

亲环素 A 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 蛋白表达的影响

许选选¹, 尹凯¹, 李涛², 李金凤¹, 涂剑², 王佐¹, 涂玉林¹

(南华大学 1. 心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 2. 药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 亲环素 A; 氧化型低密度脂蛋白; 核因子 κ B

[摘要] 目的 观察亲环素 A 对氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 细胞中核因子 κ B(NF- κ B) 表达的影响。方法 Western blot 检测氧化型低密度脂蛋白处理 RAW264.7 细胞不同时间亲环素 A 和 NF- κ B 蛋白的表达, siRNA 沉降亲环素 A 后再用 Western blot 检测氧化型低密度脂蛋白对 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 蛋白表达的影响。结果 氧化型低密度脂蛋白能够上调 RAW264.7 细胞中亲环素 A 和 NF- κ B 蛋白的表达, siRNA 沉降亲环素 A 能降低细胞中 NF- κ B 蛋白的表达。结论 亲环素 A 表达的改变能影响氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 的蛋白表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Cyclophilin A on the Protein Expression of NF- κ B in RAW264.7 Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

XU Xuan-Xuan¹, YIN Kai¹, LI Tao², LI Jin-Feng¹, TU Jian², WANG Zuo¹, and TU Yu-Lin¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, 2. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Cyclophilin A; Oxidized Low Density Lipoprotein; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Cyclophilin A on the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein in RAW264.7 cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Western blot was applied to detect the expression of Cyclophilin A and NF- κ B protein in RAW264.7 cells induced by ox-LDL. Western blot was applied to detect the expression of Cyclophilin A and NF- κ B protein in Cyclophilin A siRNA RAW264.7 cells induced by ox-LDL. **Results** The expression of Cyclophilin A and NF- κ B protein in RAW264.7 cells was up-regulated by ox-LDL. Cyclophilin A siRNA could down-regulate the expression of NF- κ B protein. **Conclusion** The change of the CypA protein expression could down-regulate the protein expression of NF- κ B in RAW264.7 cells induced by ox-LDL.

亲环素 A (cyclophilin A, CypA) 属亲兔蛋白家族成员^[1], 在生物界广泛存在, 属高度保守的蛋白质之一, 是免疫抑制剂环孢霉素 A (cyclosporin A, CsA) 在细胞内的作用靶点。近年来研究发现其与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展密切相关: 在 As 斑块中的巨噬细胞和平滑肌细胞均发现了 CypA 的表达; 参与了细胞内胆固醇转运复合物的构成, 维持细胞内胆固醇的动态平衡^[2,3]; 还可以

作为一种前炎性细胞因子, 诱导炎性细胞聚集^[4]。以上均提示 CypA 可能作为一个延缓甚至是控制 As 进程的靶点。其中作为前炎性因子, CypA 如何影响炎性反应? 具体机制如何? 目前报道甚少。核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 广泛存在于真核细胞内, 与一些重要的病理生理过程如炎症、应激、免疫调控以及细胞增殖、转化和凋亡等都有着密切的联系。有文献^[5,6]报道, 在 As 斑块中的内皮细胞、巨

[收稿日期] 2012-12-18

[基金项目] 湖南省卫生厅科技项目 (B2007101); 博士启动基金 (B2011XQD44) 资助

[作者简介] 许选选, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的机制和防治, E-mail 为 xuxuanxuan0@163.com。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的机制和防治。通讯作者涂剑, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药物防治, E-mail 为 tujian0734@yahoo.com.cn。

噬细胞及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 中均可检测到 NF- κ B, NF- κ B 被激活后可诱导参与调控 As 有关的基因。那么 CypA 是否通过 NF- κ B 影响炎症反应进而影响 As 进程? 因此, 本研究拟通过 CypA 表达的改变观察 RAW264.7 细胞中 NF- κ B 的表达变化。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海研究所细胞库, CypA 一抗购自北京义翘神州生物技术有限公司, NF- κ B p65、I κ B α 一抗购自美国 ProteinTech Group 公司。CypA siRNA 片段由上海吉玛公司合成, 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 脂质体转染法获得 CypA 低表达细胞模型

按 Invitrogen 公司提供的脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染程序进行, 同时采用阴性对照和 RAW264.7 细胞空白作为对照。在转染 72 h 内收集细胞, Western blot 检测表明 CypA siRNA 明显下调 RAW264.7 细胞中 CypA 蛋白的表达, 符合沉降率 $\geq 70\%$, 可用于后续实验。

1.3 细胞分组

为检测 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间 CypA、NF- κ B p65、I κ B α 等的蛋白表达, 细胞分 4 组: ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 0 h、4 h、8 h 和 12 h 组; 为观察 CypA siRNA 对 CypA 等蛋白表达的影响, 细胞分 3 组: 对照组、siRNA 阴性对照组和 CypA siRNA 组。为观察 ox-LDL 对 CypA siRNA 处理的影响, 细胞分 4 组: 对照组、ox-LDL 处理组、CypA siRNA 和 ox-LDL 处理的 CypA siRNA 组。

1.4 Western blot 检测 CypA、NF- κ B p65 和 I κ B α 的蛋白表达

收集各组裂解细胞, 经 BCA 法蛋白定量, 确定上样量保证各组总蛋白量一致, 100℃ 煮沸 8 min 使蛋白变性。电泳, 根据预染蛋白 Marker 确定蛋白分子量标准并转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入一抗, 4℃ 孵育过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 40 min; 洗膜后激发荧光, 显影于 X 光片, 进行图像分析。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间对 CypA 蛋白表达的影响

随着 ox-LDL 处理时间的延长, RAW264.7 细胞中 CypA 蛋白的表达明显增强, ox-LDL 处理细胞 8 h 组 CypA 蛋白表达增强最显著, 而 12 h 组 CypA 蛋白表达明显减弱 (图 1)。

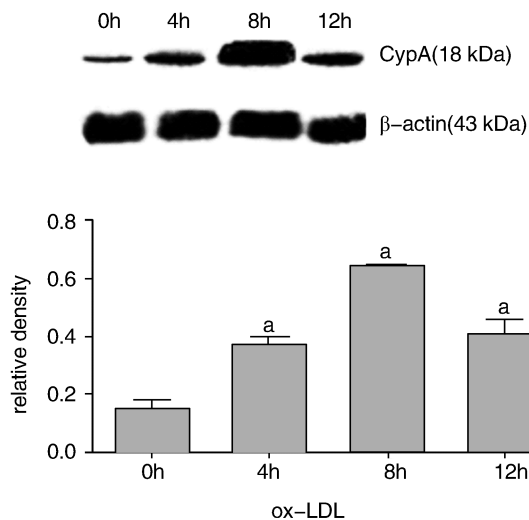


图 1. Western blot 检测 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间 CypA 蛋白的表达

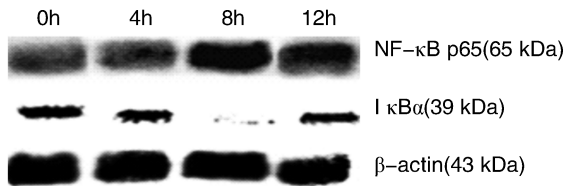
Figure 1. CypA protein expression was detected by Western blot in every group of RAW264.7 cells induced by ox-LDL

2.2 ox-LDL 处理不同时间对 RAW264.7 细胞中 NF- κ B p65、I κ B α 蛋白表达的影响

随着 ox-LDL 处理时间的延长, RAW264.7 细胞中 NF- κ B p65 蛋白的表达均明显增强, 与 CypA 蛋白的表达趋势一致, 也是以 ox-LDL 处理细胞 8 h 组表达增强最显著 (图 2)。I κ B α 蛋白是主要的 NF- κ B p65 的上游调控蛋白, 其表达的变化与 NF- κ B p65 蛋白的趋势互补, 还可进一步验证 NF- κ B p65 被激活的效应。结合相关文献 [5], 在接下来的实验中选择 ox-LDL 处理细胞组的时间为 8 h。

2.3 CypA siRNA 沉降 CypA 可降低 RAW264.7 细胞中 NF- κ B p65 的表达

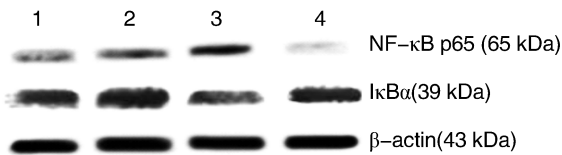
ox-LDL 组 RAW264.7 细胞中 NF- κ B p65 蛋白的表达明显增强; CypA siRNA 处理可使 NF- κ B p65 蛋白的表达显著降低, I κ B α 蛋白的变化趋势与 NF- κ B p65 相反 (图 3)。



分组	NF-κB p65	IκBα
0 h	0.332 ± 0.022	0.673 ± 0.021
4 h	0.451 ± 0.012 ^a	0.432 ± 0.012 ^a
8 h	0.823 ± 0.031 ^a	0.235 ± 0.021 ^a
12 h	0.621 ± 0.024 ^a	0.421 ± 0.015 ^a

图 2. Western blot 检测 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间 NF-κB p65、IκBα 蛋白表达的影响 ($n = 3$) ^a 为 $P < 0.05$, 与 0h 组比较。

Figure 2. NF-κB protein expression was detected by Western blot in every group of RAW264.7 cells induced by ox-LDL



分组	NF-κB p65	IκBα
对照组	0.432 ± 0.031	0.385 ± 0.031
CypA siRNA 组	0.213 ± 0.015 ^a	0.782 ± 0.014 ^a
ox-LDL 组	0.741 ± 0.032 ^a	0.234 ± 0.016 ^a
CypA siRNA+ox-LDL 组	0.232 ± 0.024 ^a	0.621 ± 0.015 ^a

图 3. Western blot 检测 RAW264.7 细胞中 NF-κB 的蛋白表达 ($n = 3$) ^a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。1 为对照组, 2 为 CypA siRNA 组, 3 为 ox-LDL 组, 4 为 CypA siRNA + ox-LDL 组。

Figure 3. NF-κB protein expression was detected by Western blot in every group of RAW264.7 cells

3 讨论

As 是一种以动脉壁脂质蓄积为特征的慢性炎症疾病, 多种因素导致了动脉壁的炎症反应^[6,7]。ox-LDL 和巨噬细胞的相互作用在 As 斑块形成和发展过程中起着极为关键的作用。ox-LDL 通过促进巨噬细胞泡沫化, 诱导巨噬细胞凋亡以及诱导巨噬细胞释放炎症因子等方式加速 As 病变的进程^[8]。

本研究中, 参照文献^[9,10]选择了 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞的浓度与时间, 首先通过 ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞不同时间, 检测其中 CypA 和 NF-κB p65 的蛋白表达。结果发现, 随着 ox-LDL 处

理时间的延长, RAW264.7 细胞中 CypA 和 NF-κB p65 的蛋白表达均明显增强, ox-LDL 处理细胞 8 h 表达增强最显著, 而 12 h 时表达明显减弱。

NF-κB 是一个转录因子家族的总称, 包括 5 个亚单位: RelB、p65、cRel、p52 和 p50。经典的 NF-κB 调控机制为: 在静息状态下的细胞, IκBα 与 p65 和 p50 形成复合物, 在胞浆中以无活性形式存在; 当细胞受到胞外信号如某些氧化剂、脂多糖、炎症细胞因子、细菌、病毒、紫外线等多种因素的刺激后, IκBα 发生磷酸化同时发生降解并与 p65 和 p50 解离, 使 NF-κB (即 p65 和 p50) 暴露核定位位点。游离的 p65 和 p50 迅速移位到胞核中, 与特异性 κB 的序列结合, 调控相关基因的转录。NF-κB 参与基因转录后, 细胞内 IκB 的合成也随之启动, 并进入细胞核与 NF-κB 结合形成复合物, 使 NF-κB 从其结合位点上脱离下来, 并重新转位于细胞质被重新利用。因此, ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞后可引起 NF-κB p65 的蛋白表达明显增强, 与此同时我们也观察到了 CypA 相似的变化趋势。

为了进一步了解 CypA 与 NF-κB 是否存在关联, 我们运用了 siRNA 技术, 根据文献^[11-13]设计并合成了 CypA siRNA, 转染细胞建立 siRNA 降解 CypA 表达的细胞模型后, 再用 ox-LDL 处理。结果观察到 NF-κB p65 的蛋白表达明显降低, 表明 CypA 的表达改变可以影响 NF-κB 途径。有研究报道^[14,15], 重组的人 CypA (rhCypA) 不仅能够激活人脐静脉内皮的细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)、c-jun 氨基末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 以及 p38 分裂原激活的蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinases, p38 MAPK) 的表达, 还可以刺激 IκBα 磷酸化和 NF-κB 的活化, 甚至还可以诱导 E-选择素和血管细胞黏附分子 1 的表达, 促进内皮细胞凋亡。

结合文献与本研究获得的结果, 我们认为, CypA 表达的改变能影响 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF-κB 的蛋白表达。接下来我们将结合体内实验, 进一步证实 ox-LDL 诱导下 CypA 与 NF-κB 的相互作用, 探讨 CypA 通过 NF-κB 途径调节炎症反应进而对 As 进程的影响。

[参考文献]

- [1] Satoh K, Shimokawa H, Berk BC. Cyclophilin A: promising new target in cardiovascular therapy[J]. Circ J, 2010, 74 (11): 2 249-256.
- [2] Liu L, Li C, Cai C, et al. Cyclophilin A (CypA) is asso-

- ciated with the inflammatory infiltration and alveolar bone destruction in an experimental periodontitis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391 (1): 1 000-006.
- [3] Sun S, Wang Q, Giang A, et al. Knockdown of CypA inhibits interleukin-8 (IL-8) and IL-8-mediated proliferation and tumor growth of glioblastoma cells through down-regulated NF- κ B [J]. *J Neurooncol*, 2011, 101 (1): 1-14.
- [4] Seizer P, Geisler T, Bigalke B, et al. EMMPRIN and its ligand Cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 6 (49): 1-6.
- [5] Toba H, Shimizu T, Miki S, et al. Calcium channel blockers reduce angiotensin II induced superoxide generation and inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells [J]. *Hypertens Res*, 2006, 29 (2): 105-116.
- [6] Xu S, Liu Y, Le K, et al. Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by reducing intracellular superoxide radical generation and NF- κ B activation [J]. *Transl Res*, 2012, 160 (2): 114-124.
- [7] Nigro P, Satoh K, Odell M R, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 2011, 208 (1): 53-66.
- [8] Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis [J]. *Rheumatology*, 2009, 48 (1): 11-22.
- [9] Bell RD, Winkler EA, Singh I, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A [J]. *Nature*, 2012, 485 (7399): 512-516.
- [10] Seizer P, Schönberger T, Schött M, et al. EMMPRIN and its ligand cyclophilin A regulate MT1-MMP, MMP-9 and M-CSF during foam cell formation [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209 (1): 51-57.
- [11] Qian Z, Zhao X, Jiang M, et al. Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase-9 [J]. *BMC Cancer*, 2012, 2 (12): 442.
- [12] Feng YM, Wu YM, Tu XM, 等. Construction of lentiviral mediated CyPA siRNA and its functions in non-small cell lung cancer [J]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2010, 28 (2): 87-91.
- [13] 娄宇, 富路. 微小RNA: 人类急性心肌梗死的重要调控因子 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (6): 573-576.
- [14] 廖端芳, 庾勤慧, 郭琰, 等. Cyclophilin A 通过调控炎症/免疫反应介导动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (7): 614.
- [15] Yang F, Jove V, Chang S, et al. Bortezomib induces apoptosis and growth suppression in human medulloblastoma cells, associated with inhibition of AKT and NF- κ B signaling, and synergizes with an ERK inhibitor [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13 (6): 349-357.

(此文编辑 文玉珊)