

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.001

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190619.0854.004.html(2019-06-19)

## HO-1 通过下调 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 泡沫样变\*

尹延伟<sup>1</sup>, 孙倩倩<sup>2</sup>, 沈 勇<sup>3</sup>, 胡爱民<sup>4</sup>, 王 琦<sup>4</sup>, 陈大伟<sup>1</sup>, 赵炫柱<sup>1</sup>, 石 进<sup>1△</sup>

(1. 空军特色医学中心神经内科, 北京 100142; 2. 北京卫戍区第九离职干部休养所 100021;

3. 武警河北省总队医院综合病房, 石家庄 050081; 4. 空军特色医学中心急诊部, 北京 100142)

**[摘要]** **目的** 探讨血红素加氧酶-1(HO-1)在血管平滑肌细胞(VSMCs)泡沫样变过程中的作用及可能的机制。**方法** 用组织贴块法体外培养 C57BL/6J 背景野生型小鼠及 TLR4 基因敲除(TLR4<sup>-/-</sup>)小鼠主动脉 VSMCs;用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激 VSMCs 泡沫样变构建细胞模型,利用 HO-1 激动剂钴原卟啉(CoPPIX)及抑制剂锌卟啉(ZnPPIX)刺激模型细胞;用油红 O 染色观察 VSMCs 内脂质聚积情况;酶法检测 VSMCs 内胆固醇水平;蛋白免疫印迹(Western blot)检测 VSMCs 中 HO-1、Toll 样受体 4(TLR4)表达情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 VSMCs 培养液中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达情况,以探索 HO-1 在 VSMCs 泡沫样变过程中的具体作用。**结果** ox-LDL 刺激 VSMCs 48 h 显著诱导 VSMCs 泡沫样变;ox-LDL 诱导 VSMCs 泡沫样变过程中伴随着 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF-α 表达的上调;而对于 TLR4<sup>-/-</sup>型 VSMCs,ox-LDL 刺激并不能有效诱导 VSMCs 泡沫样变及影响 IL-6、TNF-α 表达;激活 HO-1 显著抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变,伴随着 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF-α 表达的下调;而抑制 HO-1 进一步促进 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变,同时伴随着 TLR4 及其下游炎症因子 IL-6、TNF-α 表达的上调。**结论** HO-1 的激活可通过下调 TLR4 介导的炎症反应抑制 VSMCs 泡沫细胞的形成。

**[关键词]** 血红素加氧酶-1;Toll 样受体 4;肌,平滑,血管;肌细胞,平滑肌;泡沫细胞**[中图分类号]** R543**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2701-04

### HO-1 inhibits ox-LDL-induced VSMC foam cell formation by down-regulating TLR4-mediated inflammation\*

YIN Yanwei<sup>1</sup>, SUN Qianqian<sup>2</sup>, SHEN Yong<sup>3</sup>, HU Aimin<sup>4</sup>, WANG Qi<sup>4</sup>,CHEN Dawei<sup>1</sup>, ZHAO Xuanzhu<sup>1</sup>, SHI Jin<sup>1△</sup>

(1. Department of Neurology, Air Force Medical Center, Beijing 100142, China;

2. The Ninth Sanatorium of Beijing Garrison Command of Weishu District, Beijing 100021, China;

3. Comprehensive Ward, Hebei Provincial Corps Hospital of PAP, Shijiazhuang, Hebei 050081, China;

4. Department of Emergency, Air Force Medical Center, Beijing 100142, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role and possible mechanism of heme oxygenase-1 (HO-1) in the foam cell formation of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Primary VSMCs isolated from the thoracic aorta of the wild-type mice C57BL/6J and Toll like receptor 4 (TLR4) knockout (TLR4<sup>-/-</sup>) mice were cultured in vitro by tissue patch method. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was used to induce the VSMC foaming. In this process, CoPPIX and ZnPPIX were respectively used to promote or inhibit the HO-1 expression. Red oil O staining was used to observe the intracellular lipid deposition; cholesterol level in VSMCs was detected by enzymatic assay; the HO-1 and TLR4 expression levels were detected by Western blot; the levels of IL-6 and TNF-α were quantified by using ELISA. **Results** ox-LDL stimulated VSMCs for 48 h and induced foam-like changes successfully, and this process was accompanied by the up-regulation of the TLR4, IL-6 and TNF-α. However, in TLR4<sup>-/-</sup> VSMCs, ox-LDL failed to induce the VSMC foaming changes and affect the expression levels of IL-6, TNF-α. Up-regulation of HO-1 inhibited the VSMC foaming changes which induced by ox-LDL, and down-regulated the expression levels of TLR4, IL-6 and TNF-α, while down-regulation of HO-1 may play the opposite role. **Conclusion** The up-regulation of HO-1 could inhibit the VSMC foaming changes which induced by ox-LDL via suppressing TLR4-mediated inflammation.

**[Key words]** heme oxygenase-1; Toll like receptor 4; muscle, smooth, vascular; myocytes, smooth muscle; foam cells

动脉粥样硬化是多种心脑血管疾病、外周血管疾病发生的病理基础<sup>[1]</sup>。炎症反应在动脉粥样硬化病变过程中发挥着重要的作用<sup>[2]</sup>。研究证实动脉粥样硬化斑块中泡沫细胞的形成与脂质代谢紊乱及炎症反应密切相关<sup>[3]</sup>。因此,积极探讨炎症反应在泡沫细胞形成过程中的机制和关键的调控分子,对寻找防治动脉粥样硬化的新靶点具有重要意义。

血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)在抑制体内氧化应激及炎症反应方面发挥重要的作用。近年研究表明 HO-1 在动脉粥样硬化发生发展中起到关键的作用<sup>[4]</sup>。Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4) 是人体启动先天性免疫和炎症反应的重要模式识别受体,其在人体中主要表达于巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞等免疫细胞表面,同时在动脉壁的内皮细胞、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)、纤维原细胞等表面也有表达。TLR4 可通过激活下游核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)炎症信号通路参与机体的动脉粥样硬化炎症反应过程<sup>[3,5]</sup>。本研究在 C57BL/6J 背景野生型小鼠与 TLR4 基因敲除(TLR4<sup>-/-</sup>)小鼠中对 HO-1 在 VSMCs 泡沫样变过程中的具体作用进行探讨,旨在为动脉粥样硬化的防治提供新的理论依据,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 4~8 周龄 C57BL/6J 背景野生型小鼠与 TLR4<sup>-/-</sup>小鼠分别购自陆军特色医学中心野战外科研究所实验动物中心与上海南方模式生物科技发展有限公司,无特定病原体(SPF)级环境饲养。实验用小鼠均为雄性小鼠。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

**1.1.2 主要试剂** DMEM 培养液、胰酶购自美国 Hyclone 公司、胎牛血清(FBS)、青素溶液、链霉素溶液氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)购自广州奕源生物有限公司; $\beta$ -actin 一抗、TLR4 一抗、HO-1 一抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;油红 O、HO-1 激动剂钴原卟啉(CoPPIX)、HO-1 抑制剂锌卟啉(ZnPPIX)购自美国 Sigma 公司;山羊抗小鼠二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;IL-6、TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自美国 R&D Systems 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与实验分组** 小鼠麻醉后取胸主动脉,组织贴块法培养原代 VSMCs。VSMCs 均匀接种于培养皿中,用含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养;采用胰酶消化液进行传代,选取 3~6 代状态良好的细胞进行实验。按实验要求进行分组:空白对照组:VSMCs 不加任何干预因素;ox-LDL 组:加 ox-LDL (80  $\mu$ g/mL)刺激 72 h;TLR4<sup>-/-</sup> + ox-LDL 组:

TLR4<sup>-/-</sup> VSMCs 加 ox-LDL(80  $\mu$ g/mL)刺激 72 h; CoPPIX+ox-LDL 组:CoPPIX(50  $\mu$ mol/L)预先处理 VSMCs 12 h 后再加入 ox-LDL(80  $\mu$ g/mL)刺激 72 h;ZnPPIX+ox-LDL 组:ZnPPIX(50  $\mu$ mol/L)预先处理 VSMCs 12 h 后再加入 ox-LDL(80  $\mu$ g/mL)刺激 72 h。

**1.2.2 油红 O 染色** 各组 VSMCs 首先用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,然后用 10% 多聚甲醛固定 VSMCs 20 min,在避光条件下用油红 O 工作液染色 VSMCs 30 min,最后应用去离子水冲洗 VSMCs 后显微镜下观察。

**1.2.3 胆固醇水平的检测** VSMCs 胆固醇水平的检测方法依据 XUE 等<sup>[6]</sup>的研究。各组 VSMCs 首先在离心管中应用萃取液(100  $\mu$ L 异丙醇)提取脂质成分;然后应用超声破碎仪将 VSMCs 充分破碎,在 1 500 $\times$ g 条件下离心 10 min,收集离心管中的上清液;最后采用酶法检测 VSMCs 中胆固醇水平。测定的结果根据细胞蛋白水平进行标准化。

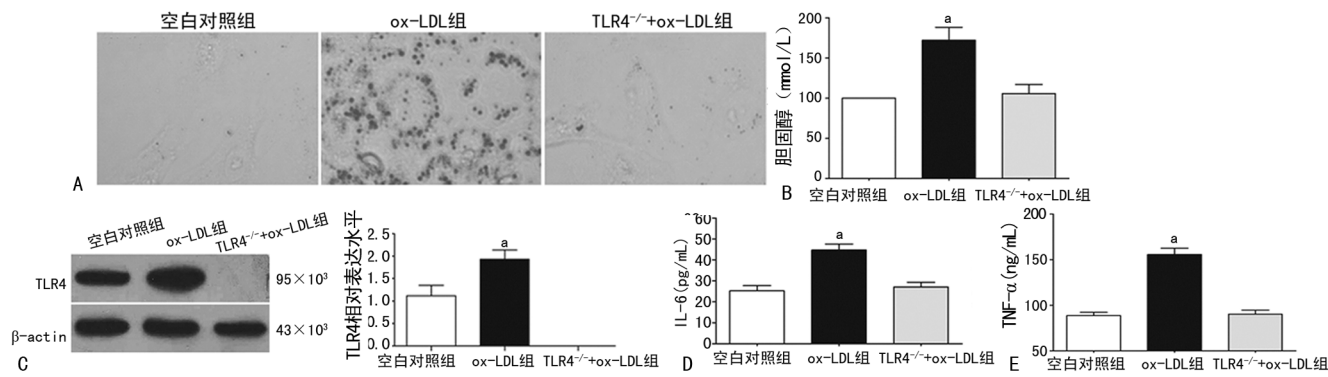
**1.2.4 Western blot** 细胞裂解法提取各组 VSMCs 蛋白并定量检测;50  $\mu$ g 蛋白样品上样,经电泳、转膜、封闭后,加一抗(HO-1 一抗稀释比例 1 : 1 000;TLR4 一抗稀释比例 1 : 1 000; $\beta$ -actin 一抗稀释比例 1 : 1 000)4 °C 孵育过夜,缓冲液洗脱后,加二抗(1 : 2 000)室温孵育 2 h,缓冲液洗脱。应用化学发光法曝光,最后应用 Lab4.6 软件对扫描的 Western blot 图像进行数据分析。

**1.2.5 ELISA** VSMCs 培养液中炎症因子水平的检测方法依据本课题组之前的研究<sup>[7]</sup>。简而言之,首先收集 VSMCs 培养液,设定标准孔、对照孔、待测样品孔,酶标板上覆膜,室温条件下静置 2 h,倒尽板孔中的液体并洗涤 5 次;然后每个板孔中添加 100  $\mu$ L IL-6 或 TNF- $\alpha$  偶联物,加盖覆膜,室温静置 2 h;倒尽板孔中液体并再次洗涤 5 次;每个板孔中添加 100  $\mu$ L 底物溶液,于暗室(室温条件下)静置 30 min;最后每个板孔中添加 100  $\mu$ L 终止液,摇晃反应 3~5 min;用酶联免疫检测仪记录 450 nm 处吸光度(A)值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,实验中所涉及的研究均至少重复 3 次。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

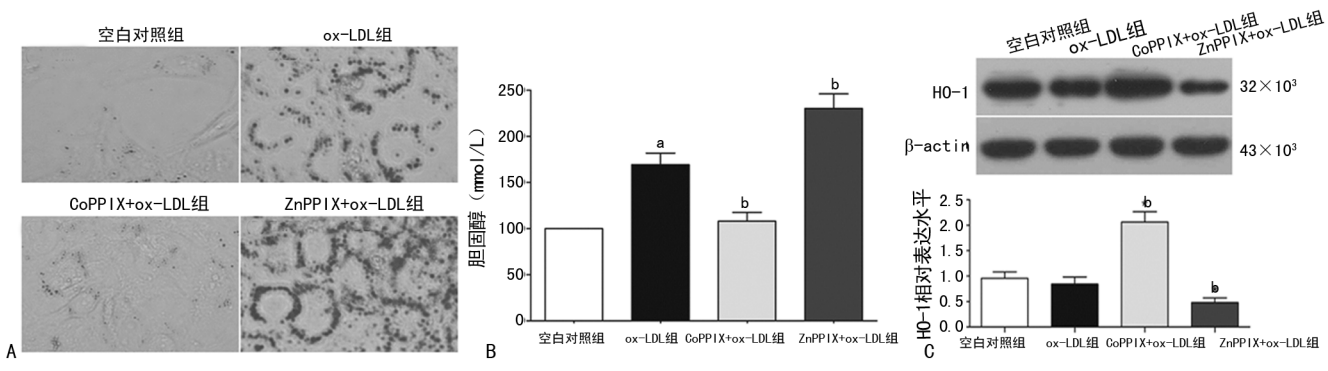
## 2 结果

**2.1 ox-LDL 显著促进 VSMCs 细胞内脂质的聚集** VSMCs 与 ox-LDL 共同孵育 72 h 后,VSMCs 内有大量脂滴形成,符合泡沫细胞的形态特点;而空白对照组 VSMCs 内未见脂滴形成。此外,细胞胆固醇水平测定结果也显示,与空白对照组 VSMCs 相比,ox-LDL 组 VSMCs 细胞内胆固醇水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。



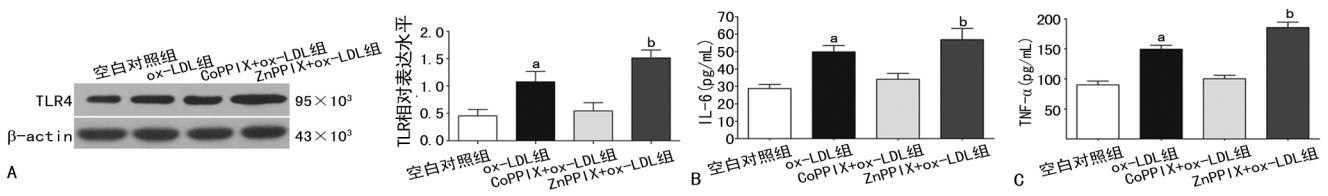
A: 油红 O 染色; C: 胆固醇水平检测; C: TLR4 Western blot 及其表达分析; D: IL-6 表达水平检测; E: TNF-α 表达水平检测; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较

图 1 VSMCs 泡沫样变及胆固醇、TLR4、IL-6、TNF-α 表达水平的检测



A: 油红 O 染色; B: 胆固醇水平检测; C: HO-1 表达水平检测; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较

图 2 VSMCs 泡沫样变、细胞内脂质聚集情况及 HO-1 表达水平的检测



A: TLR4 Western blot 及其表达分析; B: IL-6 表达水平检测; C: TNF-α 表达水平检测; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ox-LDL 组比较

图 3 VSMCs TLR4、IL-6、TNF-α 表达水平的检测

**2.2 ox-LDL 刺激通过激活 TLR4 介导的炎症反应促进 VSMCs 泡沫样变** ox-LDL 组中 ox-LDL 刺激较空白对照组显著诱导了 VSMCs 内大量脂滴聚集, 也显著上调了 TLR4 及其介导的炎症因子 (IL-6、TNF-α) 的表达水平, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而对于 TLR4<sup>-/-</sup> + ox-LDL 组, ox-LDL 刺激较空白对照组并不能有效促进 VSMCs 内脂滴聚集; 此外, ox-LDL 刺激也不影响 TLR4<sup>-/-</sup> VSMCs 内 TLR4 及其介导的炎症因子 (IL-6、TNF-α) 的表达水平, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 1、图 3。

**2.3 激活 HO-1 抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变** 用 CoPPiX 预先处理 VSMCs 激活 HO-1 后再加入 ox-LDL 刺激, CoPPiX + ox-LDL 组 VSMCs 内脂滴聚集明显较 ox-LDL 组减轻; 而用 ZnPPiX 预先处理 VSMCs 抑制 HO-1 后再加入 ox-LDL 刺激, ZnPPiX + ox-LDL 组 VSMCs 内脂滴聚集情况较 ox-LDL 组更加明显, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),

见图 2。  
**2.4 HO-1 下调 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变** 用 CoPPiX 预先处理 VSMCs 激活 HO-1 后再加入 ox-LDL 刺激, CoPPiX + ox-LDL 组并不能有效上调 TLR4 及其介导的炎症因子 (IL-6、TNF-α) 的表达水平, 与空白对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 进一步应用 ZnPPiX 预先处理 VSMC 抑制 HO-1 后再加入 ox-LDL 刺激, ZnPPiX + ox-LDL 组 TLR4 及其介导的炎症因子 (IL-6、TNF-α) 的表达水平较 ox-LDL 组上调更加明显, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

**3 讨论**

动脉粥样硬化是一种动脉血管进行性堵塞的慢性疾病。动脉粥样硬化作为多种心脑血管疾病、外周血管疾病发生的共同病理基础<sup>[1]</sup>, 目前其已经成为世界范围内引起死亡的主要原因之一。因此, 积极探讨动脉粥样硬化发生发展的具体机制对动脉粥样硬化

相关性疾病的防治具有重要的指导意义。泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化病变发生发展过程中非常重要的病理过程<sup>[3]</sup>。泡沫细胞主要来源于巨噬细胞及 VSMCs。然而,相比巨噬细胞,目前关于 VSMCs 源性泡沫细胞形成的具体机制研究很少。

慢性炎症反应是动脉粥样硬化病变发生、发展的一大病理基础<sup>[3]</sup>。TLR4 是启动免疫和炎症反应的重要膜受体,其在体内引发炎症反应方面发挥至关重要的作用。有研究显示 TLR4 参与动脉粥样硬化病变的发生发展过程,并与泡沫细胞的形成密切相关<sup>[3,5,7]</sup>。本研究中,笔者成功应用 ox-LDL 刺激 C57BL/6J 背景野生型小鼠来源 VSMCs 诱导其泡沫样变,并检测 TLR4 及其介导的炎症反应。结果提示 ox-LDL 刺激在明显诱导 VSMCs 泡沫样变的同时可显著激活 TLR4 及其介导的炎症反应;而对于 TLR4<sup>-/-</sup>小鼠来源的 VSMCs,ox-LDL 刺激并不能有效诱导 VSMCs 的泡沫样变,此外 ox-LDL 刺激也不能有效激活 TLR4<sup>-/-</sup>小鼠来源 VSMCs 内炎症反应。说明 VSMCs 泡沫样变过程中伴随着 TLR4 介导的炎症反应激活,而 TLR4 缺陷损害 ox-LDL 对 VSMCs 泡沫样变的促进作用。以上结果进一步说明了 TLR4 介导的炎症反应在 VSMCs 泡沫样变的过程中发挥非常重要的作用。

HO-1 是动物体内重要的保护性蛋白,在人体血管内皮细胞、巨噬细胞及 VSMCs 等细胞内均有表达,可被各种化学和生理应激所激活,如炎症反应、氧化应激反应及内毒素等。有研究表明 HO-1 可能参与了动脉粥样硬化病变中 TLR4 介导的炎症反应的调控,如激活 HO-1 可能通过影响 TLR4 介导的炎症反应而抑制 VSMC 增殖与迁移<sup>[8-10]</sup>。但 VSMC 中激活的 HO-1 是否通过影响 TLR4 介导的炎症反应参与 VSMC 内脂质聚积和细胞的泡沫样变过程,目前还未见有文献报道。基于以上研究笔者推测:激活 HO-1 可通过干扰 TLR4 介导的炎症反应而影响 VSMC 泡沫样变。为了验证以上假设,笔者应用 HO-1 激动剂和抑制剂分别激活和抑制 HO-1 表达,观察 HO-1 表达变化对 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变的影响,同时检测 TLR4 及其介导的炎症反应激活情况。结果显示激活 HO-1 显著抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 泡沫样变,而抑制 HO-1 进一步促进 ox-LDL 诱导的 VSMC 泡沫样变;同时在激活 HO-1 状态下,ox-LDL 刺激不能有效激活 TLR4 及其介导的炎症反应,而抑制 HO-1 后再加入 ox-LDL 刺激,TLR4 及其介导的炎症反应较单独 ox-LDL 刺激激活更加明显。说明激活 HO-1 可通过下调 TLR4 介导的炎症反应抑制 ox-LDL 诱导的 VSMCs 泡沫样变。

综上所述,本研究发现在 VSMC 泡沫样变过程

中 HO-1 可通过下调 TLR4 介导的炎症反应抑制 VSMCs 对脂质的摄取进而阻碍泡沫样变的发生。以上结论为动脉粥样硬化相关性疾病的防治提供了新的理论基础。

## 参考文献

- [1] ALEX Y T, PAIS E, WENBY R B, et al. Abnormal blood rheology and chronic low grade inflammation; Possible risk factors for accelerated atherosclerosis and coronary artery disease in Lewis negative subjects[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 248-251.
- [2] HARTMAN J, FRISHMAN W H. Inflammation and atherosclerosis; a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy[J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(3): 147-151.
- [3] YANG K, ZHANG X J, CAO L J, et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95935.
- [4] DING Y, ZHANG B, ZHOU K, et al. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 20, 175(3): 508-514.
- [5] 尹延伟, 孙倩倩, 张英谦, 等. 脂联素通过干扰 TLR4 介导的炎症反应抑制血管平滑肌细胞泡沫化[J]. *重庆医学*, 2016, 45(32): 4465-4467.
- [6] XUE J H, YUAN Z, WU Y, et al. High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(1): 141-150.
- [7] 龙小琴, 戴应和, 袁经权, 等. 甘草查尔酮 A 对 THP-1 巨噬细胞促炎因子表达的影响-依赖于 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(12): 1212-1218.
- [8] KIM N, HWANGBO C, LEE S, et al. Eupatolide inhibits PDGF-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells through ROS-dependent heme oxygenase-1 induction [J]. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 1700-1707.
- [9] ASHINO T, YAMAMOTO M, YOSHIDA T, et al. Red-ox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(4): 760-768.
- [10] PI Y, ZHANG L L, LI B H, et al. Inhibition of reactive oxygen species generation attenuates TLR4-mediated proinflammatory and proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(8): 880-887.