 次,与 500 μ L 的结合缓冲液混匀。先加入 10 μ L 的 annexin V-FITC,再加入 5 μ L 的 PI,混匀后避光孵育 10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.5 RT-qPCR 检测 CXCL12 mRNA 表达水平:培养细胞 48 h 后提取细胞总 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,CXCL12 以 β -actin 为内参进行 PCR 扩增,每

个样品重复 3 次,循环条件为 95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环;60 °C 延长 5 min。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。CXCL12 上游引物序列:5'-TTCCATTTGCAAGGGAAAAG-3',下游引物序列:5'-ACACACAGCCAGTCAACGAG-3'; β -actin 上游引物序列:5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3',下游引物序列:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTC-3'。

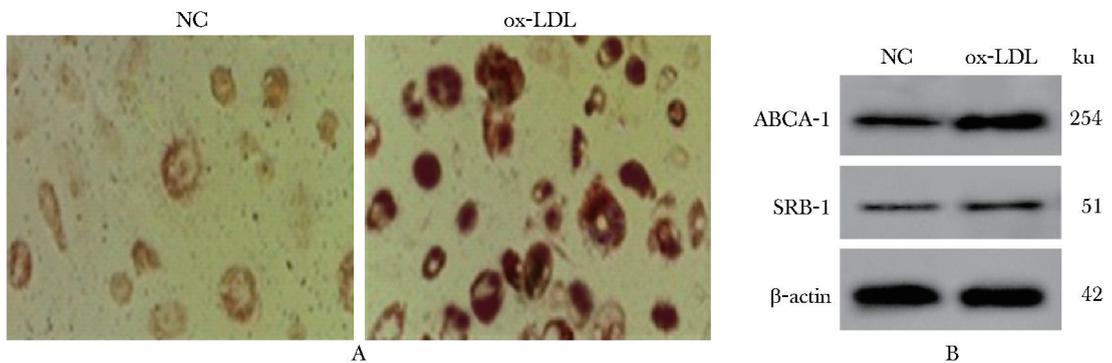
1.3 统计学分析

实验数据经 SPSS 20.0 分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 ox-LDL 诱导巨噬细胞 RAW264.7 泡沫化

对照组大部分细胞内未见红染脂滴,仅少数细胞内有少量脂滴;ox-LDL 组细胞体积增大,形状变为圆形,胞质中可明显见到大量红色脂滴(图 1A)。与对照组相比,ox-LDL 组 ABCA-1 和 SRB-1 表达水平均显著升高($P<0.05$)(图 1B,表 1)。



A. Oil red O staining diagram($\times 200$); B. ABCA-1 and SRB-1 protein expression

图 1 RAW264.7 细胞油红 O 染色观察和 Western blot 检测巨噬细胞 ABCA-1 和 SRB-1 蛋白表达

Fig 1 RAW264.7 cell oil red O staining observation and Western blot detection of macrophage ABCA-1 and SRB-1 protein expression

表 1 ox-LDL 诱导巨噬细胞对 ABCA-1 和 SRB-1 蛋白表达的影响

Table 1 Effect of ox-LDL-induced macrophages on ABCA-1 and SRB-1 protein expression ($\bar{x}\pm s, n=9$)

group	ABCA-1	SRB-1
NC	0.38 \pm 0.05	0.15 \pm 0.03
ox-LDL	1.27 \pm 0.13*	0.42 \pm 0.05*

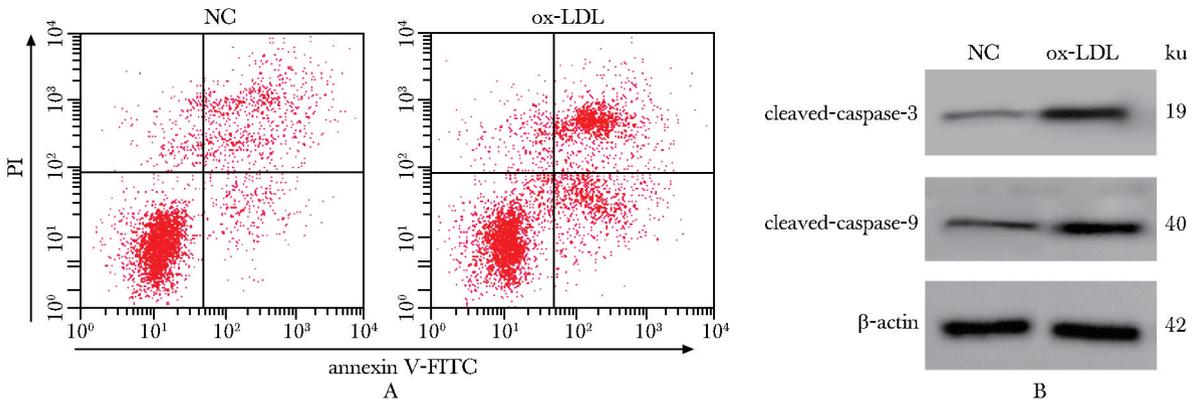
* $P<0.05$ compared with NC group.

2.2 ox-LDL 诱导巨噬细胞 RAW264.7 凋亡

与对照组相比,ox-LDL 组 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达水平显著升高,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)(图 2,表 2)。

2.3 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞 CXCL12 基因表达的影响

与对照组相比,ox-LDL 组 CXCL12 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)(图 3,表 3)。



A. flow cytometry detection of RAW264.7 cell apoptosis; B. Western blot detection of RAW264.7 cell cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 protein expression

图2 RAW264.7 细胞凋亡及 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白表达

Fig 2 RAW64.7 cell apoptosis, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 protein expression

表2 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞对细胞凋亡及 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白表达的影响

Table 2 Effects of ox-LDL-induced RAW264.7 cells on apoptosis and expression of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

group	cleaved caspase-3	cleaved caspase-9	apoptosis rate/%
NC	0.09±0.02	0.25±0.05	5.38±0.63
ox-LDL	0.49±0.07*	0.45±0.07*	15.76±1.75*

* $P < 0.05$ compared with NC group.

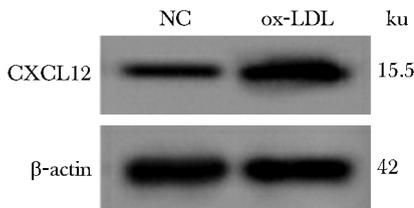


图3 Western blot 检测 RAW264.7 细胞 CXCL12 蛋白表达

Fig 3 Western blot detection of CXCL12 protein expression in RAW264.7 cells

表3 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞对 CXCL12 表达的影响

Table 3 Effect of ox-LDL induced RAW264.7 cells on the expression of CXCL12 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

group	CXCL12 mRNA	CXCL12 protein
NC	1.04±0.15	0.42±0.05
ox-LDL	3.38±0.38*	0.78±0.09*

* $P < 0.05$ compared with NC group.

2.4 沉默 CXCL12 基因对巨噬细胞 RAW264.7 泡沫化和凋亡的影响

ox-LDL+si-con 组大部分细胞形状为圆形,胞质中明显有大量红色脂滴;而 ox-LDL+si-con-CXCL12 组大部分细胞内未见红染脂滴,仅少数细胞内有部分脂滴(图 4A)。与 ox-LDL+si-con 组相比,ox-LDL+si-CXCL12 组 CXCL12 表达水平显著降低,ABCA-1、SRB-1 表达水平显著降低,cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达水平显著降低,细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)(图 4B~C,表 4)。

2.5 沉默 CXCL12 基因对巨噬细胞 RAW264.7 p38MAPK 信号通路的影响

与对照组相比,ox-LDL 组 p-p38MAPK 表达水平显著升高($P < 0.05$);与 ox-LDL+si-con 组相比,ox-LDL+si-CXCL12 组 p-p38MAPK 表达水平显著降低($P < 0.05$)(图 5,表 5)。

3 讨论

AS 是由脂质代谢失衡和动脉壁中含有胆固醇的巨噬细胞积聚驱动引起的一种慢性炎症性疾病,发病率和致死率高,对人体健康危害极大^[6]。巨噬细胞是机体免疫系统的重要一员,其泡沫化可导致 AS 病变,与 AS 形成和发展密切相关^[7]。本实验用 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化,结果表明 ox-LDL 处理可致巨噬细胞泡沫化,且可诱导巨噬细胞凋亡。患有动脉粥样硬化相关疾病的患者血清 CXCL12 水平显著增加^[8]。CXCL12 与 CXCR4 相互作用,激活

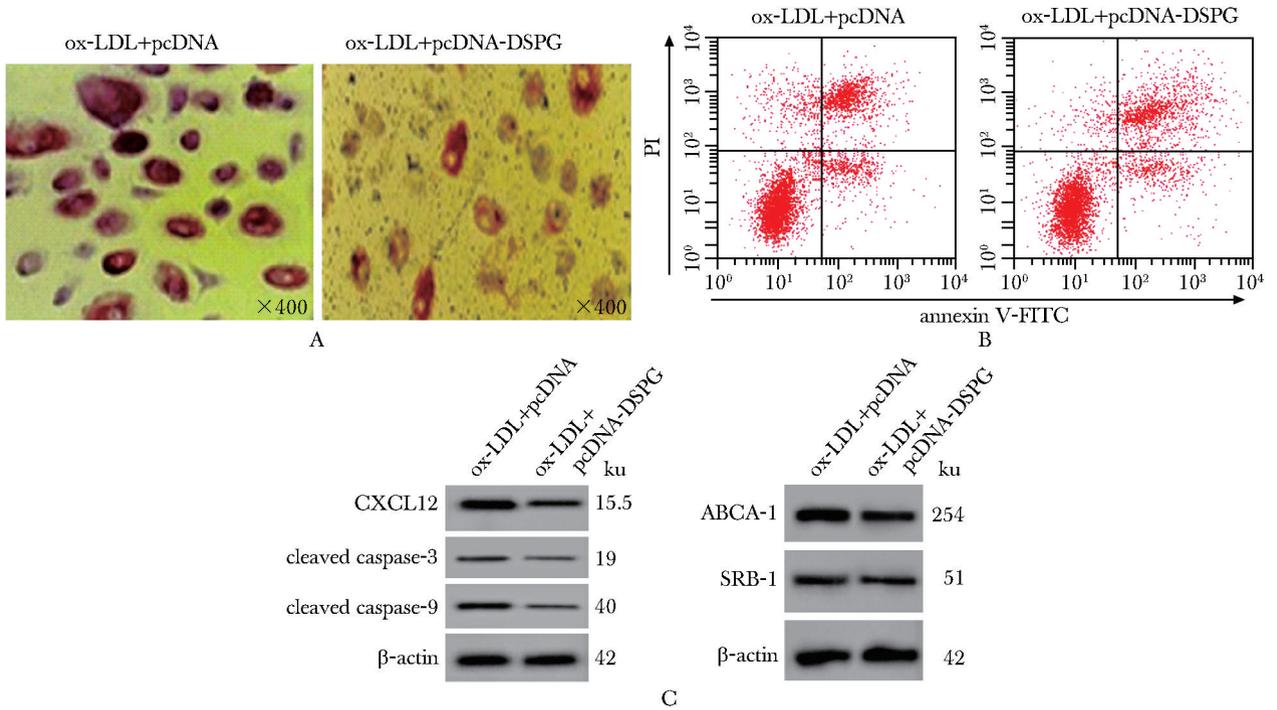


图 4 RAW264.7 细胞油红 O 染色观察 (A) 和流式细胞计量术检测 RAW264.7 细胞凋亡 (B) 及 Western blot 检测 CXCL12、ABCA-1 和 SRB-1 蛋白表达 (C)

Fig 4 RAW264.7 cell oil red O staining observation (A) and flow cytometry detection of RAW264.7 cell apoptosis (B) and Western blot detection of CXCL12, ABCA-1 and SRB-1 protein expression (C)

表 4 沉默 CXCL12 基因抑制 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞泡沫化和凋亡

Table 4 Silencing CXCL12 gene inhibits ox-LDL-induced foaming and apoptosis of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

group	CXCL12	ABCA-1	SRB-1	cleaved caspase-3	cleaved caspase-9	apoptosis rate/%
ox-LDL+si-con	1.23±0.16	1.23±0.14	0.56±0.05	0.28±0.04	0.39±0.04	16.38±1.81
ox-LDL+si-CXCL12	0.39±0.05*	0.72±0.09*	0.35±0.04*	0.11±0.03*	0.15±0.03*	8.37±0.84*

*P<0.05 compared with ox-LDL+si-con group.

表 5 沉默 CXCL12 基因对 RAW264.7 细胞 p38MAPK 信号通路的影响

Table 5 Effect of silencing CXCL12 gene on p38MAPK signaling pathway in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

group	p38MAPK	p-p38MAPK
NC	0.43±0.05	0.32±0.05
ox-LDL	0.49±0.07	1.21±0.13*
ox-LDL+si-con	0.42±0.05	1.15±0.11
ox-LDL+si-CXCL12	0.44±0.06	0.63±0.07#

*P<0.05 compared with NC group; #P<0.05 compared with ox-LDL+si-con group.

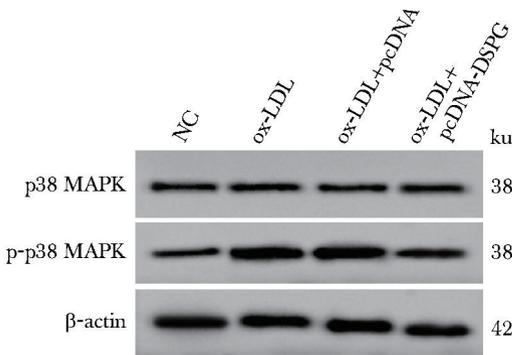


图 5 Western blot 检测 RAW264.7 细胞 p38MAPK 和 p-p38MAPK 蛋白表达

Fig 5 Western blot detection of p38MAPK and p-p38 MAPK protein expression in RAW264.7 cells

糖原合成酶激酶-3β (glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)/β-连环蛋白 (β-catenin) T120/转录因子

21 (transcription factor 21, TCF21) 信号通路, 以抑制巨噬细胞 ABCA-1 依赖性胆固醇外流并加重动脉粥样硬化^[9]。本实验结果显示, ox-LDL 处理的巨噬细胞中 CXCL12 表达水平显著升高, 沉默 CXCL12 可抑制巨噬细胞泡沫化和细胞凋亡。表明 CXCL12 可能与 AS 进展有关。

纤维脂肪动脉粥样硬化病变中 p-p38MAPK 表达增加^[10]; 绿茶多酚可通过阻断 p38MAPK 通路的活化延缓 AS 斑块进展^[11]。沉默 CXCL12 通过下调 MAPK/磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/活化蛋白 1 (activating protein 1,

AP-1) 信号通路显著抑制结肠癌细胞的增殖、侵袭和血管生成能力^[12]。本实验结果显示, ox-LDL 处理的巨噬细胞 RAW264.7 中 p-p38MAPK 表达水平显著升高, 说明 ox-LDL 可能诱导 p38 MAPK 信号通路激活。且本实验还发现沉默 CXCL12 可抑制 p38 MAPK 信号通路激活。提示, CXCL12 可能通过 p38 MAPK 信号通路影响巨噬细胞 RAW264.7 泡沫化和细胞凋亡。

综上所述, 沉默 CXCL12 抑制 ox-LDL 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 泡沫化和细胞凋亡, 其可能与 p38MAPK 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 王深明, 吴伟滨. 重视动脉粥样硬化相关发病机制的研究[J]. 中华血管外科杂志, 2017, 2:197-200.
- [2] 王斌驿, 李菲菲, 吴东方, 等. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27:439-444.
- [3] 赵正, 李琦, 尹婕, 等. 参莲提取物对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化和凋亡的药效学研究及提取部位活性比较[J]. 中国现代中药, 2019, 21:590-597.
- [4] Merckelbach S, van der Vorst EPC, Kallmayer M, *et al.* Expression and cellular localization of CXCR4 and CXCL12 in human carotid atherosclerotic plaques [J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118:195-206.
- [5] 靳昭辉, 高普, 宋光熠, 等. 中药有效组分调控 P38MAPK 改善糖尿病动脉粥样硬化免疫炎症反应的机理研究[J]. 云南中医学院学报, 2017, 40:1-5.
- [6] 马莹莹, 傅继华. 脂质、炎症在动脉粥样硬化发展机制中的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2019, 36:1-7.
- [7] 郑鹏飞, 唐和蔚, 李红艳, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17:784-786.
- [8] Gao JH, Yu XH, Tang CK. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) in atherosclerosis: an underlying therapeutic target[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495:538-544.
- [9] Gao JH, He LH, Yu XH, *et al.* CXCL12 promotes atherosclerosis by downregulating ABCA1 expression via the CXCR4/GSK3 β / β -catenin/T120/TCF21 pathway [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60:2020-2033.
- [10] Shafi S, Codrington R, Gidden LM, *et al.* Increased expression of phosphorylated forms of heat-shock protein-27 and p38MAPK in macrophage-rich regions of fibro-fatty atherosclerotic lesions in the rabbit[J]. *Int J Exp Pathol*, 2016, 97:56-65.
- [11] 刘洪, 唐旭, 汤志梅, 等. 绿茶多酚对兔主动脉粥样硬化斑块中磷酸化 p38MAPK 的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29:1568-1572.
- [12] Ma J, Su H, Yu B, *et al.* CXCL12 gene silencing down-regulates metastatic potential via blockage of MAPK/PI3K/AP-1 signaling pathway in colon cancer [J]. *Clin Transl Oncol*, 2018, 20:1035-1045.