

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.02.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211230.1425.015.html\(2021-12-31\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211230.1425.015.html(2021-12-31))Wnt/ β -catenin 信号通路在可溶性 Klotho 蛋白抑制 THP-1 泡沫细胞形成过程中的作用*刘 玮,李 琳[△],刘佳妮,石 晶,洪 晔,陈秀娟,葛小金

(湖北省武汉市中心医院老年科 430014)

[摘要] **目的** 探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路在可溶性 Klotho 蛋白抑制 THP-1 泡沫细胞形成过程中的作用。**方法** THP-1 单核细胞在佛波酯的作用下诱导分化成为 THP-1 巨噬细胞,再由氧化型低密度脂蛋白诱导其转变为泡沫细胞,可溶性 Klotho 蛋白和 β -甘油磷酸进行预处理。采用油红 O 染色法观察各组细胞内脂滴的形成情况,酶荧光法检测细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)及胆固醇酯(CE)水平,Western blot 法检测 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达,免疫荧光染色法检测细胞内 β -catenin 表达及分布情况。**结果** 与阳性对照组比较,Klotho 蛋白组 TC、CE 的水平明显降低, β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达明显减少, β -catenin 表达和分布明显减少; β -甘油磷酸组 TC、CE 水平明显升高, β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达明显增加, β -catenin 表达和分布明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 β -甘油磷酸组比较,Klotho 蛋白 + β -甘油磷酸组 TC、CE 水平明显降低, β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达明显减少, β -catenin 表达和分布明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 可溶性 Klotho 蛋白可能通过抑制 Wnt/ β -Catenin 信号通路从而抑制 THP-1 泡沫细胞形成。

[关键词] Klotho 蛋白;Wnt/ β -catenin 信号通路;泡沫细胞;动脉粥样硬化**[中图分类号]** R543.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)02-0187-05Effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway in process of soluble Klotho protein suppressing THP-1 foam cell*LIU Wei,LI Lin[△],LIU Jiani,SHI Jin,HONG Tian,CHEN Xiujuan,GE Xiaojin

(Department of Geriatrics,Wuhan Municipal Central Hospital,Wuhan,Hubei 430014,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in the process of soluble Klotho protein inhibiting THP-1 foam cell. **Methods** THP-1 monocytes were induced and differentiated into the THP-1 macrophages under the action of phorbol ester,then induced by oxidized low density lipoprotein to transform into the foam cells,the pretreatment was performed by soluble Klotho protein and β -glycerophosphoric acid. The intracellular lipid droplets formation was observed by oil red O staining. The levels of intracellular total cholesterol (TC),free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) were detected by the enzyme fluorescence method. The expressions of β -catenin,c-myc and cyclinD1 protein were determined by Western blot. The expression levels and distribution of β -catenin were observed by the immunofluorescence staining. **Results** Compared with the positive control group,the TC and CE levels in the Klotho protein group were significantly decreased, β -catenin,c-myc and cyclinD1 proteins expressions were significantly decreased,the expression and distribution of β -catenin were significantly decreased;the TC and CE levels in the β -glycerophosphoric acid group increased, β -catenin,c-myc and cyclinD1 protein expressions were significantly increased,and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the β -glycerophosphoric acid group,the levels of TC and CE in the Klotho protein + β -glycerophosphoric acid group were significantly decreased,the expressions of β -catenin,c-myc and cyclinD1 protein expressions were significantly decreased,the expression and distribution of β -catenin were significantly decreased,and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The soluble Klotho protein inhibits the THP-1 foam cell formation possibly by suppressing the Wnt/ β -catenin signal pathway.

[Key words] Klotho protein;Wnt/ β -catenin signaling pathway;foam cell;atherosclerosis

Klotho 基因是 KURO-O 等^[1]在 1997 年新发现的与衰老有关的基因, Klotho 的基因敲除小鼠可出现类似人类衰老的各种表现, 比如寿命缩短、骨质疏松、动脉硬化、皮肤萎缩等。Klotho 基因位于第 13 号染色体上, 根据基因结构的差异, 可以表达分泌型 Klotho 及膜型 Klotho 两种蛋白; 膜型 Klotho 蛋白是由全部 Klotho 基因编码生成的, 定位于细胞膜上的一种单链跨膜蛋白, 其胞外区部分可以被水解脱落从而生成分泌型 Klotho 蛋白。除此之外, 分泌型 Klotho 蛋白也可由 Klotho 信使 RNA 的可变修饰来生成^[2]。分泌型 Klotho 能与多种信号通路相互作用^[3-4], 参与调节机体的代谢及细胞活性等过程。研究表明, Klotho 基因与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 密切相关, 具有一定的抗 AS 作用^[5-9]。笔者前期的研究也发现, 可溶性 Klotho 蛋白能够抑制 THP-1 泡沫细胞形成^[10], 但信号通路尚不明确。

激活的 Wnt 信号通路参与心脏发育、AS、心力衰竭、心肌肥厚和血管发育与再生等^[11-12]。早在 2007 年国外的研究就发现, Klotho 蛋白的胞外部分可结合多种 Wnt 配基, 抑制 Wnt 信号通路的激活^[13]。最近 CHEN 等^[14]的研究也发现, Klotho 基因可能部分通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路减少血管平滑肌细胞介导的钙化, 从而发挥抗 AS 作用。本文探讨 Wnt/ β -catenin 信号通路在可溶性 Klotho 蛋白抑制 THP-1 泡沫细胞过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

THP-1 单核细胞株购自美国 ATCC 公司; 佛波酯 (PMA) 购自美国 Gene Operation 公司; 油红 O、 β -甘油磷酸二钠盐合物购自美国 Sigma 公司; 细胞胆固醇检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; TR-Izol 购自美国 Ambion 公司; β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 抗体购自美国 Abcam 公司; β -actin 抗体购自美国 CST 公司; 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 II 抗、FITC 标记的羊抗兔 II 抗均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

THP-1 单核细胞株按说明书进行培养和传代, 加入含 160 nmol/L PMA 的低血清培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 观察细胞是否贴壁, 确定 THP-1 单核细胞已诱导分化为 THP-1 巨噬细胞。然后加入 80 mg/L ox-LDL 的低血清培养液继续培养 48 h, 观察 THP-1 泡沫细胞形成^[15]。将细胞分为阴性对照组 (THP-1 巨噬细胞组)、阳性对照组 (THP-1 泡沫细胞组)、Klotho 蛋白组 (THP-1 巨噬细胞加入

100 ng/L 的可溶性 Klotho 蛋白预处理后 2 h 后, 再按照阳性对照组程序操作)、 β -甘油磷酸组 (THP-1 巨噬细胞经 20 mmol/L 的 β -甘油磷酸作用 24 h 后, 按照阳性对照组程序操作)、Klotho 蛋白 + β -甘油磷酸组 (THP-1 巨噬细胞经 20 mmol/L 的 β -甘油磷酸作用 24 h 后, 按照 Klotho 蛋白组程序操作)。

1.2.2 油红 O 染色

各组细胞分别用 4% 多聚甲醛固定 10~15 min, 油红 O 染色液染色 10 min 后, 用苏木素染液复染 2~3 min, 双蒸水冲洗并封片, 在光学显微镜下可观察到细胞内的脂滴呈红色, 而细胞核呈蓝色。

1.2.3 细胞内总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 和胆固醇酯 (CE) 水平的测定

离心法收集各组细胞, PBS 漂洗 3 次, 超声破碎细胞, 采用酶荧光法分别测定细胞内 TC 和 FC 水平。CE 即为 TC 与 FC 的差值。CE 与 TC 的比值达到 50% 以上的细胞可被认为已转化为泡沫细胞。

1.2.4 Western blot 法检测 β -catenin、c-myc、cyclinD1 蛋白表达

离心法收集各组细胞, 加入细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白, BCA 法测定各组细胞总蛋白的浓度, 9% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 每孔的上样量为 20 μ g, 转膜、封闭, 依次加入 I 抗及 HRP 标记的 II 抗, 滴入 ECL 显影液进行荧光显色, 将膜置于全自动化学发光分析仪中检测。实验结果采用 TANON GIS 软件进行分析并读取条带灰度值; 将各组的 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 分别与相应 β -actin 的面积灰度值进行比较, 二者的比值代表 β -catenin、c-myc 和 cyclinD1 蛋白表达水平。

1.2.5 免疫荧光法检测 β -catenin 表达及分布

细胞爬片, 多聚甲醛固定 15 min, PBS 充分冲洗, Triton-X 100 透膜 20 min, 5% BSA, 37 °C 封闭 1 h, 加 I 抗稀释液, 4 °C 过夜, 加 II 抗稀释液, 37 °C 孵育 1 h, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 孵育 5 min, 抗荧光淬灭剂封片。激光共聚焦显微镜观察。通过 Nikon C2 激光共聚焦显微镜拍照, NIS Elements AR 图像系统采集分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对 *t* 检验和单因素方差分析 (One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 THP-1 泡沫细胞形成情况

油红 O 染色观察到, 阴性对照组的细胞质内红色脂滴较少, 而阳性对照组细胞质内可观察到较多的红

色脂滴,符合泡沫细胞的形态学特征。与阳性对照组相比,Klotho 蛋白组细胞质内红色脂滴数量明显减少; β -甘油磷酸组细胞内可见大量红色脂滴蓄积,细胞泡沫化程度超过阳性对照组;Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组与 β -甘油磷酸组细胞相比,细胞质内红色脂滴明显减少,见图 1。

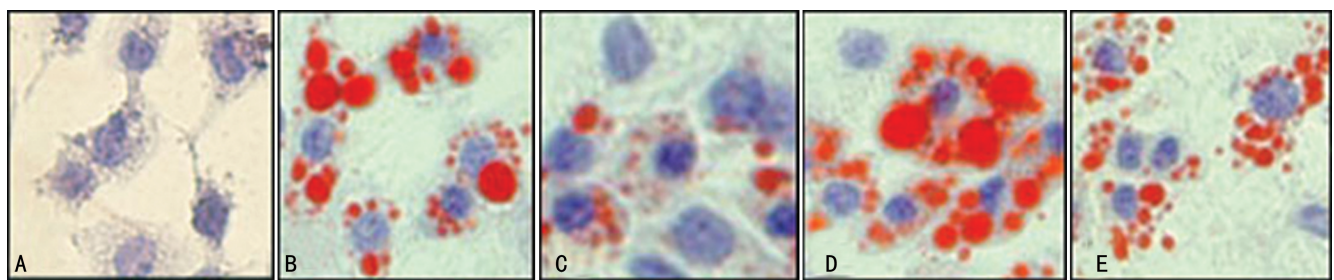
2.2 各组细胞内 TC、FC 和 CE 水平

阴性对照组细胞内 CE/TC<50%,而在阳性对照组中 CE/TC>50%,符合泡沫细胞的生化特征。与阳性对照组相比,Klotho 蛋白组细胞内 TC、CE 的水平明显降低, β -甘油磷酸组细胞内 TC、CE 水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 β -甘油

磷酸组相比,Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组细胞内 TC、CE 水平明显降低($P<0.05$),见表 1。

2.3 各组 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达

与阴性对照组相比,阳性对照组的 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 的蛋白表达水平明显增加($P<0.05$)。与阳性对照组相比,Klotho 蛋白组 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达水平明显减少, β -甘油磷酸组 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达水平明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组与 β -甘油磷酸组细胞相比, β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达水平明显减少($P<0.05$),见表 2、图 2。



A: 阴性对照组;B: 阳性对照组;C: Klotho 蛋白组;D: β -甘油磷酸组;E: Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组。

图 1 各组细胞质内脂滴的变化($\times 400$)

表 1 各组 TC、FC 和 CE 水平

组别	TC($\bar{x}\pm s$, mmol/L)	FC($\bar{x}\pm s$, mmol/L)	CE($\bar{x}\pm s$, mmol/L)	CE/TC(%)
阴性对照组	1.61 \pm 0.27	1.21 \pm 0.16	0.39 \pm 0.08	24.2
阳性对照组	3.80 \pm 0.48*	1.26 \pm 0.18	2.54 \pm 0.28*	66.8*
Klotho 蛋白组	2.65 \pm 0.29 [#]	1.72 \pm 0.33 [#]	0.93 \pm 0.12 [#]	35.1 [#]
β -甘油磷酸组	4.52 \pm 0.88 [#]	1.18 \pm 0.44	3.34 \pm 0.72 [#]	73.9 [#]
Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组	3.23 \pm 0.51 [▲]	1.72 \pm 0.52	1.51 \pm 0.36 [▲]	46.7 [▲]

*: $P<0.05$,与阴性对照组比较;#: $P<0.05$,与阳性对照组比较;▲: $P<0.05$,与 β -甘油磷酸组比较。

表 2 各组细胞 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

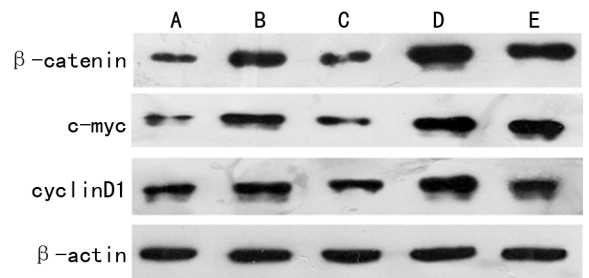
组别	β -catenin	c-myc	cyclinD1
阴性对照组	0.99 \pm 0.17	0.64 \pm 0.06	0.93 \pm 0.14
阳性对照组	1.82 \pm 0.32*	1.18 \pm 0.19*	1.38 \pm 0.24*
Klotho 蛋白组	1.28 \pm 0.25 [#]	0.89 \pm 0.23 [#]	1.05 \pm 0.18 [#]
β -甘油磷酸组	2.52 \pm 0.54 [#]	1.76 \pm 0.48 [#]	1.88 \pm 0.42 [#]
Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组	1.55 \pm 0.51 [▲]	1.22 \pm 0.32 [▲]	1.51 \pm 0.33 [▲]

*: $P<0.05$,与阴性对照组比较;#: $P<0.05$,与阳性对照组比较;▲: $P<0.05$,与 β -甘油磷酸组比较。

2.4 各组细胞内 β -catenin 表达及分布情况

与阴性对照组相比,阳性对照组细胞内的 β -catenin 表达和分布明显增加($P<0.05$)。与阳性对照组

相比,Klotho 蛋白组细胞内 β -catenin 表达和分布明显减少, β -甘油磷酸组 β -catenin 表达和分布明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组与 β -甘油磷酸组细胞相比, β -catenin 的表达和分布明显减少($P<0.05$),见图 3。



A: 阴性对照组;B: 阳性对照组;C: Klotho 蛋白组;D: β -甘油磷酸组;E: Klotho 蛋白+ β -甘油磷酸组。

图 2 各组细胞 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白印迹图

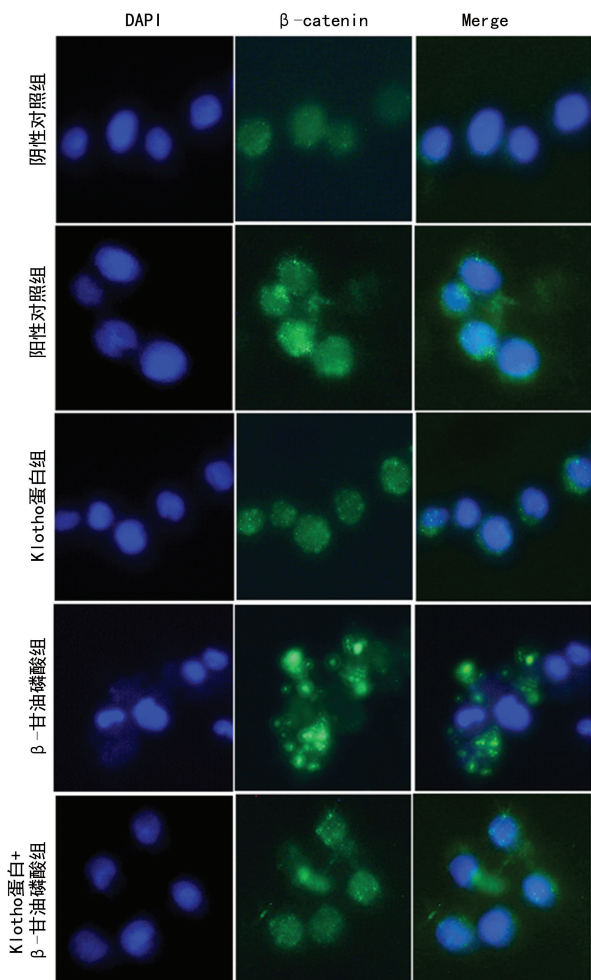


图3 各组细胞内 β -catenin 表达和分布 ($\times 400$)

3 讨 论

近年来的研究显示, Wnt/ β -catenin 信号通路参与了 AS 的发生、发展进程。在 BEDEL 等^[16]对人类颈动脉 AS 斑块的研究中发现, Wnt/ β -catenin 信号通路的关键分子 β -catenin 在破裂斑块中的表达水平明显高于稳定斑块;而在另一个颈动脉 AS 斑块相关的研究中发现, Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶基因产物 Dickkopf 相关蛋白 1(DKK1)在其中的表达也是增高的^[17]。证实了在人类 AS 病变中, Wnt/ β -catenin 信号通路相关分子的表达增高。而且,有研究表明 DKK1 是冠状动脉 AS 的新型生物标志物之一^[18]。氧化应激在 AS 发生、发展过程中扮演了重要的角色,研究表明,氧化应激能激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而促进血管钙化,而阻断该通路可抑制氧化应激的产生^[19]。Wnt/ β -catenin 信号通路还参与调节血管平滑肌细胞的增殖和迁移,其下游的转录结合因子 β -catenin/TCF 能抑制血管平滑肌细胞的凋亡,促进细胞增殖,引起内膜增厚,在血管重塑方面发挥重要作用^[20]。上述研究表明, Wnt/ β -catenin 信号通路从多方面多角度深入参与了 AS 形成的病理生理过程。

在对衰老小鼠模型的研究中发现, Klotho 基因缺

失引起 Wnt 信号通路的激活并触发了细胞老化,说明 Klotho 基因对 Wnt 信号通路具有一定的调节作用^[13]。体外实验也证实,可溶性 Klotho 蛋白对心肌细胞和 RTC 细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路具有抑制作用^[21-22]。在阿霉素诱导肾损伤模型中,随着肾损伤时间的延长,肾组织可溶性 Klotho 蛋白表达逐渐减少,而 β -catenin 的表达却逐渐增多,且二者呈负相关;进一步分析发现,可溶性 Klotho 蛋白一方面能与免疫标记的 Wnt1、Wnt4 或 Wnt7a 等结合形成复合物;另一方面 Klotho 基因也直接抑制了 β -catenin 的核内移位^[23],说明 Klotho 基因可能通过干扰 Wnt 和 β -catenin 的作用使经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路失活。

笔者前期的研究表明,外源性可溶性 Klotho 蛋白可能通过调控 THP-1 巨噬细胞内 ACAT1 及 ABCA1 的表达,减少细胞内 CE 的蓄积,增加胆固醇的流出,从而抑制 THP-1 泡沫细胞形成^[10],但其中的信号通路并不清楚。本研究显示:可溶性 Klotho 蛋白能下调 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子 β -catenin、c-myc 与 cyclinD1 蛋白表达,而 Wnt/ β -catenin 信号特异性激动剂 β -甘油磷酸能阻断或部分阻断可溶性 Klotho 蛋白对 THP-1 泡沫细胞形成的抑制。而且,细胞免疫荧光染色观察到,可溶性 Klotho 蛋白能抑制 THP-1 泡沫细胞内 β -catenin 的分布和表达。说明可溶性 Klotho 蛋白能抑制泡沫细胞形成过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化。

综上所述,可溶性 Klotho 蛋白可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,减少细胞内 CE 的蓄积,从而抑制泡沫细胞的形成。

参考文献

- [1] KURO-O M, MATSUMURA Y, AIZAWA H, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging[J]. Nature, 1997, 390(6655):45-51.
- [2] VAN LOON E P, PULSKENS W P, VAN DER HAGEN E A, et al. Shedding of Klotho by ADAMs in the kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 309(4):359-368.
- [3] TORRES P U, PRIE D, MOLINE-BLETRY V, et al. Klotho: an anti-aging protein involved in mineral and vitamin D metabolism[J]. Kidney Int, 2007, 71(8):730-737.
- [4] HU M C, KURO-O M, MOE O W. Secreted klotho and chronic kidney disease[J]. Adv Exp

- Med Biol, 2012, 728: 126-157.
- [5] 魏建行, 梁荃, 黄仕琼, 等. Klotho RNA 干扰对人主动脉平滑肌细胞钙化和表型转化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(3): 593-597.
- [6] 毕先金, 杨江信, 熊家川, 等. Klotho 对慢性肾脏病相关的动脉粥样硬化斑块不稳定性的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(5): 460-465.
- [7] 刘玮, 张韶英, 徐慧敏, 等. 老年汉族人群 KL 基因 G-395A 多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病及胱抑素 C 水平的相关性分析[J]. 重庆医学, 2017, 46(23): 3206-3208.
- [8] 张军, 代文静, 周敬群, 等. 抗衰老 Klotho 蛋白对高糖作用下血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(1): 67-72.
- [9] 何燕, 杨文慧, 刘师节, 等. 血清可溶性 Klotho 与原发性和高血压动脉硬化关系的研究[J]. 临床心血管病杂志, 2020, 31(10): 946-950.
- [10] 刘玮, 李琳, 刘佳妮, 等. 可溶性 Klotho 蛋白抑制 THP-1 源性泡沫细胞形成[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(5): 816-821.
- [11] RAO T P, KUHL M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more [J]. Circ Res, 2010, 106(12): 1798-1806.
- [12] TSAOUSI A, MILL C, GEORGE S J. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development [J]. Curr Opin Lipidol, 2011, 22(5): 350-357.
- [13] LIU H, FERGUSSON M M, CASTILHO R M, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging [J]. Science, 2007, 317(5839): 803-806.
- [14] CHEN T L, MAO H J, CHEN C, et al. The role and mechanism of α -Klotho in the calcification of rat aortic vascular smooth muscle cells [J]. Bio Med Res Int, 2015, 2015: 194362.
- [15] LIN G R, BOMFELDT K E. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(2): 663-669.
- [16] BEDEL A, NEGRE-SALVAYRE A, HEENEMAN S, et al. E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low density lipoprotein [J]. Circ Res, 2008, 103(7): 694-701.
- [17] UELAND T, OTTERDAL K, LEKVA T, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(8): 1228-1234.
- [18] KIM K I, PARK K U, CHUN E J, et al. A novel biomarker of coronary atherosclerosis: atherosclerosis; serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques [J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(9): 1178-1184.
- [19] SHAO J S, AL Z A, LAI C F, et al. Vascular Bmp-Msx2-Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1117(1): 40-50.
- [20] MARINO K, CHRISTODOULIDES C, ANTONIADES C, et al. Wnt signaling in cardiovascular physiology [J]. Trends Endocrin Met, 2012, 23(12): 628-636.
- [21] SATOH M, NAGASU H, MORITA Y, et al. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303(12): 1641-1651.
- [22] YU L, MENG W, DING J, et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of the AT1 R/beta catenin pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(2): 455-461.
- [23] ZHOU L, LI Y, ZHOU D, et al. Loss of Klotho contributes to kidney injury by derepression of Wnt/ β -catenin signaling [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(5): 771-785.