

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0849-04

• 实验研究 •

## 激活视黄醇类 X 受体对氧化型低密度脂蛋白诱导小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 凋亡的影响

沈玲红<sup>1</sup>, 何奔<sup>1</sup>, 周磊<sup>1</sup>, 胡刘华<sup>1</sup>, 卜军<sup>1</sup>, 邵琴<sup>1</sup>, 王力<sup>2</sup>, 曾锦章<sup>2</sup>, 王彬尧<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属仁济医院心内科, 上海市 200001; 2 中科院上海生命科学研究院, 上海市 200233)

[关键词] 内科学; 视黄醇类 X 受体; 氧化型低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化

**[摘要]** 目的 探讨激活视黄醇类 X 受体对氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡的影响及其机制。方法 小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 经氧化型低密度脂蛋白处理 24 h 诱导凋亡, 同时观察给予视黄醇类 X 受体特异性配体 9-cisRA 或 SR11237 对氧化型低密度脂蛋白诱导凋亡的干预作用, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞仪 PI 单染法和 DAPI 染色检测细胞凋亡, CM-H2DCFDA 荧光探针测定细胞内活性氧浓度。结果 RAW 264.7 细胞经氧化型低密度脂蛋白 (100 mg/L) 处理 24 h 后细胞活力较对照组下降约 60%, 细胞凋亡百分率较对照组升高约 75%,  $10^{-8}$  mol/L 和  $10^{-7}$  mol/L 9-cisRA 及  $10^{-7}$  mol/L SR11237 能够显著抑制氧化型低密度脂蛋白诱导引起的细胞活力下降和凋亡 ( $P < 0.05$ )。给予氧化型低密度脂蛋白 (100 mg/L) 4 h 后细胞内活性氧水平显著升高约 17 倍以上, 如联合给予 9-cisRA ( $10^{-7}$  mol/L) 或 SR11237 ( $10^{-6}$  mol/L), 平均荧光强度分别下降约 52% 和 28%, 较氧化型低密度脂蛋白单独处理组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论 激活视黄醇类 X 受体能够抑制氧化型低密度脂蛋白诱导巨噬细胞凋亡, 其机制可能与减轻细胞氧化应激损伤有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effect of Retinoid X Receptor Activation on RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Line Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

SHEN LingHong<sup>1</sup>, HE Ben<sup>1</sup>, ZHOU Lei<sup>1</sup>, HU LiuHua<sup>1</sup>, BU Jun<sup>1</sup>, SHAO Qin<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, ZENG Jin-Zhang<sup>2</sup>, and WANG Bin-Yao<sup>2</sup>

(1 Department of Cardiology, Renji Hospital, School of Medicine of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China; 2 Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

[KEY WORDS] Retinoid X Receptor; Oxidized Low Density Lipoprotein; Macrophages; Atherosclerosis

**[ABSTRACT]** **Aim** To investigate the effect and mechanism of retinoid X receptor (RXR) activation on macrophage apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Ox-LDL-treated RAW 264.7 murine macrophage cell line was induced apoptosis after 24 h. The effect of RXR special ligands 9-cisRA and SR11237 on the apoptosis induced by ox-LDL was studied. Cell viability was assayed by MTT. The apoptotic percentage of cells was measured by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining and DAPI staining. Cellular reactive oxygen species production was detected by CM-H2DCFDA fluorescent probe. **Results** The cell viability of ox-LDL-treated RAW 264.7 cells were decreased by about 60% and cell apoptotic percentage was increased by about 75% compared with control respectively. 9-cisRA of  $10^{-8}$  mol/L and  $10^{-7}$  mol/L, SR11237 of  $10^{-6}$  mol/L significantly inhibited this decreased cell viability and increased cell apoptotic percentage ( $P < 0.05$ ), which showed dose-dependent manner. Ox-LDL-treated RAW 264.7 acquired significantly increasing cellular reactive oxygen species by more than 17 folds. And it was significantly reduced by  $10^{-7}$  mol/L 9-cisRA to 52% and by  $10^{-6}$  mol/L SR11237 to 28% compared with control. **Conclusion** RXR activation can inhibit macrophage apoptosis induced by ox-LDL, which may be related to reducing oxidative stress injury.

研究表明, 动脉粥样硬化病变局部的血管细胞

凋亡比例较正常血管明显增加<sup>[1]</sup>。细胞凋亡在动脉粥样硬化病理过程中起着很重要的作用, 其中巨噬细胞及其来源的泡沫细胞凋亡对加剧动脉粥样硬化病变局部炎症和斑块不稳定有重要意义。在动脉粥样硬化病变晚期, 局部吞噬清除功能缺陷, 凋亡的巨噬细胞不能得到有效清除, 继发性死亡形成粥样硬化斑块的坏死核心, 死亡细胞释放细胞内蛋白酶和其他有毒物质, 直接引起组织损伤, 同时加剧炎症

[收稿日期] 2008-07-03 [修回日期] 2008-10-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (3067088Q, 30600242); 上海市科委基础研究重点项目 (05JC14037)

[作者简介] 沈玲红, 博士, 主治医师, 研究方向为核受体与动脉粥样硬化, E-mail 为 shenlinghong@medmail.com.cn。通讯作者何奔, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的介入治疗及核受体在动脉粥样硬化中的作用机制, E-mail 为 heben@medmail.com.cn。王彬尧, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊治与动脉粥样硬化。

反应,导致斑块破裂<sup>[2]</sup>。在体研究证实,在斑块破裂和栓塞的心源性猝死患者中凋亡巨噬细胞的数量明显增加,提示巨噬细胞凋亡与斑块破裂之间存在直接的关系<sup>[3]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)是已经得到公认的致动脉粥样硬化脂蛋白,目前认为它也是动脉粥样硬化病变局部强烈的凋亡诱导因子<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨激活视黄醇类X受体(retinoid X receptor, RXR)对 ox-LDL 诱导巨噬细胞凋亡的影响及其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

9-顺式维甲酸(9-cis retinoid acid, 9-cisRA)和 MTT 购自 Sigma 公司; SR11237 由中科院上海生命科学研究所生茂实验室惠赠;细胞内活性氧测定试剂盒购自 GENMED 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司。

### 1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

取正常人血浆,序列超速离心法分离得到低密度脂蛋白(LDL),4℃下 PBS 透析 24 h。与硫酸铜(5 μmol/L)在 37℃下共同孵育 18 h 得到 ox-LDL, EDTA 中止反应。再次用 PBS 在 4℃下透析 24 h。Biorad 法测定蛋白含量,硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量,过滤除菌,分装,4℃保存备用。

### 1.3 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 来自 ATCC,用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养。细胞接种于 96 孔板,3 × 10<sup>4</sup> 个细胞/孔,在含 0.5% 血清 DMEM 培养基培养的条件下用 ox-LDL (100 mg/L) 诱导细胞凋亡,空白对照组给予等量 PBS,处理组在诱导凋亡的同时给予不同浓度的 9-cisRA 或 SR11237 干预。24 h 后检测细胞活力和凋亡情况。

### 1.4 MTT 法检测细胞活力

96 孔板接种细胞,设 5 个复孔,每孔加入 15 μL

MTT 溶液(终浓度 0.5 g/L),37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h 弃孵育液,加入 200 μL DMSO,振摇 10 min 后用酶标仪于 492 nm 波长检测吸光度值。

### 1.5 流式细胞仪 PI 单染法检测细胞凋亡

消化细胞,2000 r/min 离心 5 min, PBS 重悬后洗涤 2 次,4% 福尔马林固定,0.05% Tween 20 透化处理,2000 r/min 离心 5 min, PBS 重悬后洗涤 2 次,用含 50 mg/L PI 和 100 mg/L RNA 酶溶液的 PBS 重悬细胞并打散,37℃避光孵育 30 min 冰浴终止反应,流式细胞仪 PI 单染法检测细胞凋亡。

### 1.6 DAPI 染色检测细胞凋亡

弃培养液, PBS 洗涤 5 min × 3 次,3.7% 多聚甲醛固定,4℃、20 min, PBS 洗涤 5 min × 3 次,0.5% Triton 穿孔,5 min 后 PBS 洗涤 5 min × 3 次,DAPI 染色 5 min, PBS 洗涤 5 min × 3 次,甘油封片,荧光显微镜观察。

### 1.7 活性氧水平检测

加药后 4 h 消化细胞,用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 重悬,取 1 × 10<sup>6</sup> 细胞,37℃下避光与 CM-H2DCFDA 荧光探针共同孵育 20 min,4℃、300 g 离心 5 min 弃上清,加入预冷的保存液重悬,送流式细胞仪检测。

### 1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 巨噬细胞活力

RAW 264.7 细胞经 ox-LDL (100 mg/L) 处理 24 h 细胞活力较对照组下降约 60%。RXR 特异性配体 9-cisRA 和 SR11237 对未经 ox-LDL 处理的 RAW 264.7 细胞活力没有影响。但 10<sup>-8</sup> 和 10<sup>-7</sup> mol/L 9-cisRA 及 10<sup>-7</sup> mol/L SR11237 能显著减少 ox-LDL 诱导引起的细胞活力下降 (*P* < 0.05 图 1)。

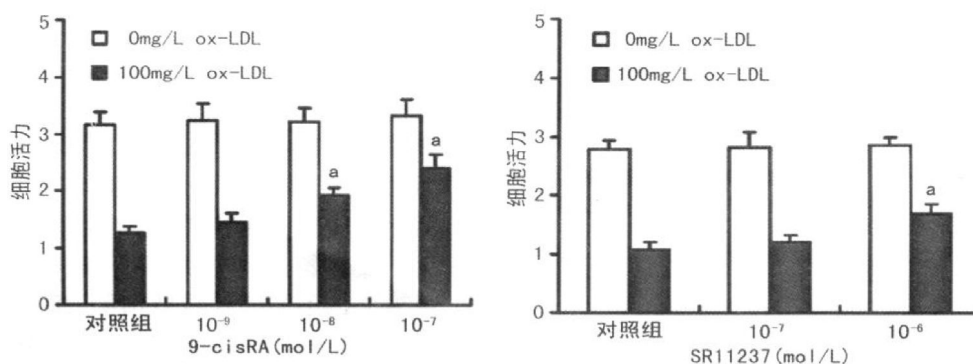


图 1 RXR 特异性配体对 ox-LDL 诱导的 RAW 264.7 细胞活力的影响 (*n* = 5)

a 为 *P* < 0.05 与对照组相比。

### 2.2 巨噬细胞凋亡情况

RAW 264 7细胞经 ox-LDL(100 mg/L)处理 24 h 细胞凋亡较对照组升高约 75%。RXR 特异性配体 9-cisRA 和 SR11237 对未经 ox-LDL 处理的 RAW 264 7细胞凋亡没有显著影响。但  $10^{-8}$  和  $10^{-7}$  mol/L 9-cisRA 及  $10^{-7}$  mol/L SR11237 能够显著减少 ox-LDL 诱导引起的细胞凋亡 ( $P < 0.05$  图

2)。DAPI染色结果显示,正常细胞核成圆形或椭圆形,核膜完整无皱缩或裂缝; ox-LDL 处理后大部分 RAW 264 7细胞出现染色质浓缩、凝聚,部分细胞核裂解为碎块,并可见凋亡小体;给予 9-cisRA 或 SR11237 后凋亡细胞比例明显减少,程度减轻(图 3)。

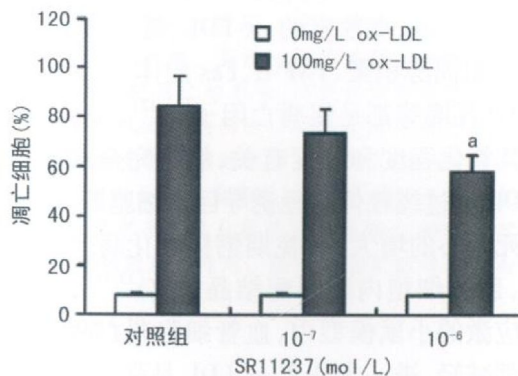
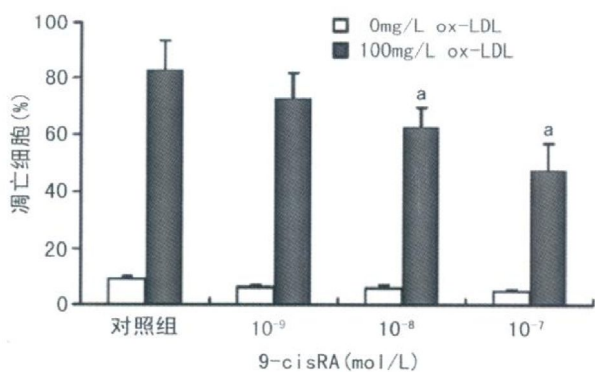


图 2 RXR 特异性配体对 ox-LDL 诱导的 RAW 264 7 细胞凋亡的影响 (n = 5) a 为  $P < 0.05$  与对照组相比。

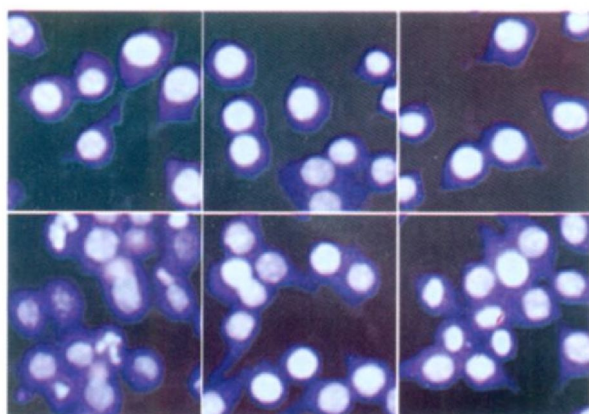


图 3 DAPI 染色 (n = 3) 上图为非处理组, 下图为 ox-LDL 处理组; 左为对照组, 中为 9-cisRA 组, 右为 SR11237 组。

### 2.3 细胞内活性氧水平

正常 RAW 264 7 细胞活性氧水平较低, 给予 ox-LDL(100 mg/L) 4 h 后细胞内活性氧水平升高约 17 倍以上, 如联合给予 9-cisRA 或 SR11237, 平均荧光强度分别下降约 52% 和 28%, 与 ox-LDL 单独处理组相比差异显著 ( $P < 0.05$  图 4)。

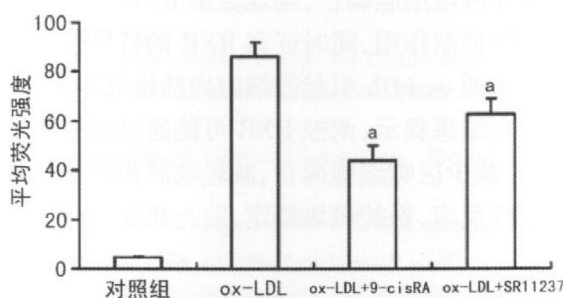


图 4 RXR 特异性配体对 ox-LDL 引起的细胞内活性氧水平的影响 (n = 5) a 为  $P < 0.05$  与 ox-LDL 单独处理组相比。

## 3 讨论

RXR 是核受体超家族最古老的成员, 在功能上属于依赖于配体激活的转录因子。RXR 既可以作为同源二聚体启动转录, 也能够与其他核受体形成异源二聚体启动转录, 它的异源二聚体搭档包括已

知的对心血管功能具有重要调控作用的核受体如 PPAR 和 LXR, 也包括其他众多的可能在心血管系统生理或病理生理过程中扮演重要角色的未知孤儿核受体。RXR 的上述功能特点使其在细胞的基因调控网络中居于枢纽地位, 对多种生物途径均有潜在的多向性效应, 生理作用涉及脊椎动物发育、细胞分化、维持内环境稳定以及新陈代谢的各个方面<sup>[5,6]</sup>。2001 年, Claude1 等<sup>[7]</sup>首次报道 RXR $\alpha$  特异性激动剂 LG100364 可以明显减轻载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化, 并且其作用显著优于 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$  的特异性激动剂。RXR 激动剂的抗动脉粥样硬化的确切机制目前尚不完全清楚, 可能与调控脂质代谢、炎症免疫反应和降低胰岛素抵抗有关<sup>[5]</sup>。有证据表明, 激活 RXR 可能抑制动脉粥样硬化炎症免疫反应。最近报道激活 RXR 可以抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞向树突状细胞转化<sup>[8]</sup>。Ra-

sooly等<sup>[9]</sup>报道 RXR 的特异性配体通过上调 Bcl-2 表达,抑制 T 淋巴细胞凋亡; Valledor 等<sup>[10]</sup>发现激活 LXR/RXR 可以通过促进一些抗凋亡因子如 AM/CT2、Bcl-XL 和 Birc1 $\alpha$  的表达,同时抑制一些促凋亡因子如 Caspases-1、4/11、7 及 12、Fas ligand 和 Dnase1B 的表达,减少因 MCS-F 水平下降或某些微生物诱导的巨噬细胞凋亡。

以往在一些模拟动脉粥样硬化病变条件的细胞培养模型中发现,高浓度的 ox-LDL、氧化固醇、细胞内“游离”胆固醇积聚、TNF- $\alpha$ 、Fas 配体、一氧化氮和缺氧/ATP 耗竭等都是促凋亡因子<sup>[11-12]</sup>。ox-LDL 的作用与其氧化程度和浓度有关,氧化完全或高浓度的 ox-LDL 通过线粒体途径诱导巨噬细胞凋亡,促进病变坏死核心的增大,在晚期粥样硬化病变或斑块观察到,巨噬细胞内胆固醇结晶丰富<sup>[13-14]</sup>;而在减轻氧化应激的小鼠模型中,血管细胞凋亡和动脉粥样硬化都减轻,进一步证实 ox-LDL 是强烈的凋亡诱导因子<sup>[4]</sup>。本研究应用 RXR 的特异性配体干预 ox-LDL 诱导巨噬细胞凋亡,发现激活 RXR 对这一过程有显著的抑制作用,同时证实 RXR 的特异性配体能够明显下调 ox-LDL 引起的细胞内活性氧水平升高。上述研究结果提示,调控 RXR 可能通过减轻氧化应激损伤,减少巨噬细胞凋亡,减轻动脉粥样硬化斑块局部炎症反应,保护斑块稳定,防止斑块破裂。

#### [参考文献]

- [1] Isner J, Keamey M, Bortnan S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis [J]. *Circulation*, 1995, **91**: 2703-711.
- [2] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: The importance of lesion stage and phagocytic efficiency [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 2255-264.
- [3] Geng YJ, Phillips JE, Mason RP, et al. Cholesterol crystallization and macrophage apoptosis: implication for atherosclerotic plaque instability and rupture [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, **66**: 1485-492.
- [4] Williams KJ, Fisher EA. Oxidation lipoproteins and atherosclerosis: which is wrong: the antioxidants or the theory [J]? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005, **8**: 139-146.
- [5] 沈玲红, 何奔, 王彬尧. RXR 在心血管系统中的功能 [J]. *中国临床医学*, 2007, **14** (Suppl): 141-143.
- [6] 张晓坤, 沈玲红, 何奔. 动脉粥样硬化药物治疗的新靶点——核受体 Nur77 和 RXR [J]. *内科理论与实践*, 2007, **2** (5): 292-294.
- [7] Claudel T, Lebowitz MD, Fievet C, et al. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98** (5): 2610-615.
- [8] 沈玲红, 何奔, 王彬尧, 等. 激活 RXR 对氧化型低密度脂蛋白诱导小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 向树突样细胞分化的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, **35** (9): 833-837.
- [9] Rasooly R, Schuster GU, Gregg JP, et al. Retinoid X receptor agonists increase bcl2a1 expression and decrease apoptosis of naive T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2005, **175** (12): 7916-929.
- [10] Valledor AF, Hsu LC, Ogawa S, et al. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101** (51): 17813-818.
- [11] Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2004, **11**: S12-16.
- [12] Nhan TQ, Liles WC, Schwartz SM. Role of caspases in death and survival of the plaque macrophage [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 895-903.
- [13] Salvayre R, Auge N, Benoist H, et al. Oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1585**: 213-221.
- [14] Stocker R, Kearney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis [J]. *Physiol Rev*, 2004, **84**: 1381-478.

(此文编辑 文玉珊)