

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20170950

心肌梗死微环境中氧化低密度脂蛋白对树突状细胞诱导炎症反应的影响

马元吉, 邹云增, 葛均波*

复旦大学附属中山医院心内科, 上海 200032

[摘要] **目的:**体外模拟高脂血症小鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)和肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活的内环境,研究氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)能否在血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的基础上进一步诱导树突状细胞(dendritic cells, DCs)的成熟、迁移和炎症反应,并探讨可能参与其中的信号通路。**方法:**诱导 C57BL/6J 小鼠骨髓细胞分化成 DCs,然后加入坏死心肌细胞上清,分别给予 AngⅡ和 ox-LDL+AngⅡ干预 48 h。流式细胞仪检测 DCs 的成熟标志物(CD83)和协同共刺激分子(CD86)的表达,用 qPCR、ELISA 方法测定炎症因子的表达。Western 印迹法检测核因子 κ B(NF- κ B)和 I κ B 磷酸化程度,以及血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)和 Toll 样受体(TLR)4 信号通路的表达。**结果:**ox-LDL 能够在 AngⅡ基础上进一步诱导 CD83 和 CD86 的表达,增强炎症因子和趋化因子的表达,增强 NF- κ B 和 I κ B 磷酸化程度($P<0.05$)。ox-LDL 能够在 AngⅡ基础上进一步上调 LOX-1 的表达,同时激活了 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路($P<0.05$)。**结论:**ox-LDL 可能在 AngⅡ的基础上进一步诱导 DCs 免疫成熟、迁移和炎症反应;LOX-1-TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路可能参与 DCs 成熟,以及 DCs 在高脂血症合并心肌梗死发生和发展中引起炎症反应的过程。

[关键词] 树突状细胞;血管紧张素Ⅱ;氧化低密度脂蛋白;Toll 样受体**[中图分类号]** R-332, R 542.2⁺2**[文献标志码]** A

Effect of oxidized low-density lipoprotein on dendritic cells-induced inflammation in microenvironment of myocardial infarction

MA Yuan-ji, ZOU Yun-zeng, GE Jun-bo*

Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To explore the induction of maturation, migration, and inflammation of dendritic cells (DCs) after treatment with angiotensin (Ang) Ⅱ *via* oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), and its corresponding signaling pathway. **Methods:** Bone marrow cells from C57BL/6J WT mice were differentiated into DCs. After adding supernatant of necrotic cardiomyocyte cells, DCs were treated with either Ang Ⅱ alone or in combination with ox-LDL for 48 h. CD83 and CD86 were measured *via* flow cytometry, while cytokines and chemokine levels were measured by the qPCR or ELISA. Nuclear factor κ B (NF- κ B) and I κ B phosphorylation were detected by Western blotting. The expressions of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), and Toll-like receptor (TLR)4 were detected by Western blotting. **Results:** Ox-LDL could further up-regulate the maturity marker CD83 and CD86 in DCs on the basis of Ang Ⅱ treatment. The expressions of inflammatory factors and chemokines, as well as phosphorylation of NF- κ B and I κ B were upregulated ($P<0.05$). The expression of LOX-1, phosphorylation of interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK)-4 and the activation of TLR4/MyD88 signaling pathway were further enhanced by ox-LDL ($P<0.05$). **Conclusions:** The immune maturation, migration, and inflammation of DCs treated with Ang Ⅱ could be further induced by ox-LDL, possibly *via* the LOX-1-TLR4-MyD88 signaling pathway.

[Key Words] dendritic cells; Ang Ⅱ; oxidized low-density lipoprotein; Toll-like receptor

作为影响急性心肌梗死(myocardial infarction, MI)发生和发展的两个重要危险因素,高脂血症和

高血压病具有较强的协同作用,而氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)和血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)在这其中起

[收稿日期] 2017-11-07**[接受日期]** 2018-05-15**[基金项目]** 国家自然科学基金(81600280). Supported by National Natural Science Foundation of China (81600280).**[作者简介]** 马元吉,博士,住院医师. E-mail: myj-215@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990; E-mail: jbg@zs-hospital.sh.cn

着重要的作用。研究^[1]发现,树突状细胞(dendritic cells, DCs)在动脉硬化斑块及梗死心肌中发生聚集。而本课题组发现,ox-LDL^[2]和 Ang II^[3]能诱导 DCs 的成熟。因此,本研究通过体外模拟高脂血症小鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)和肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活的内环境,进一步研究 ox-LDL 在 Ang II 的基础上诱导 DCs 成熟、迁移及其引起的炎症反应的影响,并探讨可能参与其中的信号通路。

1 材料与方法

1.1 DCs 的培养和分组 将 C57BL/6J 小鼠处死后,置入 75%乙醇中浸泡,剪下双侧股骨,进行骨髓腔冲洗,将得到的骨髓细胞悬液以 1 500 r/min ($r=6$ cm)离心 10 min,去上清。用 1 mL 培养基重悬细胞沉淀,再用 200 目滤网过滤。取 9 mL 含有粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和 IL-4 的 DCs 培养基冲洗滤网,得到细胞悬液 10 mL,置于含有 5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养 48 h。换液、半量换液。培养到第 6 天时,细胞计数并接种到六孔板,进行药物干预,持续 48 h。分组:Medium alone 组、AngII(100 nmol/L)组、ox-LDL(50 μg/mL)+Ang II 组;3 组样品均加入等量的坏死心肌细胞上清液。

1.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子 IL-6、TNF-α 及 IL-10 的浓度 取 DCs 上清液。按照 R&D system 公司提供的试剂盒进行 IL-6、TNF-α 及 IL-10 的检测。用酶标仪于 450 nm 波长处测定光密度(D₄₅₀)值,计算结果。

1.3 流式细胞术 取 100 μL 细胞悬液,参照抗体说明书加流式抗体(anti-CD83, anti-CD86),避光 4℃孵育 45 min, PBS 缓冲液洗涤;以 1 500 r/min ($r=6$ cm)离心 10 min;重复操作 1 次;弃上清,再加入 400 μL PBS 重悬细胞,上机进行流式细胞检测。

1.4 细胞迁移测定(划痕实验) 细胞培养至单层;PBS 洗涤,培养基饥饿 16 h;用无菌 Tip 划出一

道划痕,PBS 洗涤 2 次,去除划下和未贴壁细胞,显微镜下拍照;加入 ox-LDL 和(或)Ang II,继续培养 24 h,显微镜下成像;计数迁移至划痕区的细胞^[2]。

1.5 坏死心肌细胞的制备 为了获得坏死的心肌细胞,体外模拟心肌梗死的内环境,把 HL-1 心肌细胞在液氮冷冻,再 37℃解冻,反复冻融 5 次。通过胎盘蓝染色观察坏死细胞数量,证实坏死细胞为 90%以上。以 3 000 r/min($r=6$ cm)离心 10 min,收集坏死心肌细胞上清液待用^[3]。

1.6 蛋白免疫印迹法 收集细胞,抽提蛋白,测定浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜。封闭后,将膜置于抗体孵育盒,参照抗体说明书加入合适浓度的一抗,室温温育 2 h 或 4℃过夜(>8 h)。洗膜,然后用 1:5 000 HRP 标记的二抗孵育膜 1 h,曝光显影。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ox-LDL 在 Ang II 基础上进一步增强 DCs 的迁移 结果(图 1A)显示:Ang II 能够增强 DCs 迁移,而 ox-LDL 可以在 Ang II 基础上进一步诱导 DCs 的迁移($P<0.05$)。

2.2 ox-LDL 在 Ang II 基础上进一步诱导 DCs 免疫成熟标志和协同刺激分子的表达 结果(图 1B)表明:Ang II 能够促进 DCs 表达成熟标志物 CD83 和协同刺激分子 CD86;ox-LDL 能够在 Ang II 的基础上进一步诱导 CD83、CD86 的表达($P<0.05$),说明高脂内环境较单纯的 MI 内环境能够进一步激发体内的炎症机制,加重梗死后心肌炎症反应。

2.3 ox-LDL 在 Ang II 基础上进一步诱导 DCs 分泌炎症因子 结果(图 1C)显示:ox-LDL 能够在 Ang II 基础上进一步促进 TNF-α 和 IL-6 的分泌($P<0.05$),说明高脂状态刺激下进一步促进 DCs 的炎症因子的释放,加重炎症反应。

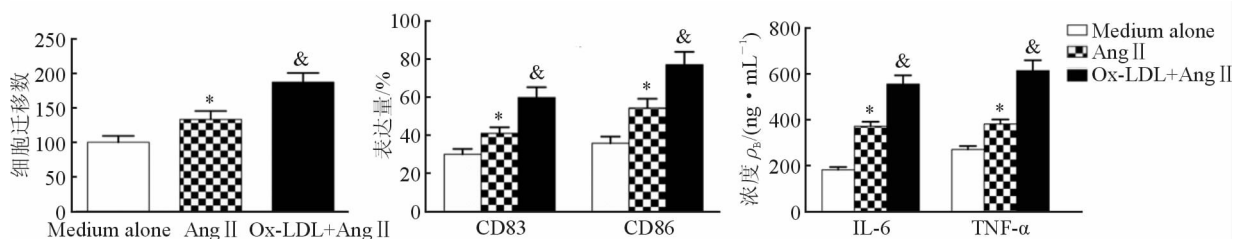


图1 ox-LDL 在 Ang II 基础上进一步诱导 DCs 迁移能力(A)、成熟(B)和炎症因子分泌(C)

* $P<0.05$ 与 Medium alone 相比; & $P<0.05$ 与 Ang II 相比

2.4 ox-LDL+Ang II 可以诱导 DCs 激活 NF-κB 信号通路 结果(图 2)表明:与单纯给予 Ang II 干预相比,ox-LDL+Ang II 可以进一步诱导 IκB 和 NF-κB 磷酸化($P<0.05$)。

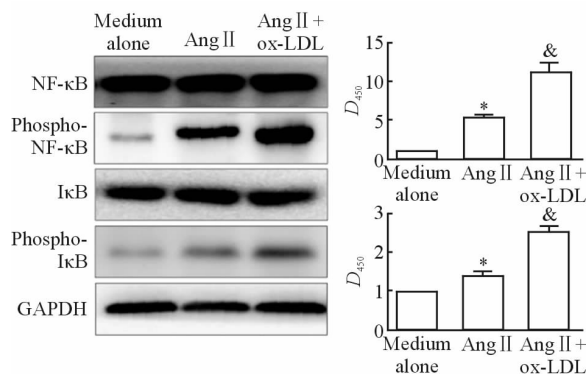


图 2 ox-LDL 和 Ang II 对 NF-κB 信号通路的影响
* $P<0.05$ 与 Medium alone 相比; & $P<0.05$ 与 Ang II 相比

2.5 ox-LDL+AngII能够诱导 DCs 激活 Toll 样受体 4(TLR4) 信号通路 结果(图 3A)表明:ox-LDL 在 AngII 的基础上上调了 TLR4 和髓样分化因子 88(MyD88)的表达,同时上调了 TLR4 下游分子 IRAK-4 的磷酸化程度($P<0.05$);ox-LDL 对 TRIF 的表达影响不大。结果提示,ox-LDL 在 AngII 的基础上进一步激活 TLR4-MyD88-IRAK-4 信号通路。

2.6 ox-LDL+AngII能够诱导 DCs 表面血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)的表达 结果(图 3B)表明:ox-LDL 在 AngII 的基础上能进一步上调 LOX-1 受体的表达($P<0.05$),提示 LOX-1 可能介入了高脂环境下 DCs 的进一步免疫成熟和炎症反应。

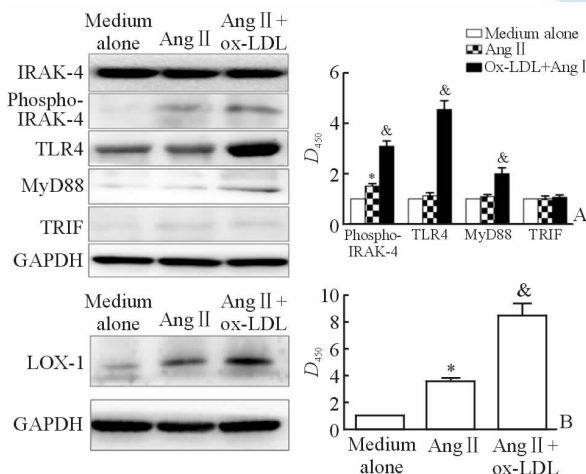


图 3 ox-LDL+Ang II 对 DCs 激活 TLR4 信号通路及 LOX-1 表达的影响

A: ox-LDL 和 Ang II 对 TLR4-Myd88 信号通路的影响; B: ox-LDL+Ang II 诱导 LOX-1 进一步表达. * $P<0.05$ 与 Medium alone 相比; & $P<0.05$ 与 Ang II 相比

3 讨论

ox-LDL 具有细胞毒性,是早期心室重构的危险因子,影响心脏结构和功能^[4-5]。既往研究证明,ox-LDL 在心脏组织中的浓度可能远高于其血液浓度,可以在损伤内皮后直接作用于心肌细胞,从而导致心肌细胞肥厚^[6]。还有研究^[7]提示,MI 后患者血清 ox-LDL 抗体水平显著升高,并与 MI 患者死亡率正相关。同样,MI 后外周血液中 Ang II 水平激增^[8-9],同时影响梗死区和非梗死区的心肌重构。

Ang II 与 ox-LDL 之间有密不可分的联系^[10-11]。Ang II 和 ox-LDL 分别可增加冠脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)和血管紧张素转换酶(ACE)的表达。DCs 在动脉硬化斑块及梗死心肌中发生聚集,而 ox-LDL^[2]和 Ang II^[3]能诱导 DCs 的成熟。LOX-1 是摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体^[12]。LOX-1 主要表达于血管内皮细胞及纤维母细胞^[13]等,而近年研究发现其在 DCs 表面也有表达^[14],参与抗原递呈过程。

为了揭示高脂环境下 DCs 免疫成熟以及炎症反应,本研究通过体外培养 C57BL/6J 小鼠的骨髓细胞,采用 GM-CSF 及 IL-4 诱导分化 DCs。同时,为了模拟小鼠高脂及 MI 后 RAS 激活的内环境,本研究利用 Ang II 和 ox-LDL 干预 DCs 观察其免疫成熟和炎症反应情况,结果发现 ox-LDL 在 Ang II 基础上进一步诱导 DCs 免疫成熟和致炎性因子的分泌。

既往研究证实 TLR4、NF-κB 和 LOX-1 共同表达于 DCs^[14-15]。TLRs 在免疫应答中可以通过 MyD88 信号通路和 TRIF 信号通路进行信号转导。研究^[16]显示,ox-LDL 诱导循环及系统炎症部分可能通过 TLR4 途径实现,这提示 TLR4 可能在脂质分子和炎症反应及 MI 间扮演着重要角色。既往研究^[17]证实,TLR4 参与动脉粥样硬化的炎症反应。另外,TLR4 表达上调还被认为与急性冠脉综合征^[18]以及 C 反应蛋白正常的冠心病患者的严重程度正相关^[19]。NF-κB 作为一个多向性核转录因子,参与调节免疫炎症反应和细胞增殖等。研究发现,NF-κB 与动脉粥样硬化^[20]和冠心病^[21]的炎症反应有着密切联系。NF-κB 不仅能够介导 TLR4 下游信号传导,而且,还能反向上调 TLR4 的表达,两者之间可能存在正反馈过程^[22]。

本研究发现,在 Ang II 和 ox-LDL 同时干预时,

NF- κ B/I κ B的磷酸化增强,提示NF- κ B通路参与了ox-LDL进一步诱导DCs免疫成熟和炎症反应过程。本研究还发现,ox-LDL+Ang II可以诱导DCs中TLR4/MyD88的激活和IRAK-4的磷酸化,而TRIF在ox-LDL+Ang II作用下,表达未明显增强。IRAK-4的磷酸化是激活NF- κ B通路的重要步骤,因此推断TLR4/MyD88-NF- κ B通路参与DCs免疫成熟和炎症反应过程^[23]。

综上所述,本研究发现,ox-LDL在Ang II基础上进一步上调了LOX-1的表达,同时激活了TLR4/MyD88-NF- κ B通路,说明LOX-1和TLR4/MyD88-NF- κ B通路均介入了DCs参与高脂血症合并心肌梗死发生和发展的过程。

参考文献

- [1] VAN DER BORGHT K, SCOTT C L, NINDL V, et al. myocardial infarction primes autoreactive T cells through activation of dendritic cells[J]. *Cell Rep*, 2017,18(12):3005-3017.
- [2] 梁春, 罗育坤, 黄东, 等. 氧化修饰低密度脂蛋白可诱导人单核细胞源树突状细胞形成泡沫细胞[J]. *中国病理生理杂志*, 2006,22(10):1931-1934.
- [3] MA Y, CHEN Z, ZOU Y, et al. Atorvastatin represses the angiotensin 2-induced oxidative stress and inflammatory response in dendritic cells via the PI3K/Akt/Nrf 2 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014,2014:148798.
- [4] RIETZSCHEL E R, LANGLOIS M, DE BUYZERE M L, et al. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol is associated with decreases in cardiac function independent of vascular alterations[J]. *Hypertension*, 2008,52(3):535-541.
- [5] DANESE M D, SIDELNIKOV E, KUTIKOVA L. The prevalence, low-density lipoprotein cholesterol levels, and treatment of patients at very high risk of cardiovascular events in the United Kingdom: a cross-sectional study[J]. *Curr Med Res Opin*, 2018;1-7.
- [6] TSUTAMOTO T, WADA A, MATSUMOTO T, et al. Relationship between tumor necrosis factor- α production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001,37(8):2086-2092.
- [7] WU R, NITYANAND S, BERGLUND L, et al. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997,17(11):3159-3163.
- [8] LEUSCHNER F, PANIZZI P, CHICO-CALERO I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (11): 1364-1373.
- [9] SATO A, UEDA C, KIMURA R, et al. Angiotensin II induces the aggregation of native and oxidized low-density lipoprotein[J]. *Eur Biophys J*, 2018,47(1):1-9.
- [10] NICKENIG G, SACHINIDIS A, MICHAELSEN F, et al. Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 1997,95(2):473-478.
- [11] NICKENIG G, HARRISON D G. The AT (1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I : oxidative stress and atherogenesis[J]. *Circulation*, 2002,105(3):393-396.
- [12] SAWAMURA T, KUME N, AOYAMA T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein[J]. *Nature*, 1997,386(6620):73-77.
- [13] CHEN K, CHEN J, LIU Y, et al. Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids[J]. *Hypertension*, 2005, 46(3):622-627.
- [14] DELNESTE Y, MAGISTRELLI G, GAUCHAT J, et al. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation[J]. *Immunity*, 2002,17(3):353-362.
- [15] AKIRA S. Toll-like receptor signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003,278(40):38105-38108.
- [16] PASINI A F, ANSELMINI M, GARBIN U, et al. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007,27(9):1991-1997.
- [17] XU X H, SHAH P K, FAURE E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL[J]. *Circulation*, 2001,104(25):3103-3108.
- [18] METHE H, KIM J O, KOFLER S, et al. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome[J]. *Circulation*, 2005, 111 (20):2654-2661.
- [19] SHIRAKI R, INOUE N, KOBAYASHI S, et al. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein[J]. *Life Sci*, 2006,80(1):59-66.
- [20] CERCEK B, YAMASHITA M, DIMAYUGA P, et al. Nuclear factor- κ B activity and arterial response to balloon injury[J]. *Atherosclerosis*, 1997,131(1):59-66.
- [21] RITCHIE M E. Nuclear factor- κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris [J]. *Circulation*, 1998,98(17):1707-1713.
- [22] TANG Z H, PENG J, REN Z, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Atherosclerosis*, 2017,262:113-122.
- [23] WU D M, WANG Y J, HAN X R, et al. Tanshinone IIA prevents left ventricular remodelling via the TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway in rats with myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2018,22(6):3058-3072.