

• 基础研究 •

血凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1在氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞氧化应激中的作用

智丽霞 王康 殷利茜 马苗煌 李姚娜 杨慧宇

【摘要】 目的:探讨血凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1) 在氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的巨噬细胞氧化应激中的作用。 **方法:**将生长至对数增殖期的巨噬细胞随机分成对照组、空质粒对照组 (pCon 组)、ox-LDL 组、LOX-1- 小干扰 RNA (siRNA) + ox-LDL 组, 分别测定各组丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 荧光显微镜及流式细胞仪检测各组巨噬细胞活性氧 (ROS) 水平, 实时定量聚合酶链反应 (PCR) 及 Western blot 法检测各组还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (NOX) 核心酶 NOX2 及亚组分 p22phox 的 mRNA 及蛋白表达水平。 **结果:** (1) 与对照组、pCon 组比较, ox-LDL 组 MDA 含量明显升高, SOD 活性明显下降; 与 ox-LDL 组比较, LOX-1-siRNA + ox-LDL 组 MDA 含量明显下降, SOD 活性明显升高。 (2) 荧光显微镜、流式细胞仪检测示 ox-LDL 组巨噬细胞 ROS 平均荧光强度较正常对照组、pCon 组显著增加, 而 LOX-1-siRNA + ox-LDL 组较 ox-LDL 组显著降低, pCon 组与对照组相比差异无统计学意义。 (3) 实时定量 PCR 及 Western blot 检测示 ox-LDL 组 NOX2、p22phox 的 mRNA 和蛋白表达水平较对照组、pCon 组显著升高, LOX-1-siRNA + ox-LDL 组 NOX2、p22phox 的 mRNA 和蛋白表达水平较 ox-LDL 组则明显下降。 **结论:** LOX-1 与 ox-LDL 作用可使巨噬细胞 NOX2、p22phox 表达增加, 进而促进 ROS 生成, LOX-1 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞氧化应激中起促进作用。

【关键词】 血凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体-1; 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 氧化应激

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.05.011

Effects of Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 on oxidative stress of macrophages induced by oxidized low-density lipoprotein ZHI Lixia, WANG Kang, YIN Lixi, MA Huihuang, LI Yaona, YANG Huiyu Department of Cardiovascular Medicine, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 037000, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the role of Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in oxidative stress of macrophages induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **Methods:** Macrophages growing to logarithmic proliferation stage were randomly divided into four groups: control group, empty plasmid control group (pCon group), ox-LDL group, and LOX-1-siRNA + ox-LDL group. Level of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) were determined by biochemical methods, and level of ROS was assessed by fluorescence microscope and flow cytometry. Real-time PCR and western blot were used to detect mRNA and protein expression of NOX2 and p22phox. **Results:** (1) Compared with control group, levels of MDA were increased and activities of SOD were decreased significantly in ox-LDL group. These changes in MDA levels and SOD activities were more obvious in LOX-1-siRNA + ox-LDL group. (2) The average fluorescence intensity of ROS was significantly elevated in ox-LDL group compared with control group, while that in LOX-1-siRNA + ox-LDL group

基金项目: 国家自然科学基金 (81700407)

作者单位: 037000 太原, 山西医科大学第二医院心血管内科

通信作者: 杨慧宇, E-mail: yanghuiyu2020@126.com

was significantly decreased compared with ox-LDL group. There was no statistical difference between pCon group and control group. (3) The mRNA and protein expression levels of *NOX2* and *p22phox* were significantly higher in ox-LDL group than those in control group and pCon group. These values were significantly reduced in LOX-1-siRNA+ ox-LDL group compared with ox-LDL group. **Conclusion:** An interaction between LOX-1 and ox-LDL could increase the expression levels of *NOX2* and *p22phox* in macrophages and enhance the production of ROS, suggesting that LOX-1 may play a driving role in ox-LDL-induced oxidative stress in macrophages.

【Keywords】 Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; Oxidized low-density lipoprotein; Macrophages; Oxidative stress

氧化应激是机体活性氧 (ROS) 产生过多或抗氧化能力下降, 氧化系统与抗氧化系统平衡紊乱的病理生理过程。大量的 ROS 使低密度脂蛋白 (LDL) 发生氧化修饰, 形成氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 是 ox-LDL 在血管内皮细胞上的主要受体, 在巨噬细胞中也有表达, 可介导 ox-LDL 对血管内皮细胞的损伤, 参与动脉粥样硬化的发生过程^[1]。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶 (NOX) 产生的 $O_2^{\cdot-}$ 与 LDL 相互作用引起 LDL 氧化, 产生 ox-LDL, 这可能是泡沫细胞吞噬 ox-LDL 的主要来源^[2], ROS 在血管性疾病的发生发展中起到重要作用, 参与动脉粥样硬化、高血压、动脉瘤形成等多种病理生理过程^[1,3]。本研究利用小干扰 RNA (siRNA) 沉默 *LOX-1* 基因, 探讨 LOX-1 对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

Ox-LDL 购自中国医学科学院基础医学研究所, 细胞内 ROS 荧光定性检测试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司, 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒购自南京建成生物工程研究所, DNA 引物及荧光探针购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 巨噬细胞培养及分组

将巨噬细胞无血清培养 16 h, 使细胞生长至对数增殖期, 更换新的无血清培养液, 随机分为对照组、空质粒对照组 (pCon 组)、ox-LDL 组、LOX-1-siRNA+ ox-LDL 组, 每组 1×10^7 个细胞。对照组单纯无血清培养不作任何处理; pCon 组为空质粒对照组; ox-LDL 组加入 ox-LDL 50 mg/L 处理 16 h; LOX-1-siRNA+ox-LDL 组用沉默 LOX-1 效果最佳

的干扰序列干预 24 h 后, 再加入 ox-LDL 50 mg/L 处理 16 h。

1.3 MDA 含量检测

按照说明书, 分别向离心管中加入 0.1 mL 不同浓度梯度标准品及待测样本, 然后分别加入 0.2 mL MDA 检测工作液, 轻微混匀后, 100 °C 加热 15 min, 冷却至室温后 1 000 g 离心 10 min, 取上清 200 μ L 分别加入到 96 孔板中, 用酶标仪测定 532 nm 处吸光度, 并计算各组细胞 MDA 含量。

1.4 巨噬细胞 SOD 活性检测

将巨噬细胞移至 96 孔板培养, 每孔 5 000~10 000 个细胞, 48 h 后吸去培养液, PBS 洗涤 1 次, 每孔加入 200 μ L SOD 检测工作液, 轻微震荡后, 37 °C 孵育 3 min。按照说明书用酶标仪测定 450 nm 处吸光度, 并计算各组细胞 SOD 活性。

1.5 LOX-1 对巨噬细胞 ROS 水平的影响

使用荧光显微镜及流式细胞仪检测各组细胞 ROS 水平。该过程中将对对照组细化为阴性对照组 (正常培养细胞不加荧光探针)、正常对照组 (正常培养细胞只加入荧光探针)、阳性对照组 (加阳性药物 H_2O_2 在常温下培养 1 h), 其余分组 (pCon 组、ox-LDL 组、LOX-1-siRNA+ ox-LDL 组) 不变。

1.6 实时定量聚合酶链反应检测巨噬细胞 *NOX2*、*p22phox* 的 mRNA 表达水平

以 GAPDH 为内对照, 应用实时定量聚合酶链反应 (PCR) 检测各组巨噬细胞内 *NOX2*、*p22phox* 的表达。引物序列如下: *NOX2* 上游引物为 5'-CCTTCCTGACACCTCTCTCG-3', 下游引物为 5'-GAGCTCAGACCCTCACTTGG-3', 预计 PCR 产物片段大小为 198 bp; *p22phox* 上游引物为 5'-CAGTCCCAAGGAGAATGGAA-3', 下游引物为 5'-TCTGCCATAGCTGGACAGTG-3', 预计 PCR 产物片段大小为 207 bp; *GAPDH* 上游引物为

5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGGA-3', 预计 PCR 产物片段大小为 307 bp。扩增条件为: 预变性 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 次循环。

1.7 Western blot法检测巨噬细胞 NOX2、p22phox 的蛋白表达水平

用 4 °C 预冷的细胞裂解液裂解各组巨噬细胞, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 总蛋白样品经十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 电转移至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 2 h, 抗 NOX2、p22phox、β-actin 抗体 4 °C 孵育过夜, 二抗室温下孵育 2 h, 化学发光试剂显色, 仪器自动扫描后保存图像。用 ImageJ 软件分析扫描所得图像的灰度值, 重复 3 次, 与内参蛋白 β-actin 条带灰度值的比值即为该目的蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 定量资料采用均数 ± 标准差表示; 多组间比较满足正态性和方差齐性时, 采用 ANOVA 单因素方差分析; 组间两两比较采用 SNK 法 (q 检验); 组间任意两组比较采用 LSD- t 检验; 不满足条件则采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LOX-1对巨噬细胞MDA含量及SOD活性的影响

与对照组、pCon 组相比, ox-LDL 组 MDA 含

量明显升高, SOD 活性明显降低 (P 均 < 0.05), 表明经 ox-LDL 诱导的巨噬细胞氧化与抗氧化功能失衡, 处于氧化应激状态。与 ox-LDL 组比较, LOX-1-siRNA+ox-LDL 组 MDA 含量明显降低, SOD 活性明显升高。见表 1。

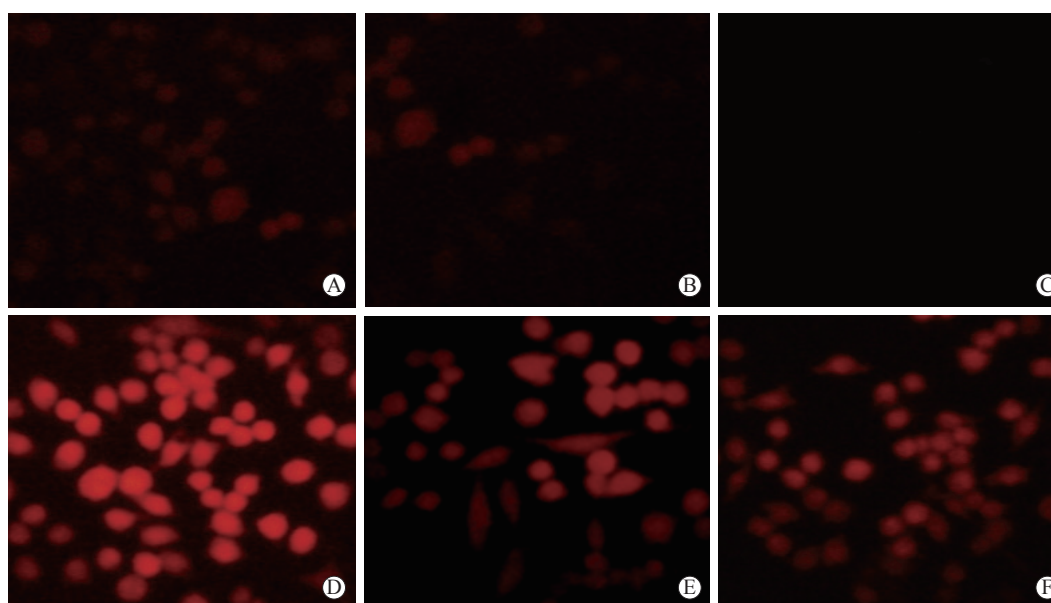
表1 各组细胞MDA含量及SOD活性的比较

分组	MDA/nmol · mg ⁻¹	SOD/U · mL ⁻¹
对照组	9.79 ± 1.52	24.09 ± 1.58
pCon组	8.95 ± 0.94	23.87 ± 1.34
ox-LDL组	32.69 ± 1.16 ⁽¹⁾⁽²⁾	13.08 ± 1.08 ⁽¹⁾⁽²⁾
LOX-1-siRNA + ox-LDL组	12.75 ± 1.93 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	19.99 ± 1.12 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注: 与对照组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$; 与pCon组比较, ⁽²⁾ $P < 0.05$; 与ox-LDL组比较, ⁽³⁾ $P < 0.05$

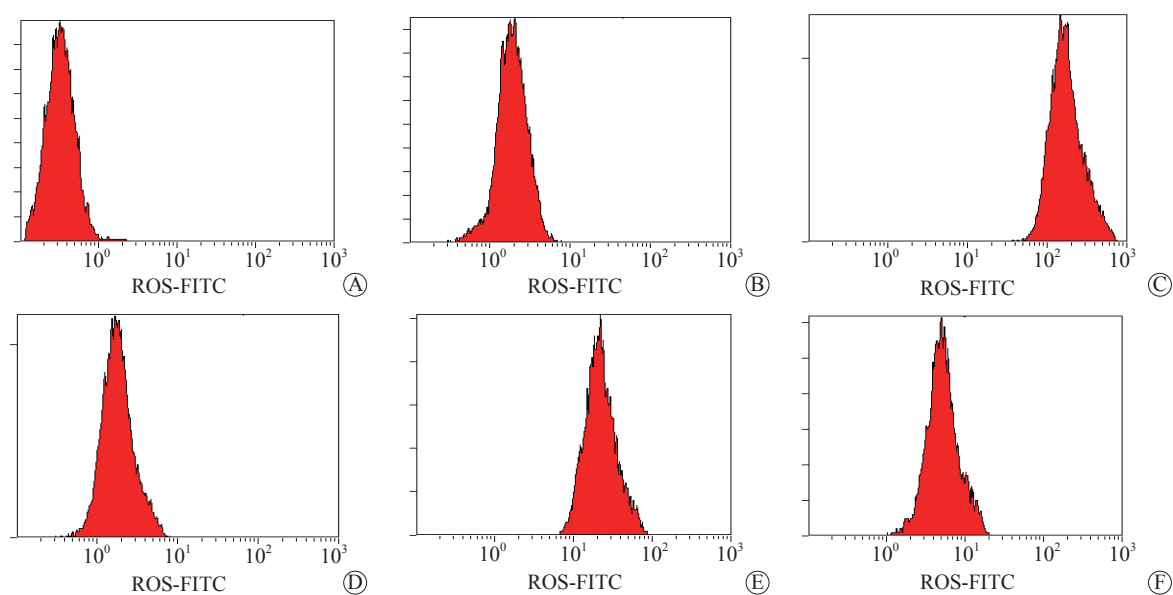
2.2 LOX-1对巨噬细胞ROS水平的影响

荧光显微镜观察结果及流式细胞仪检测结果显示, 阴性对照组巨噬细胞 ROS 平均荧光强度低于其他对照组, 阳性对照组巨噬细胞 ROS 平均荧光强度高于其他对照组 (P 均 < 0.05), pCon 组与正常对照组相比差异无统计学意义, ox-LDL 组巨噬细胞 ROS 平均荧光强度较正常对照组、pCon 组明显增强, LOX-1-siRNA+ox-LDL 组巨噬细胞 ROS 平均荧光强度较 ox-LDL 组明显减弱 (P 均 < 0.05)。见图 1、图 2、表 2。



注: A为正常对照组; B为pCon组; C为阴性对照组; D为阳性对照组; E为ox-LDL组; F为LOX-1-siRNA+ox-LDL组

图1 荧光显微镜观察各组巨噬细胞内ROS水平 (×200)



注：A为阴性对照组；B为正常对照组；C为阳性对照组；D为pCon组；E为ox-LDL组；F为LOX-1-siRNA + ox-LDL组

图2 流式细胞术检测各组细胞内ROS水平

表2 各组流式细胞术细胞内平均荧光强度比较

分组	荧光强度
正常对照组	33.8 ± 2.8
pCon组	30.5 ± 1.5
阴性对照组	8.9 ± 4.8 ⁽¹⁾⁽²⁾
阳性对照组	110.2 ± 3.3 ⁽¹⁾⁽²⁾
ox-LDL组	70.9 ± 3.1 ⁽¹⁾⁽²⁾
LOX-1-siRNA + ox-LDL组	38.7 ± 2.3 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注：与正常对照组比较，⁽¹⁾ $P < 0.05$ ；与pCon组比较，⁽²⁾ $P < 0.05$ ；与ox-LDL组比较，⁽³⁾ $P < 0.05$

2.3 LOX-1-siRNA对巨噬细胞NOX2、p22phox mRNA和蛋白表达水平的影响

与对照组、pCon组相比，ox-LDL组NOX2

及p22phox的mRNA和蛋白表达水平均明显升高 (P 均 < 0.05)；与ox-LDL组相比，LOX-1-siRNA + ox-LDL组NOX2、p22phox的mRNA和蛋白表达水平均明显下降 (P 均 < 0.05)。见图3、表3。

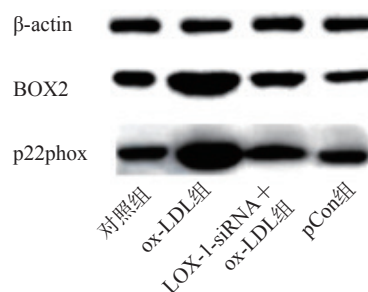


图3 Western blot法检测各组NOX2和p22phox蛋白表达情况

表3 各组NOX2和p22phox的mRNA和蛋白表达水平比较

分组	NOX2		p22phox	
	mRNA表达水平	蛋白表达水平	mRNA表达水平	蛋白表达水平
对照组	1.01 ± 0.01	0.60 ± 0.11	1.04 ± 0.01	0.62 ± 0.12
pCon组	1.05 ± 0.01	0.44 ± 0.01	1.08 ± 0.01	0.43 ± 0.01
ox-LDL组	3.17 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.76 ± 0.13 ⁽¹⁾⁽²⁾	2.841 ± 0.13 ⁽¹⁾⁽²⁾	1.49 ± 0.14 ⁽¹⁾⁽²⁾
LOX-1-siRNA + ox-LDL组	1.79 ± 0.07 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	1.02 ± 0.05 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	1.54 ± 0.08 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾	1.01 ± 0.01 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注：与对照组比较，⁽¹⁾ $P < 0.05$ ；与pCon组比较，⁽²⁾ $P < 0.05$ ；与ox-LDL组比较，⁽³⁾ $P < 0.05$

3 讨论

氧化应激是机体氧化系统和抗氧化系统平衡紊乱,导致潜在损伤的病理生理过程。正常情况下,细胞中含有的 SOD、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 可清除 ROS,维持细胞的氧化还原自稳态^[4]。当某些因素作用于机体,导致该稳态失去平衡、ROS 的产生速率大于清除速率时,大量的 ROS 在体内蓄积,可使 LDL 发生氧化修饰,生成 ox-LDL。泡沫细胞吞噬 ox-LDL 后,堆积形成动脉粥样硬化病变早期的脂质条纹,动脉管壁中氧化脂质的积累导致动脉粥样硬化病变的发生发展^[5],而 ROS 被认为是此过程的始动因素^[6]。

研究发现,小剂量 ROS 可作为细胞内第二信使,在维持机体组织细胞的正常功能中发挥重要作用^[7],然而在氧化应激状态时,ROS 大量蓄积并损伤核酸、蛋白质及脂质,最终导致机体可逆或不可逆的损伤^[8]。SOD 是维持细胞氧化还原自稳态的关键抗氧化酶,可通过歧化 ROS 终止 ROS 链式反应并将其清除^[9]。MDA 作为一种脂质过氧化产物,可间接反映氧化损伤的程度,是目前常用的氧化应激指标^[10-11]。本研究发现,ox-LDL 诱导的巨噬细胞 MDA 含量升高, SOD 活性降低,提示经 ox-LDL 诱导的巨噬细胞氧化系统与抗氧化系统失衡,处于氧化应激状态。

Ox-LDL 的细胞效应主要依赖于 ox-LDL 与 LOX-1 受体的特异性结合, LOX-1 是介导 ox-LDL 进入细胞并引起胞内氧化应激的主要受体,引起内皮活化、功能失调和损伤,在动脉粥样硬化的早期能促进泡沫细胞形成,在氧化应激中发挥重要作用^[12]。本研究发现,巨噬细胞经 ox-LDL 处理后,ROS 平均荧光强度显著增强,而沉默 *LOX-1* 基因后再经 ox-LDL 处理,巨噬细胞中 ROS 平均荧光强度显著降低,表明抑制 *LOX-1* 基因表达能减少巨噬细胞 ROS 的生成, LOX-1 可以影响巨噬细胞 ROS 的生成,从而影响巨噬细胞的氧化应激。

Ox-LDL 可以通过促进细胞内 ROS 生成,激活转录活化因子 (AP-1) 和核因子 κ B (NF- κ B),引发细胞凋亡,同时 AP-1 和 NF- κ B 能进一步促进炎症反应相关产物表达,诱导单核/巨噬细胞在受损血管内膜下聚集。在单核/巨噬细胞中, NOX 将电子从 NADPH 转移至 O_2 并产生 $O_2^{\cdot-}$,进而生成 ROS^[13]。NOX 作为 ROS 的主要来源,在斑块的形成、破裂与血栓形成中起重要作用^[14-15],也是氧

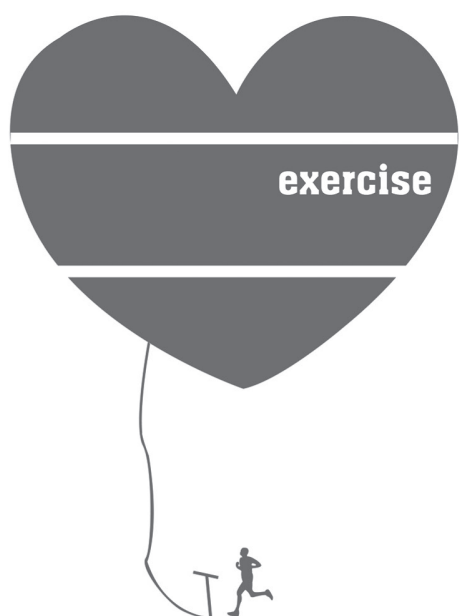
化还原的重要信号^[16]。本研究证实,巨噬细胞经 ox-LDL 处理后, *NOX2*、*p22phox* 的 mRNA 及蛋白表达水平明显升高,沉默 *LOX-1* 基因后再经 ox-LDL 处理, *NOX2*、*p22phox* 的 mRNA 及蛋白表达水平明显下降,表明抑制 *LOX-1* 基因表达能减少巨噬细胞 *NOX2*、*p22phox* 的 mRNA 及蛋白表达, LOX-1 可以影响巨噬细胞 NOX 的表达。值得注意的是, LOX-1 不会改变未受刺激的巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取。在粥样斑块内的巨噬细胞中,促炎性细胞因子诱导 *LOX-1* 高表达,此时 LOX-1 会显著增加 ox-LDL 的摄取,表明在巨噬细胞中, LOX-1 对 ox-LDL 摄取的调节具有特异性^[17]。

综上所述,本研究通过 ox-LDL 诱导巨噬细胞,发现 ox-LDL 与 LOX-1 相互作用可激活巨噬细胞 NOX,使 *NOX2*、*p22phox* 表达明显增加,进一步促进 ROS 生成,导致氧化应激,而抑制 LOX-1 可以抑制巨噬细胞的氧化应激反应,表明 LOX-1 在巨噬细胞氧化应激、动脉粥样硬化发展中具有重要作用。LOX-1 是潜在的抗动脉粥样硬化靶点,其在巨噬细胞中的具体作用机制仍有待进一步深入研究。明确 ox-LDL/ LOX-1 通过何种信号转导通路诱导 ROS 产生,进而激活下游信号,对防控心脑血管疾病具有深远意义。

参 考 文 献

- [1] 郑旭, 张梦河, 邓姣, 等. LOX-1 在动脉粥样硬化中的作用研究新进展[J]. 心脏杂志, 2018, 30(2):212-217.
- [2] Poznyak AV, Grechko AV, Orekhova VA, et al. NADPH oxidases and their role in atherosclerosis[J]. Biomedicines, 2020, 8(7):206.
- [3] 王竹, 高永翔. 动脉粥样硬化与巨噬细胞源性泡沫细胞的相关研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(6):853-855.
- [4] Matyas C, Haskó G, Liaudet L, et al. Interplay of cardiovascular mediators, oxidative stress and inflammation in liver disease and its complications[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(2):117-135.
- [5] Golforoush P, Yellon DM, Davidson SM. Mouse models of atherosclerosis and their suitability for the study of myocardial infarction[J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115(6):73.
- [6] 陈修平, 赵海誉, 钟章锋, 等. “氧化型低密度脂蛋白-凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1-活性氧”信号通路参与泡沫细胞的形成(英文)[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7):577-581.
- [7] Libby P, Ganz P. Restenosis revisited—new targets, new therapies[J]. N Engl J Med, 1997, 337(6):418-419.
- [8] Ding ZF, Wang XW, Schnackenberg L, et al. Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular

- smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(2):1378-1385.
- [9] He F, Liu Q, Jing M, et al. Toxic mechanism on phenanthrene-induced cytotoxicity, oxidative stress and activity changes of superoxide dismutase and catalase in earthworm (*Eisenia foetida*): a combined molecular and cellular study[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 418:126302.
- [10] 刘晓霞, 陈剑华, 贾金海, 等. 不同类型肺癌患者氧化应激状态及其相关因素研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2020, 28(9):52-56.
- [11] Mohideen K, Sudhakar U, Balakrishnan T, et al. Malondialdehyde, an oxidative stress marker in oral squamous cell carcinoma—a systematic review and meta-analysis[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 43(2):1019-1035.
- [12] 樊碧娆, 姚伟娟. 氧化型低密度脂蛋白受体在动脉粥样硬化发病机制中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(10):1897-1901.
- [13] Brennan AM, Suh SW, Won SJ, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(7):857-863.
- [14] Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway[J]. *Free Radic Res*, 2004, 38(6):541-551.
- [15] Ma S, Bai Z, Wu H, et al. The DPP-4 inhibitor saxagliptin ameliorates ox-LDL-induced endothelial dysfunction by regulating AP-1 and NF- κ B[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 851:186-193.
- [16] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1):245-313.
- [17] Xu S, Ogura S, Chen J, et al. LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(16):2859-2872.
- (收稿:2021-10-11 修回:2022-04-10)
(本文编辑:胡晓静)



运动演绎精彩

健康成就未来