

H₂S 显著减少巨噬细胞 COX-2 表达和泡沫化

梁小燕¹, 周红¹, 戚晓红^{1*}, 卞劲松^{2*}

(¹南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 210029; ²新加坡国立大学药理学系, 新加坡 117597)

[摘要] 目的:探讨 H₂S 对巨噬细胞 COX-2 表达及泡沫化的影响。方法:建立氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导 RAW264.7 细胞泡沫化模型,同时给予不同浓度的 H₂S。应用油红 O 染色观察泡沫细胞的形成;Real-time qPCR 检测 COX-2 mRNA 的表达;Western blot 检测 COX-2 蛋白的表达。结果:Ox-LDL 能够明显增加细胞内脂质的沉积,同时伴有 COX-2 的产生。不同浓度的 H₂S 可以明显减少由 Ox-LDL 引起的 COX-2 的表达,同时也减少了细胞内脂质的沉积,以 250 μmol/L 最为明显,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:H₂S 可以显著减少巨噬细胞 COX-2 的表达及泡沫化。

[关键词] RAW264.7;H₂S;COX-2;泡沫细胞

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-139-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140203

H₂S significantly reduced expression of COX-2 in macrophages and formation of macrophage-derived foam cells

Liang Xiaoyan¹, Zhou Hong¹, Qi Xiaohong^{1*}, Bian Jinsong^{2*}

(¹Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 210009, China; ²Department of Pharmacology, Singapore National University, Singapore 117597, Singapore)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of H₂S on expression of COX-2 on macrophages (RAW264.7) and formation of macrophage-derived foam cells. **Methods:** RAW264.7 foam cell model induced by low-density lipoprotein (Ox-LDL) is established, then added with different concentrations of H₂S. Detection of foam cell formation is conventionally practiced by Oil Red O staining. The expressions of COX-2 mRNA and protein are detected by real-time qPCR and Western blot respectively. **Results:** A significant increase of the production of COX-2 and the deposition of intracellular lipid was observed. Different concentrations of H₂S can considerably reduce the expression of COX-2 and the deposition of intracellular lipid induced by the Ox-LDL, especially the concentration of 250 μmol/L and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** H₂S can significantly reduce the expression of COX-2 in macrophages (RAW264.7) and inhibit the formation of foam cells.

[Key words] RAW264.7; H₂S; COX-2; foam cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 139-143]

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的疾病之一,而泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化发病的核心环节^[1]。泡沫细胞生成的多少对病变斑块的面积、血管的狭窄程度等具有直接的影响^[2]。氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)作为影响泡沫细胞形成的关键因素之一,能通过清道夫受体及其他

受体被巨噬细胞吞噬形成泡沫细胞。值得一提的是 Ox-LDL 在诱导巨噬细胞泡沫化过程中也会促进炎症因子的释放^[3]。许多研究证实,AS 就是一个慢性炎症过程。尤其炎症因子环氧化酶-2(COX-2)在 AS 的发生发展中起关键作用,多篇文献报道在动脉粥样硬化斑块中 COX-2 以及由 COX-2 调控的前列腺素 E₂(PGE₂)均显著增加^[4-6]。

H₂S 作为心血管功能调节的新型气体信号分子,具有广泛的生物学效应^[7]。本研究继以往观察到 H₂S 的显著抗炎作用^[8],进一步探讨 H₂S 对巨噬细胞 COX-2 表达及泡沫化的干预作用。

[基金项目] 国家自然科学基金(30873055);江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10131801070)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qxh@njmu.edu.cn; Jinsong_bian@nuhs.edu.sg

1 材料和方法

1.1 材料

油红 O 试剂和 NaHS (Sigma 公司, 美国); RAW264.7 细胞由南京医科大学基础医学院季勇教授惠赠。定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 生物工程公司, 日本); DMEM 培养基 (Hyclone 公司, 美国); Ox-LDL (广州奕源生物科技有限公司); 所有引物由中国上海生工合成; 倒置显微镜 (奥林巴斯公司, 日本); 荧光实时定量 PCR 仪、超微量核酸分析仪 (Eppendorf 公司, 德国); PCR 仪 (Applied Biosystems 公司, 美国); CO₂ 培养箱 (Thermo 公司, 美国); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与 RAW264.7 细胞泡沫化模型制备

RAW264.7 细胞培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液中。培养条件为 37°C, 95% 空气, 5% CO₂。

取对数期的细胞接种到 6 孔板中, 接种数为 1.2×10^5 个/孔, 以无血清 DMEM 培养 48 h。正常对照组: 无血清培养基培养 48 h。对照组: 取对数生长期细胞, 在无血清 DMEM 中加入终浓度为 60 mg/L Ox-LDL 培养 48 h; 不同浓度 H₂S 组: 无血清 DMEM 中加入终浓度为 60 mg/L Ox-LDL 培养 24 h 后分别加入外源性 H₂S 供体 NaHS, 使其终浓度为 200、250、300、350、400、450 μmol/L, 继续培养 24 h。

1.2.2 油红 O 染色

上述 6 孔板细胞, 用 10% 甲醛固定液固定 30 min 后用灭菌水清洗 2 次。0.5% 的油红异丙醇溶液用去离子水按 3:2 稀释后过滤加入已固定好的细胞中, 37°C 孵育 10 min。60% 异丙醇清洗 3~4 s, 荧光倒置显微镜下观察拍照, 并在 100 倍视野下, 随机取 5 个视野计数成脂细胞数量 (阳性细胞) 及细胞总数, 并计算阳性细胞率。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 COX-2 mRNA 的表达

TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 逆转录 RNA。其反应程序为: 37°C 共 15 min, 85°C 共 5 s, 最后通过实时荧光定量 PCR 法定量 COX-2 的表达。反应程序为: 95°C 预变性 30 s, 95°C 变性 5 s, 60°C 退火 34 s 进行 40 个循环。其中 COX-2 的上游引物为 5'-GCTCAGCCAGGCAGCAAAT-3', 下游引物为 5'-TTGGGGTGGGCTTCAGCAGT-3'; 内参 β-actin 的上游引物为 5'-ACCCGCGAGCACAGCTTCTTT-3', 下

游引物为 5'-CATTCCCACCATCACACCCTGG-3'。

1.2.4 Western blot 法检测 COX-2 蛋白的表达

收集各组细胞, 加入蛋白裂解液中, 测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品加等体积的上样缓冲液后进行 SDS-PAGE 分离。电泳结束后将蛋白转到 PVDF 膜上, 5% 的脱脂牛奶封闭膜 2 h。1:2 000 COX-2 蛋白的单克隆抗体 4°C 冰箱摇床过夜, PBST 洗膜 15 min × 3 次。1:5 000 羊抗兔二抗温育 2 h, PBST 洗膜 15 min × 3 次, 用电化学发光 (ECL) 显色系统进行显色。

1.3 统计学方法

数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析用 Prism 软件进行处理, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析以及 Newman-Keuls Multiple Comparison Test 进行检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂S 对 Ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞泡沫化的影响

应用油红 O 染色的方法检测给予 NaHS 对 Ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞泡沫化的影响。结果表明 Ox-LDL 可以刺激 RAW264.7 细胞泡沫化, 阳性细胞率达 $(84.46 \pm 0.97)\%$ 。给予 200、250、300、350、400、450 μmol/L NaHS 可以不同程度抑制 RAW264.7 细胞在 Ox-LDL 刺激下的泡沫化, 尤其在 250 μmol/L 时抑制作用最为明显, 阳性细胞率仅为 $(15.78 \pm 0.57)\%$ (表 1, 图 1)。

表 1 各组油红 O 染色阳性细胞率

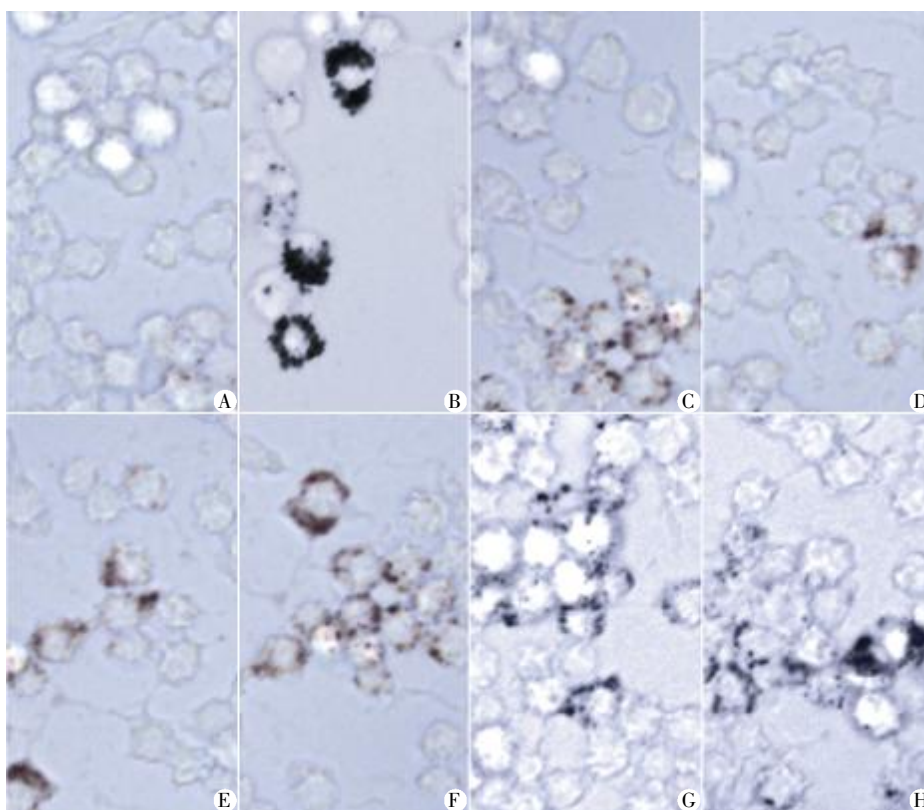
Table 1 The percentage of positive cells of Oil Red O staining in each group

组别	阳性细胞率 (% , ±s)
正常组	14.08 ± 0.69
对照组	84.46 ± 0.97***
NaHS 200 μmol/L 组	45.21 ± 0.45***
NaHS 250 μmol/L 组	15.78 ± 0.57**
NaHS 300 μmol/L 组	38.52 ± 0.66***
NaHS 350 μmol/L 组	48.42 ± 0.55***
NaHS 400 μmol/L 组	52.27 ± 1.15***
NaHS 450 μmol/L 组	65.07 ± 0.47***

与正常组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$; 与对照组相比, # $P < 0.001$ ($n = 5$)。

2.2 H₂S 对 Ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞的 COX-2 mRNA 表达的影响

应用荧光定量 PCR 在分子水平上检测给予 NaHS 对 Ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞 COX-2 mRNA 的影响。结果表明给予 200、250、300、350、400、450 μmol/L NaHS 可以不同程度地抑制 RAW264.7



A: 正常组; B: 对照组; C: NaHS 200 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: NaHS 250 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: NaHS 300 $\mu\text{mol/L}$ 组; F: NaHS 350 $\mu\text{mol/L}$ 组; G: NaHS 400 $\mu\text{mol/L}$ 组; H: NaHS 450 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图 1 H₂S 对 Ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞泡沫化的影响(油红 O 染色, $\times 400, n = 5$)

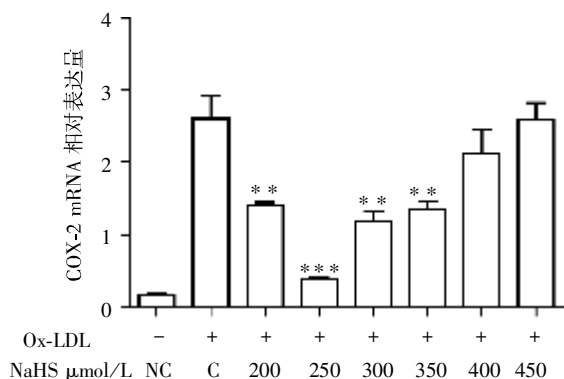
Figure 1 The impact of H₂S on Ox-LDL-induced RAW264.7 foam cell (油红 O 染色, $\times 400, n = 5$)

细胞在 Ox-LDL 刺激下的 COX-2 mRNA 的表达, 尤其在 250 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制作用最为明显(图 2)。

2.3 H₂S 对 Ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

结果表明: 给予 NaHS 200、250、300、350、400 和 450 $\mu\text{mol/L}$ NaHS 可以不同程度的抑制 RAW264.7 细胞在 Ox-LDL 刺激下的 COX-2 蛋白的

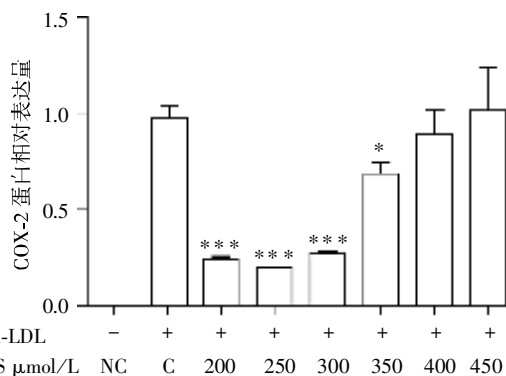
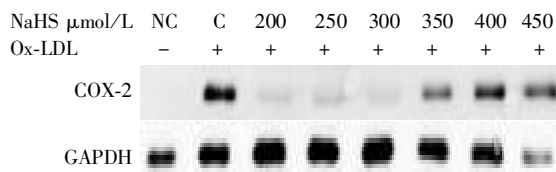
表达, 尤其 250 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制作用最为明显。该结果与 mRNA 的表达相一致(图 3)。



NC: 正常组; C: 对照组。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001 (n = 5)$ 。

图 2 不同浓度 H₂S 对 COX-2 mRNA 表达的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of H₂S on COX-2 mRNA expression



NC: 正常对照组 C: 对照组; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001 (n = 5)$ 。

图 3 不同浓度 H₂S 对 COX-2 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of H₂S on COX-2 protein expression

3 讨论

含大量脂质的泡沫细胞的形成是早期动脉粥样硬化病变的关键。泡沫细胞生成的多少对病变斑块的面积、血管的狭窄程度等具有直接的影响。作为诱导巨噬细胞泡沫化的关键因素之一的 Ox-LDL,它能上调多种黏附因子使单核细胞与内皮黏附,单核细胞进入内膜下分化成组织巨噬细胞。活化的巨噬细胞大量表达多种受体,介导氧化修饰脂蛋白入胞,由于无节制地摄取脂蛋白,导致大量脂质蓄积于细胞内。另一方面聚集的 Ox-LDL 造成巨噬细胞内胆固醇外流受阻,两方面因素造成胆固醇酯在细胞内蓄积促进了巨噬细胞转化为泡沫细胞^[9]。巨噬细胞在经 Ox-LDL 诱导泡沫化过程中可分泌大量的促炎细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF-A)、COX-2、TNF- α 、IL-6 等,加速脂质的沉积,增强炎症反应,促进粥样硬化进程^[10]。对于 Ox-LDL 在诱导巨噬细胞泡沫化过程中介导的炎症因子 COX-2,它是花生四烯酸(AA)合成前列腺素(PG)过程的限速酶,由于其 5'端有核因子(NF)- κ B 的结合位点,当细胞受到刺激(如本实验中的 Ox-LDL)后经过一系列的信号转导作用于 COX-2 5'端的调控序列,促进 COX-2 转录,进而诱导 COX-2 的表达。COX-2 在炎性细胞因子循环过程中起中枢作用,它可以使花生四烯酸转化为前列腺素类化合物(TxA₂、PGs 等)的母体—PGH₂,诱导炎性因子 PGE₂ 的表达^[11-16]。COX-2 及其生成的 PGE₂ 表达后能够增加血管通透性,增加单核细胞粘附,刺激巨噬细胞生成趋化因子,诱导炎性细胞因子产生。活化白细胞和血小板,刺激平滑肌细胞迁移和增生以及合成细胞外基质、活化基质金属蛋白酶,促进 AS 病变进展以及斑块的不稳定^[17]。

H₂S 是一种无色、臭鸡蛋气味的气体,是近几年继 NO、CO 之后发现的另一种气体信号分子。哺乳动物体内含硫氨基酸代谢过程中可以内源性生成微量的 H₂S。研究表明内源性 H₂S 具有抗氧化、抗凋亡、抗炎、抗纤维化、细胞保护、舒张血管、保护心肌、抗 AS 等作用^[18]。就其抗炎作用本实验使用 NaHS 外源性的给予 Ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞以 H₂S。结果显示, Ox-LDL 诱导了 RAW264.7 细胞泡沫化,且相应的炎症因子 COX-2 也表达增加。而给予具有抗炎活性的 H₂S 后细胞内脂质沉积和 COX-2 的表达均减少,以 250 μ mol/L H₂S 最明显。其可能的机制是 Ox-LDL 刺激巨噬细胞泡沫化过程中一定涉及

到经典的 NF- κ B 炎症通路,而 COX-2 的 5'端有 NF- κ B 的结合位点。当被释放的 NF- κ B 与 DNA 结合,诱导 COX-2 中 NF- κ B 结合元件的活化,从而活化 COX-2 的表达。在炎症的作用下,由胆固醇介导的 SCAP-SREBP-LDLr/HMGCoA 还原酶的严密反馈调节被破坏,导致细胞异常摄入与合成胆固醇从而形成泡沫细胞^[19]。H₂S 就其显著的抗炎作用可以通过抑制 NF- κ B 与 DNA 结合,来抑制 COX-2 的活化及后续由 COX-2 引发的前列腺素(如 PGE₂)的产生。这些炎症因子表达的减少,缓解了细胞异常摄入与过度合成胆固醇,从而缓解了巨噬细胞的泡沫化。故 H₂S 为治疗动脉粥样硬化提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 10(13): 706-721
- [2] 贾乙, 李晓辉. 炎症因素在泡沫细胞形成中的作用及三七皂苷对其影响[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(10): 972-974
- [3] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis [J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013(152780): 1-12
- [4] Ira Tabas. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(1): 36-46
- [5] Badimon L, Padró T, Vilahur G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease [J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2012, 1(1): 60-74
- [6] Menczer J. Cox-2 expression in ovarian malignancies: A review of the clinical aspects [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*, 2009, 146(2): 129-132
- [7] Masi A D, Ascenzi P. H₂S: A "Double face" molecule in health and disease [J]. *BioFactors*, 2013, 39(2): 186-196
- [8] Zano R, Brancaleone V, Distrutti E, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation [J]. *The FASEB Journal*, 2006, 20(12): 2118-2120
- [9] 周云, 沃新德, 卢德赵. RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定 [J]. *中国动脉粥样硬化杂志*, 2010, 18(9): 687-690
- [10] 孙福生, 鞠传霞, 刘赛. 扇贝裙边糖胺聚糖对 U937 泡沫细胞形成过程中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 表达的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 2008, 39(6): 563-565
- [11] Cianciulli A, Calvillo R, Cavallo P, et al. Modulation of NF- κ B activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE₂ production and COX-2 expression [J]. *Toxicology in Vitro*,

- 2012,26(7):1122-1128
- [12] Jiang JX, Dingleline R. Prostaglandin receptor EP₂ in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection[J]. Cell press, 2013, 34(7):413-423
- [13] Laube M, Kniess T, Pietzsch J. Radiolabeled COX-2 Inhibitors for Non-Invasive visualization of COX-2 expression and activity a critical update [J]. Molecules, 2013, 18(6):6311-6355
- [14] Nuvoli B, Galati R. Cyclooxygenase-2, epidermal growth factor receptor, and aromatase signaling in inflammation and mesothelioma [J]. Molecules Cancer Therapeutics, 2013, 12(6):844-852
- [15] Almudena Gómez-Hernández, Jose Luis Martín-Ventura, Eva Sánchez-Galán, et al. Overexpression of COX-2, prostaglandin E synthase-1 and prostaglandinE receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis; Regulation by nuclear factor-κB [J]. Atherosclerosis, 2006, 187(1):139-149
- [16] Orbe J, Beloqui O, Rodriguez JA, et al. Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors[J]. Clinica Chimica Acta, 2006, 368(1-2):138-143
- [17] Justice E, Carruthers DM. Cardiovascular risk and COX-2 inhibition in rheumatological practice[J]. Journal of Human Hypertension, 2005, 19(1):1-5
- [18] Kolluru GK, Shen XG, Kevil CG. A tale of two gases: NO and H₂S, foes or friends for life [J]. Redox Biology, 2013, 1(1):313-318
- [19] Ma KL, Liu J, Wang CX, et al. Activation of mTOR modulates SREBP-2 to induce foam cell formation through increased retinoblastoma protein phosphorylation[J]. Cardiovasc Reseach, 2013, 98(2):1-11

[收稿日期] 2013-08-29

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。