

ox-LDL 通过 NAD 依赖性脱乙酰酶 SIRT1 抑制 MHC II 反式激活蛋白的转录活性

方明明¹, 宋鸣子¹, 周红², 吴晓燕^{2*}

(¹江苏建康职业学院医学系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学基础医学国家级实验教学示范中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)对 NAD 依赖性脱乙酰酶(NAD-dependent deacetylase)SIRT1 表达的影响,及 SIRT1 调节人体适应性免疫应答过程中的机制。方法:体外培养人的原代外周血单核细胞,经集落刺激因子(GM-CSF)刺激分化 7 d 形成巨噬细胞,将分化良好的巨噬细胞分别用不同浓度 ox-LDL(0~120 $\mu\text{g/ml}$)培养 48 h。应用 Western blot 方法检测细胞内 SIRT1 的蛋白表达变化,Real-time PCR 检测 SIRT1、HLA-DR α 的 mRNA 水平。结果:SIRT1 蛋白表达随 ox-LDL 浓度的升高而降低;ox-LDL 处理后,SIRT1 的 mRNA 水平与对照组比较显著降低 ($P < 0.05$);SIRT1 激动剂白藜芦醇能够逆转 ox-LDL 诱导的 HLA-DR α 启动子的活性下调。结论:ox-LDL 通过调节巨噬细胞中 SIRT1 的蛋白表达和 mRNA 水平,使依赖 MHC II 反式激活蛋白(class II trans-activator, CIITA)的 HLA-DR α 启动子活性下降,提示脱乙酰酶 SIRT1 可能是临床上干预动脉粥样硬化的潜在靶位点。

[关键词] 氧化低密度脂蛋白;SIRT1;动脉粥样硬化;CIITA

[中图分类号] R543.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-405-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140401

Ox-LDL inhibits the transcriptional activity of trans-activating pratein MHC II by NAD dependent of the deacetylase SIRT1

Fang Mingming¹, Song Mingzi¹, Zhou Hong², Wu Xiaoyan^{2*}

(¹Department of Medical, Jiangsu Jiankang Vocational College, Nanjing 210029; ²National Model Center of Laboratory Teaching, Basic Medical Science, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL) on the expression and activity of NAD-dependent deacetylase SIRT1 and its regulatory mechanisms on human adaptive immune function. **Methods:** Human primary peripheral blood monocytes were induced by human macrophage colony stimulating factor GM-CSF for 7 days *in vitro*. Well differentiated macrophages were treated with different concentrations (0~120 $\mu\text{g/ml}$) of ox-LDL for 48 h. The protein expression of SIRT1 was detected by Western blot. Real-time PCR was performed to examine the SIRT1 and HLA-DR α mRNA. **Results:** The protein expression of SIRT1 was decreased by ox-LDL in a concentration-dependent manner. The mRNA of SIRT1 treated by ox-LDL was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). Resveratrol, which is the agonist of SIRT1, rescued the decreased expression of HLA-DR α induced by ox-LDL. **Conclusion:** The CIITA-dependent HLA-DR α promoter activity was decreased when treated with ox-LDL, which was induced by the change of mRNA and protein expression of SIRT1 in macrophage. Therefore, deacetylase SIRT1 may provide potential target for the treatment of atherosclerosis.

[Key words] ox-LDL; SIRT1; atherosclerosis; CIITA

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):405-409]

[基金项目] 国家自然科学基金青年资助(31200645);南京医科大学科技发展基金项目(2011NJMU268)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:wxynjmu@163.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一个多系统、多因子参与的复杂的慢性炎症过程,一个重要特征是单核/巨噬细胞(monocyte/macrophage)浸润,因受脂代谢障碍产生的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)作用而启动免疫反应,最终引发血管炎性损伤。这

是动脉粥样硬化众多发病机制中非常重要的一个方面^[1]。高脂血症的频发导致过多低密度脂蛋白(LDL)被氧化修饰形成 ox-LDL,是动脉粥样硬化性心脑血管疾病高发的重要原因。

人类的长寿基因 SIRT1 是一种 NAD⁺依赖的Ⅲ型蛋白质去乙酰化酶,在促进脂肪动员,减少脂肪积聚方面有积极的作用^[2]。最新的研究报道证实 SIRT1 可能通过减少巨噬细胞形成泡沫细胞进而发挥抗动脉粥样硬化的作用^[3],对于 ox-LDL 与 SIRT1 之间是否存在相互作用关系并影响脂质代谢,迄今尚未见报道。

免疫反应和代谢调控是互相联系、互相依赖的。有报道强调Ⅱ类主要组织相容性复合物(MHCⅡ)介导了动脉粥样斑块局部的细胞免疫反应^[4]。在分子水平上,机体主要通过控制 MHCⅡ反式激活蛋白(CIITA)的表达来调节 MHCⅡ基因的转录水平,进而调控 T 细胞在免疫应答中的强度^[5]。我们已有的实验证实过表达 SIRT1 通过对 CIITA 去乙酰化作用激活了 MHCⅡ 转录。上述三者之间存在怎样的作用关系,至今未见有文献报道。

本实验拟以人外周血巨噬细胞为模型,研究 ox-LDL 对内源性 SIRT1 表达的影响及 SIRT1 对 CIITA 转录活性的调控机制,以期揭开其中的相互作用关系,为动脉粥样硬化的防治寻找新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

单个核细胞分离液(国药集团,上海);RPMI-1640 培养液(Gibco 公司,美国);胎牛血清(四季青公司,杭州);抗 SIRT1 多克隆抗体、抗 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国);RNA 抽提试剂盒(Promega 公司,美国);逆转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本);化学发光检测试剂盒(Pierce 公司,美国);重组人干扰素 γ (rhIFN- γ ,Roche 公司,美国);白藜芦醇(resveratrol,Res)、烟酰胺(nicotinamide,NAM)、Sirtinol(Sigma 公司,美国);实时定量 PCR 仪(ABI 公司,美国);凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国);CO₂ 培养箱(Thermo 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

抽取健康人血制备外周血巨噬细胞,采用密度梯度离心法分离单核细胞,再用巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)刺激分化 7 d^[6]。以 3×10^5 个/ml 细胞量接种于 P35 培养皿中,用含 10% 胎牛血清的

RPMI-1640 培养液于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,至对数生长期用于实验。

1.2.2 氧化低密度脂蛋白的制备

LDL 的制备:采用改良的超高速密度梯度离心法制备^[7]。自南京市血液中心购得健康人血 200 ml,加入溴化钾,调整最终密度至 1.063 g/ml,分装后放入低温超速离心机中 50 000 r/min,离心 5 h,收集淡黄色中间层即为 LDL。用注射器小心吸取将其置于透析袋于缓冲液(0.02 mol/L Tds·HCl,85%NaCl,0.01%EDTA 及 0.01%NaN₃,pH7.6)中透析,4℃透析 48 h,隔 6 h 换透析液,除去溴化钾和 EDTA。测定蛋白含量,并将蛋白终浓度调为 500 μ g/ml。

LDL 的氧化修饰:采用铜诱导法,透析后的 LDL 加入终浓度为 10 μ mol/L 的 CuSO₄ 溶液,37℃ 孵育 24 h,以终浓度为 200 μ mol/L 的 EDTA 溶液中止氧化,4℃透析 36 h 除去 CuSO₄ 和 EDTA,过滤除菌,4℃保存备用。

1.2.3 Real-time PCR 检测 SIRT1、HLA-DR α 的 mRNA 水平

逆转录:用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,取 0.5 μ g 进行逆转录。采用 TaKaRa 逆转录试剂盒,反应体系如下:5 \times 缓冲液 4 μ l,逆转录酶 1 μ l,随机引物 1 μ l,补水至 20 μ l。反应条件:37℃ 30 min、85℃ 5 s、4℃ 保存,取出 PCR 管离心后,每管加 80 μ l 无核酸酶水,充分混匀、离心,备用。

搜索 GenBank 数据库人 SIRT1 基因 mRNA 序列,使用 Premier 3.0 软件辅助设计引物,所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成(表 1)。96 孔 PCR 反应板中加入 2 \times PCR probe Master Mix 10.00 μ l、正反向引物各 0.10 μ l、18S-rRNA-vic 0.30 μ l、Taqman probe 0.04 μ l、DEPC 水 4.46 μ l、cDNA 模板 5.00 μ l,置于 ABI7500 荧光定量 PCR 仪中进行扩增,反应条件如下:50℃ 2 min,95℃ 10 min 后,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。采用参照基因的 $\Delta\Delta C_T$ 法计算目的基因的相对表达量。采用相对定量法计算各基因 mRNA 表达水平(Q),用管家基因 18S-rRNA 来校正样品初始量。

1.2.4 Western blot 法检测 SIRT1 蛋白表达

细胞生长至 80% 融合时,常规收集细胞,加入细胞裂解液,漩涡振荡,冰上裂解 30 min,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,取上清液,蛋白浓度测定采用 Bradford 法。加入等体积 2 \times 上样缓冲液,95℃ 煮 5 min,短暂离心后-20℃ 保存。取 40 μ g 蛋白样品行 10% SDS-PAGE 电泳。用湿转法将胶上蛋白

表 1 Real-time PCR 引物
Table 1 Real-time PCR primers

基因	引物序列
SIRT1	Forward : 5'-CAGGTTGCGGGAATCCAA-3' Taqman probe : 6FAM- ATAATTCAGTGTTCATGCTTCC-TAMRA Reverse : 5'-CAGGCAAGATGCTGTTGCA-3'
HLA-DR α	Forward : 5'-GCCAACCTGGAAATCATGACA-3' Taqman probe : 6FAM- CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG-TAMRA Reverse : 5'-AGGGCTGTTCTGTGAGCACA-3'

转移至 NC 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 SIRT1 一抗,1:1 000 孵育 4℃过夜后,TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 20 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,1:3 000 室温孵育 40~60 min,按上述方法洗膜。用免疫印记化学发光试剂(ECL)显色,数字化多功能图像增强化学发光系统曝片,观察结果,使用图像编辑软件对 Western blot 检测结果进行分析。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS13.10 统计软件,经单因素方差分析和 q 检验进行分析。 $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 ox-LDL 对 SIRT1 蛋白表达的影响

LDL 发生氧化修饰形成 ox-LDL 是 LDL 致动脉粥样硬化的关键步骤^[8]。本实验在细胞培养皿中分别加入不同浓度(0、30、60、120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 ox-LDL 处理细胞 48 h。Western blot 检测显示随着 ox-LDL 浓度的升高,SIRT1 蛋白表达量下降,ox-LDL 浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时下降最明显,当浓度继续加大时,细胞死亡较多。表明 ox-LDL 抑制了 SIRT1 的蛋白表达,并呈现剂量效应(图 1)。

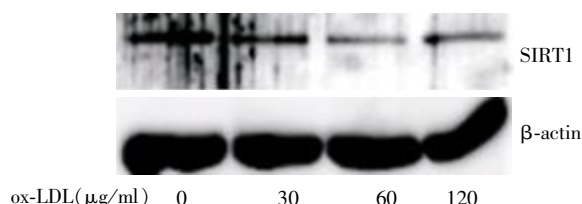


图 1 不同浓度的 ox-LDL 对 SIRT1 表达的影响
Figure 1 Effect of different concentrations of ox-LDL on SIRT1 expression

2.2 ox-LDL 对 SIRT1 mRNA 水平的影响

通过实时荧光定量 PCR 法检测 SIRT1 的 mRNA 水平。结果显示,用 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ox-LDL 处理 48 h 后,SIRT1 的 mRNA 水平下降了 80%,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

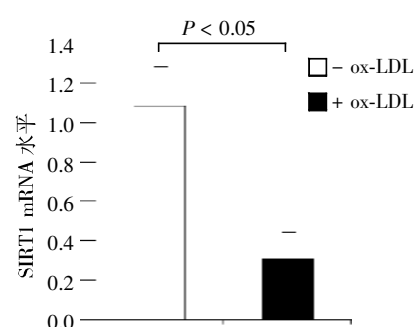


图 2 ox-LDL 对 SIRT1 mRNA 水平的影响
Figure 2 Effect of ox-LDL on SIRT1 mRNA

2.3 SIRT1 对 CIITA 介导的 MHC II mRNA 水平的影响

通过实时荧光定量 PCR 检测法 MHC II mRNA 水平。在 THP-1 细胞中,IFN- γ 能诱导平滑肌细胞表达 CIITA,调控 MHC II 和 I 型胶原的表达^[9]。因此,研究人巨噬细胞中 SIRT1 对 IFN- γ 所产生的反应的影响。为避免胎牛血清中脂质对实验结果的干扰,将巨噬细胞用无血清 RPMI-1640 饥饿培养 16 h 后,分为 5 组:①实验对照组;②重组人 IFN- γ (100 U/ml)组;③IFN- γ +白藜芦醇(resveratrol,50 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组;④IFN- γ +烟酰胺(nicotinamide,20 mmol/L)组;⑤IFN- γ +Sirtinol(60 $\mu\text{mol}/\text{L}$)组。24 h 后提取全细胞 RNA 进行逆转录,通过实时荧光定量 PCR 检测相对 MHC II 启动子 HLA-DR α 的 mRNA 水平。结果显示,对照组中未经任何药物刺激的巨噬细胞表达低水平的 HLA-DR α mRNA;重组人 IFN- γ 使 HLA-DR α 的 mRNA 水平激活 3 倍,在此水平上,SIRT1 抑制剂(烟酰胺和 Sirtinol)降低 MHC II 的 mRNA 水平达 50%左右,而激动剂白藜芦醇使 MHC II 的 mRNA 水平提高了 40%,每组都设 3 个复孔,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。由此可见,SIRT1 能够增强内源性 CIITA 的靶基因 mRNA 水平,可能是通过去乙酰化修饰 CIITA 从而调节其转录活性的。

2.4 ox-LDL 通过 SIRT1 对 CIITA 介导的 MHC II mRNA 水平的影响

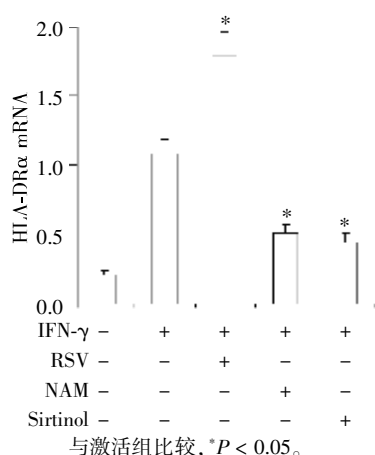


图3 IFN- γ 、RSV、NAM和Sirtinol预处理后 HLA-DR α 的 mRNA 水平

Figure 3 mRNA level of HLA-DR α pretreated by IFN- γ , RSV, NAM and Sirtinol

人原代巨噬细胞用无血清 RPMI-1640 饥饿培养 16 h 后,分为 4 组:①实验对照组;②重组人 IFN- γ (100 U/ml) 组;③ IFN- γ +ox-LDL (50 μ g/ml);④ IFN- γ +ox-LDL+白藜芦醇 (50 μ mol/L) 组。每组都设 3 个复孔,处理 24 h 后检测 HLA-DR α 的 mRNA 水平。结果显示,IFN- γ 通过 CIITA 激活 HLA-DR α 的 mRNA 水平达 2.5 倍;在此基础上,ox-LDL 明显降低了 IFN- γ 介导的 HLA-DR α mRNA 水平,而白藜芦醇处理后,ox-LDL 对 HLA-DR α mRNA 水平的抑制作用减弱,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。表明 ox-LDL 抑制 CIITA 的转录活性,而 SIRT1 激活剂能够逆转这种情况。

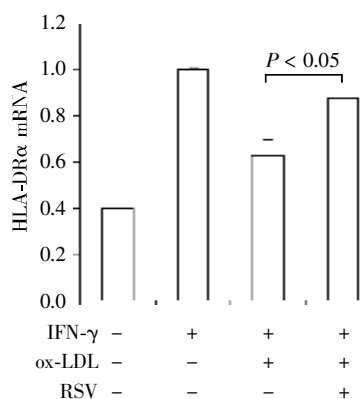


图4 IFN- γ 、ox-LDL 和 RSV 预处理后 HLA-DR α mRNA 水平

Figure 4 mRNA level of HLA-DR α pretreated by IFN- γ , ox-LDL and RSV

3 讨论

动脉粥样硬化的一个重要特征是免疫细胞 (monocyte/macrophage) 和血管平滑肌细胞 (VSMC)

的参与。在此过程中,VSMC 发生迁移、增殖、合成并释放以胶原蛋白为主要成分的细胞外基质 (EMC) 从而引发血管壁的重构,而免疫细胞释放细胞因子 (IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β 等) 从而引发一系列炎症反应。此外,由免疫细胞及 VSMC 内吞 ox-LDL 分化成的泡沫细胞 (foam cell) 对动脉粥样硬化的发生与发展同样至关重要^[10]。

ox-LDL 在 AS 斑块形成过程中具有重要的引发作用。脂质在巨噬细胞内聚集形成泡沫细胞的同时,可过度表达黏附分子以聚集单核细胞,并分泌大量的细胞因子影响局部的炎症反应,引起平滑肌细胞的迁移和增殖,说明 ox-LDL 在 AS 发生发展的多种生物学行为中均具有重要作用。

人类的长寿基因 SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的 III 型蛋白质去乙酰化酶,它在促进脂肪动员,减少脂肪的积聚方面有积极的作用。最新的研究报道显示,在部分敲除 SIRT1 基因的动物模型中,证实 SIRT1 可能通过降低巨噬细胞形成泡沫细胞进而发挥抗动脉粥样硬化作用^[3]。本实验研究表明,ox-LDL 无论是在蛋白水平还是 mRNA 水平均能够抑制人巨噬细胞 SIRT1 的表达,从此推论 ox-LDL 降低了 SIRT1 的抗动脉粥样硬化作用。我们通过实验发现随 ox-LDL 浓度的升高,SIRT1 蛋白表达量逐渐降低,ox-LDL 浓度为 60 μ g/ml 时蛋白下降最明显,当浓度继续加大时,由于 ox-LDL 具有细胞毒性,自身造成大量细胞死亡。用 75 μ g/ml 的 ox-LDL 处理 48 h 后,SIRT1 的 mRNA 水平下降了 80%。

免疫反应和代谢调控是互相联系、互相依赖的。巨噬细胞介导的慢性炎症反应也是 AS 发病过程中一个重要的环节^[1]。目前认为,动脉粥样斑块局部的免疫反应包括先天性免疫和获得性免疫,获得性免疫又包括细胞免疫和体液免疫。主要组织相容性复合物 MHC II 介导了动脉粥样硬化过程中的细胞免疫反应^[11]。MHC II 反式激活蛋白 CIITA 最初是在研究遗传缺陷疾病裸淋巴细胞综合征 (BLS) 时被分离,发现其通过影响 MHC II 的转录水平,从而调节机体的免疫功能。BLS 患者中,MHC II 分子的表达完全丧失,依赖 CD4⁺T 细胞的获得性免疫缺陷,病患的免疫机能严重受损并多在成年前死亡^[12]。CIITA cDNA 互补试验恢复了 MHC II 的表达,从而证实了 CIITA 是 MHC II 表达及获得性免疫的主要调节因子^[13]。

CIITA 的转录活性受到多种因素的影响,其中翻译后修饰 (包括甲基化、磷酸化、乙酰化等) 对 CIITA 转录活性的调控是近年来的一个研究热点^[14]。我们

以往的研究表明^[15],SIRT1和CIITA互相作用并特异性去乙酰化修饰CIITA,增强CIITA的转录活性,促进MHC II的表达。本实验表明使用SIRT1抑制剂(烟酰胺和Sirtinol)可下调IFN- γ 介导的HLA-DR α 启动子的活性达50%左右,而激活剂白藜芦醇能使之提高40%(图3)。本实验也证实ox-LDL明显降低了IFN- γ 介导的HLA-DR α 的mRNA水平,而SIRT1激活剂白藜芦醇处理后,ox-LDL对HLA-DR α mRNA水平的抑制作用减弱(图4)。以上结果表明,ox-LDL通过抑制SIRT1的表达进而抑制了SIRT1对CIITA的去乙酰化作用,使得MHC II基因的表达水平下降,免疫功能受损。

综合以上实验结果表明,ox-LDL一方面可以直接抑制去乙酰酶SIRT1达到脂质调控的目的,同时也可以通过SIRT1间接控制CIITA的翻译后修饰进而调节MHC II基因的表达水平,干扰了机体的免疫功能,通过调节慢性炎症反应来控制动脉粥样硬化形成发展的进程。研究氧化应激因素ox-LDL对外周血巨噬细胞SIRT1的表达以及SIRT1对CIITA转录活性的影响,可能为临床提供一个全新的药物治疗动脉粥样硬化及相关性疾病的靶点,为设计阻断动脉粥样硬化病理过程中的诊疗方案提供新的思路 and 理论依据。

[参考文献]

- [1] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 503-516
- [2] Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1363-1374
- [3] Stein S, Lohmann C, Schafer N, et al. SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherogenesis[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(1B): 2301-2309
- [4] Tsai YC, Hsieh HJ, Wang DL, et al. Laminar flow attenuates interferon-induced inflammatory responses in endothelial cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74(3): 497-505
- [5] Boss JM, Jensen PE. Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(1): 105-111
- [6] 孙梯业, 颜伟, 周宁新, 等. 人外周血来源树突状细胞诱导培养及鉴定的实验研究 [J]. *医学综述*, 2010, 16(19): 3018-3021
- [7] 王拥军, 温玫, 庞式琪. 氧化型低密度脂蛋白的制备 [J]. *首都医科大学学报*, 1996, 17(1): 32-35
- [8] 汪俊军. 血浆氧化LDL水平与动脉粥样硬化的关系 [J]. *临床检验杂志*, 2003, 21(1): 48-50
- [9] Buttice G, Miller J, Smith BD, et al. Interferon-gamma induces major histocompatibility class II transactivator (CIITA), which mediates collagen repression and major histocompatibility class II activation by human aortic smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2006, 98(4): 472-479
- [10] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809
- [11] Gurfinkel E, Bozovich G. Chlamydia pneumoniae: inflammation and instability of the atherosclerotic plaque [J]. *Atherosclerosis*, 1998, 140(1): 31-35
- [12] Touraine JL, Betuel H. The bare lymphocyte syndrome: immunodeficiency resulting from the lack of expression of HLA antigens [J]. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 1983, 19(3): 83-85
- [13] Steimle V, Otten LA, Mach B, et al. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)[J]. *Cell*, 1993, 75(1): 135-146
- [14] Wu XY, Kong XC, Xu Y, et al. Regulating the activity of class II transactivator by post-translational modifications: Exploring the possibilities [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(21): 5639-5644
- [15] Wu XY, Kong XC, Xu Y, et al. SIRT1 links CIITA deacetylation to MHC II activation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(22): 9549-9558

[收稿日期] 2013-12-03