

## 论著·基础研究

# oxLDL 通过 TLR4 诱导脂质累积和炎症反应促进动脉粥样硬化的分子机制

查 晴<sup>1</sup>, 曹丽娟<sup>1\*</sup>, 王燕萍<sup>2</sup>, 杨 克<sup>2</sup>, 刘 艳<sup>1</sup>

上海交通大学医学院 1. 附属第九人民医院心内科, 上海 200011; 2. 附属瑞金医院心内科, 上海 200025

**[摘要]** 目的· 探究 TLR4 诱导脂质累积和炎症反应从而调控动脉粥样硬化的分子机制。方法· 采用 TLR4 特异性 siRNA 敲除巨噬细胞, 通过油红 O 染色法比较对照组和实验组中细胞内脂质含量; 通过 Western blotting 检测 CD36 和血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 表达; 通过 ELISA 检测白介素-6 (IL-6)、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 等炎症因子的表达。结果· 动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞 (CD68<sup>+</sup>) 大量聚集, 且 TLR4 表达明显上调。oxLDL 刺激巨噬细胞, 可促进细胞中脂质累积 ( $P<0.01$ ) 并导致 oxLDL 相关受体 CD36 和 LOX-1 的表达上调以及炎症因子表达 ( $P<0.01$ )。特异性 siRNA 敲除 TLR4 可抑制 oxLDL 诱导的巨噬细胞内脂质累积 ( $P<0.01$ ) 和炎症因子分泌 ( $P<0.01$ ), 并影响 oxLDL 诱导的 CD36 表达, 但对 LOX-1 表达没有影响。结论· oxLDL/TLR4 可能通过上调 CD36 介导巨噬细胞中脂质累积和炎症反应, 从而促进动脉粥样硬化发生和发展。

**[关键词]** TLR4; 巨噬细胞; 脂质累积; 炎症反应; 动脉粥样硬化

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.05.008 **[中图分类号]** R543.5 **[文献标志码]** A

## Molecular mechanism of oxLDL inducing lipid accumulation and inflammation in macrophages to promote atherosclerosis via TLR4 signaling pathway

ZHA-Qing<sup>1</sup>, CAO Li-juan<sup>1\*</sup>, WANG Yan-ping<sup>2</sup>, YANG Ke<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>

1. Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Department of Cardiology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China.

**[Abstract]** Objective· To investigate the possible role of TLR4 signaling pathway in the mediation of atherosclerosis. Methods· TLR4 were knocked down via transfection with TLR4-specific siRNA, and the lipid accumulation was further detected in control and TLR4-knockdown groups by oil red O staining. The expression of CD36 and Lectin-like oxLDL receptor 1 (LOX-1) in macrophages were detected by Western blotting to investigate the role of TLR4 in the expression of oxLDL-related receptors. Cytokines such as interleukin-6 (IL-6), IL-8, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were tested by ELISA to confirm the possible role of TLR4 in the secretion of inflammatory factors. Results· Macrophages (namely CD68<sup>+</sup> cells) were found to accumulate within atherosclerosis plaques with TLR4 highly expressed on the surface of macrophages; the stimulation with oxLDL promoted the lipid accumulation ( $P<0.01$ ), the secretion of inflammatory factors ( $P<0.01$ ), and the expression of CD36 and LOX-1. The oxLDL-associated expression of CD36 was decreased but the expression of LOX-1 was not affected. The knockdown of TLR4 inhibits oxLDL-induced lipid accumulation ( $P<0.01$ ) and inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1 and MMP-9) secretion ( $P<0.01$ ). Conclusion· TLR4 signaling pathway possibly promotes the lipid accumulation and the secretion of inflammatory factors via up-regulating the expression of CD36 to affect the formation and development of atherosclerosis.

**[Key words]** TLR4; macrophage; lipid accumulation; inflammation; atherosclerosis

Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是一类介导天然免疫的跨膜信号受体<sup>[1-2]</sup>。近来研究<sup>[3-5]</sup>证明, TLR4 通过调控炎症反应, 参与动脉粥样硬化发生、发展及转归。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL) 作为 TLR4 配体之一, 促进 TLR4 致动脉粥样硬化的生物效应<sup>[6-7]</sup>。oxLDL 诱导巨噬细胞脂质累积并转化为泡沫细胞是粥样斑块进展的重要事件<sup>[8-10]</sup>。巨噬细胞通

过清道夫受体 (scavenger receptors, SR) 如脂肪酸转移酶 (CD36)、血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxLDL receptor 1, LOX-1) 等吞噬 oxLDL 导致脂质在内膜沉积<sup>[11]</sup>, 并诱导促炎症因子如白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-8 (interleukin-8, IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 分

[作者简介] 查 晴 (1985—), 女, 主管技师, 硕士生; 电子信箱: zhaqing10606@163.com。曹丽娟 (1988—), 女, 住院医师, 硕士生; 电子信箱: caolijuanqq@163.com。  
\* 并列第一作者。

[通信作者] 刘 艳, 电子信箱: liuyan\_ivy@126.com。



泌<sup>[12-16]</sup>,从而触发炎症级联反应<sup>[17-18]</sup>。Janeesh等<sup>[7]</sup>发现,oxLDL通过TLR4/NF-κB信号通路,诱导人单核-巨噬细胞的炎症反应,促进泡沫细胞产生。我们前期研究也证实,在人和小鼠动脉粥样硬化组织斑块中,TLR4表达水平明显上调;而且,oxLDL/TLR4可诱导平滑肌细胞中脂质累积和炎症因子分泌<sup>[19-23]</sup>。此外,TLR4基因敲除小鼠体内的动脉粥样硬化斑块可明显缩小,提示TLR4斑块与动脉粥样硬化病变的发生、发展密切相关。据此,可推测TLR4可能在巨噬细胞脂质累积和炎症反应过程中具有重要作用。本研究用oxLDL刺激巨噬细胞,体外模拟动脉粥样硬化发生和发展过程,分析TLR4在oxLDL刺激巨噬细胞脂质累积和炎症反应中的调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动脉粥样硬化病变的人股动脉通过临床手术收集,取自1例血管造影提示动脉粥样硬化斑块并行下肢截肢术的男性患者;人乳内动脉1例,均无病变,作为正常对照,取自血管搭桥术中正常乳内动脉;人急性白血病(human acute monocytic leukemia, THP-1)细胞购自ATCC公司(美国);oxLDL购自Serotec公司(英国);TLR4 siRNA购自SMART pool™(美国);油红O染料购自Sigma-Aldrich公司(美国);β-actin购自Cell Signaling公司(美国);抗CD36及抗LOX-1购自Abcam公司(美国);IL-6、IL-8、MCP-1和MMP-9等因子ELISA试剂盒购自Abcam公司(美国);免疫组织化学检测使用的抗体为CD68、TLR4(Abcam公司,美国)。

本研究方案经上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会通过,且所有患者均签署知情同意书,伦理批准书编号为(2008)临伦审第(15)号。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 免疫组织荧光染色** 组织样本用4%多聚甲醛固定过夜,冰冻切片包埋剂(OCT)复合物包埋,并进行连续冰冻切片。使用免疫荧光检测CD68(绿色)、TLR4(红色荧光)在正常乳内动脉和股动脉粥样硬化组织中的表达水平及定位,4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)用于细胞核染色(蓝色)。

**1.2.2 细胞培养与siRNA转染** 用PMA将THP-1细胞转化为贴壁生长的巨噬细胞,接种于含10%胎牛血清(FBS)的1640培养基培养。通过Opti-MEM培养静置

后,以脂质体试剂为载体,将阴性对照(NC组)及TLR4 siRNA(TLR4敲除组)转入巨噬细胞,再用oxLDL(50 μg/mL)刺激24 h;另设对照组。

**1.2.3 Western blotting检测** 取等量蛋白样品经缓冲液处理后加热使之变性,以10%聚丙烯酰胺凝胶电泳100 V稳压分离蛋白;电转移法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,室温封闭1 h,漂洗后加入相应一抗,4℃孵育过夜;Tris-HCl缓冲液(TBST)漂洗后,加入二抗,室温孵育1 h;TBST漂洗后,成像仪曝光记录蛋白条带情况。

**1.2.4 油红O染色与胞内胆固醇含量测定** 用oxLDL(50 μg/mL)处理THP-1巨噬细胞24 h后,用PBS(Gibco,美国)漂洗,然后4%多聚甲醛/PBS固定15 min。双蒸水漂洗后,60%异丙醇配制的0.3%油红O染色10 min后拍照,测定光密度D(500 nm)。胞内LDL含量通过比色法进行定量,并用与总蛋白浓度(n=3)的相对值表示。

**1.2.5 ELISA检测炎症因子表达** 收集细胞培养上清,按照试剂盒说明方法测定IL-6、IL-8、MCP-1和MMP-9的浓度。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本t检验,多组间均数比较采用单向方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动脉粥样硬化斑块组织中TLR4表达变化

免疫荧光染色结果显示:与正常动脉组织相比,动脉粥样硬化斑块组织中,巨噬细胞(CD68<sup>+</sup>)大量聚集,且TLR4表达明显上调(图1)。

### 2.2 oxLDL通过TLR4诱导巨噬细胞的脂质累积

采用实验室成功构建的TLR4特异性siRNA敲除巨噬细胞并用oxLDL刺激,结果显示oxLDL可明显诱导巨噬细胞内脂质累积,而与NC组相比,TLR4敲除组(TLR4 siRNA)细胞内脂质累积无显著改变(图2A)。

同时,与对照组相比,oxLDL刺激可使油红O染色D(500 nm)明显升高( $P=0.001$ );而TLR4敲除组处理后D(500 nm)较NC组显著降低( $P=0.008$ )(图2B)。同样方法处理巨噬细胞后,测定胞内胆固醇含量。结果

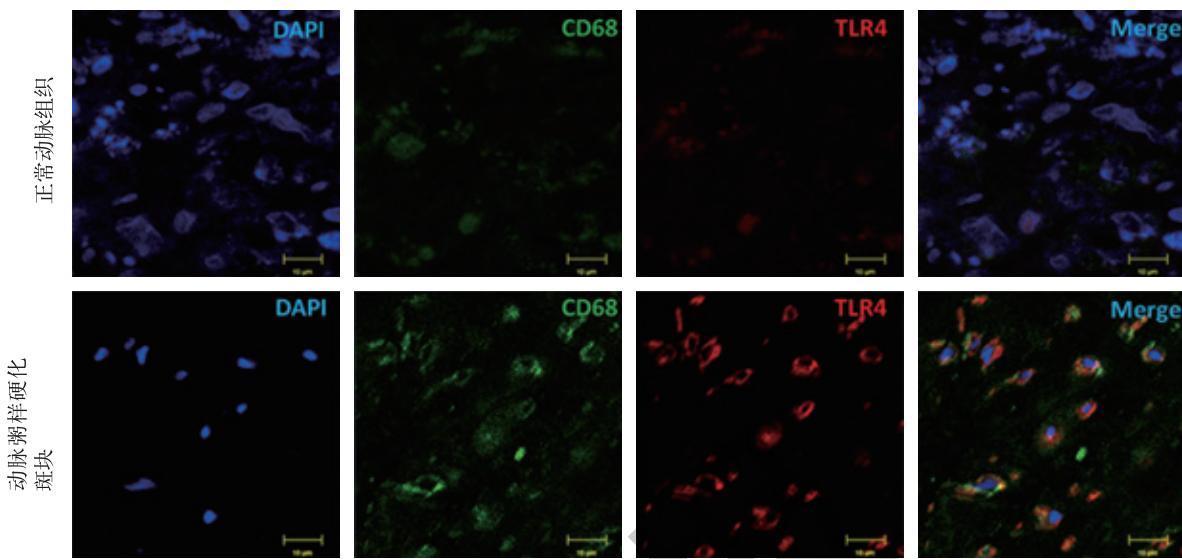
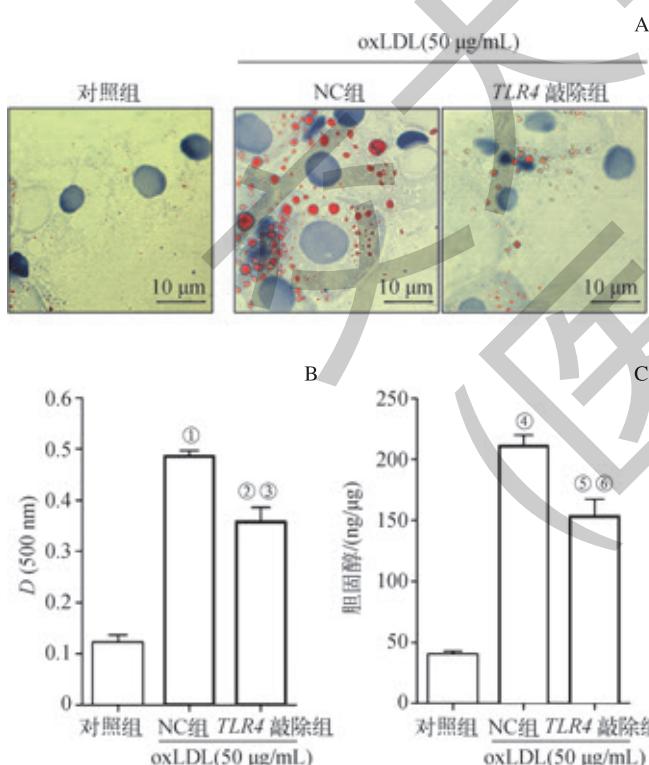


图 1 荧光显微镜下观察动脉粥样硬化组织斑块中 TLR4 表达  
Fig 1 Expression of TLR4 in atherosclerosis plaques by fluorescence microscope

显示: oxLDL 刺激可致巨噬细胞内胆固醇含量明显增加 ( $P=0.000$ ) ;而与 NC 组相比, oxLDL 刺激 TLR4 敲除组细胞后, 细胞内胆固醇水平显著降低 ( $P=0.007$ ) (图 2C)。



注: A. 油红 O 染色, 红色为脂质; B.  $D(500 \text{ nm})$  组间比较; C. 胞内胆固醇含量的组间比较。<sup>①</sup> $P=0.001$ , <sup>②</sup> $P=0.004$ , <sup>③</sup> $P=0.000$ , <sup>④</sup> $P=0.003$ , 与对照组比较;<sup>⑤</sup> $P=0.008$ , <sup>⑥</sup> $P=0.007$ , 与 NC 组比较。

图 2 oxLDL 通过 TLR4 诱导巨噬细胞的脂质累积  
Fig 2 Induction of oxLDL on lipid accumulation in macrophages via TLR4

### 2.3 TLR4 通过调控 CD36 表达介导巨噬细胞中脂质累积

采用 Western blotting 检测细胞内 CD36 和 LOX-1 的表达水平, 结果显示 oxLDL 可诱导巨噬细胞内 CD36 和 LOX-1 表达上调; 在 TLR4 敲除组中, oxLDL 仍诱导 LOX-1 表达上调, 而 CD36 表达上调受到抑制 (图 3)。

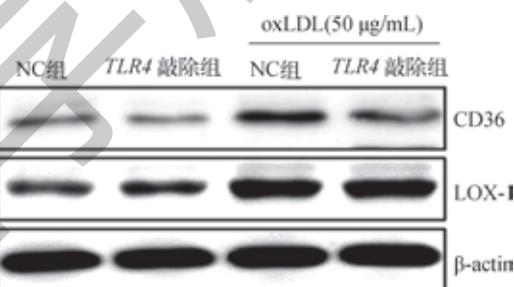
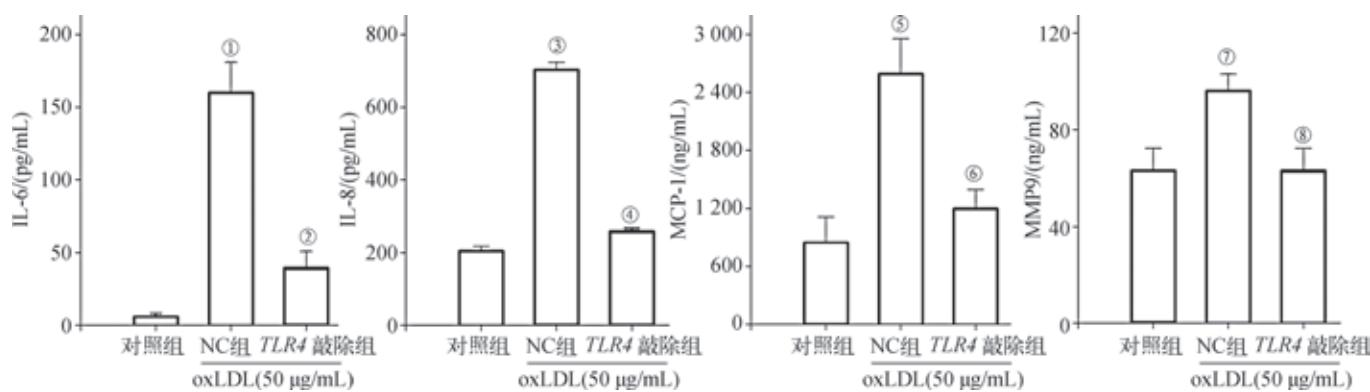


图 3 TLR4 通过调控 CD36 表达介导巨噬细胞中脂质累积  
Fig 3 Effects of TLR4 on lipid accumulation by regulating expression of CD36 in macrophages.

### 2.4 oxLDL 通过 TLR4 诱导巨噬细胞中炎症因子表达

oxLDL 刺激 NC 组和 TLR4 敲除组细胞后, 采用 ELISA 法测定 IL-6、IL-8、MCP-1、MMP-9 的表达水平。结果 (图 4) 显示: 与对照组相比, oxLDL 刺激可导致巨噬细胞炎症因子的表达明显增加 ( $P<0.01$ ); 而 TLR4 敲除组细胞处理后, 炎症因子表达上调程度较 NC 组显著降低 ( $P<0.01$ )。





注: <sup>①</sup>  $P=0.000$ , <sup>②</sup>  $P=0.001$ , <sup>③</sup>  $P=0.004$ , <sup>④</sup>  $P=0.008$ , 与对照组比较; <sup>⑤</sup>  $P=0.002$ , <sup>⑥</sup>  $P=0.002$ , <sup>⑦</sup>  $P=0.006$ , <sup>⑧</sup>  $P=0.008$ , 与 NC 组比较。

图 4 oxLDL 通过 TLR4 诱导巨噬细胞中炎症因子表达

Fig 4 Expression of oxLDL-induced inflammatory factors in macrophages by TLT4

### 3 讨论

TLRs 是一类天然免疫受体, 主要表达于果蝇胚胎背侧、腹侧<sup>[24]</sup>。在人体中, TLRs 主要分布于单核-巨噬细胞、NK 细胞和淋巴细胞, 可直接识别不同的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMP), 在固有免疫防御中有着重要的作用, 并最终激活适应性免疫。TLR4 在动脉粥样硬化斑块发生、发展中具有重要作用。

研究显示, 动脉粥样硬化斑块区域出现大量脂质累积, 而在这些区域中均可观察到大量巨噬细胞聚积<sup>[23]</sup>。而且, TLR4 触发平滑肌细胞对于炎症反应的应答, 但当 TLR4 敲除后, 斑块进展明显受到抑制<sup>[19]</sup>。但是, TLR4 细胞信号对于动脉粥样硬化发生、发展, 特别是对于巨噬细胞脂质累积及炎症反应的机制尚未完全明确。

单核细胞来源的巨噬细胞在动脉粥样硬化形成和进展过程中发挥重要作用, 尤其是在其吞噬 oxLDL 转化为泡沫细胞后, 而 oxLDL 形成是此病理过程的核心因素<sup>[20]</sup>。巨噬细胞通过其清道夫受体如 CD36、LOX-1 等结合、摄取 oxLDL 而导致脂质累积并最终形成泡沫细胞<sup>[11-12]</sup>; 反过来, oxLDL 累积促使泡沫细胞坏死崩解, 诱导炎症因

子大量释放, 产生糜烂样坏死物, 形成粥样斑块<sup>[14]</sup>。在本实验中, 采用荧光免疫染色法证明动脉粥样硬化组织有大量巨噬细胞 (即 CD68<sup>+</sup> 细胞) 的浸润; 进一步观察发现, oxLDL 可以诱导巨噬细胞内脂质累积和炎症因子的表达上调; 当用 TLR4 特异性 siRNA 降低 TLR4 表达后, oxLDL 诱导巨噬细胞脂质累积和炎症因子表达受到抑制。本研究结果证实, oxLDL/TLR4 诱导巨噬细胞脂质累积和炎症因子的表达, 从而调控动脉粥样硬化。

CD36 和 LOX-1 是参与巨噬细胞脂质吞噬过程的重要受体<sup>[12]</sup>。本研究发现, oxLDL 刺激巨噬细胞可诱导 CD36 和 LOX-1 的表达; 但当 TLR4 表达受到抑制后, CD36 表达下降, 而 LOX-1 表达未见差异。因此, 可推测 oxLDL/TLR4 可能通过调控 CD36 表达影响巨噬细胞脂质累积和炎症反应, 而 LOX-1 则是通过非 TLR4 依赖的途径参与脂质吞噬过程。

综上所述, oxLDL/TLR4 可能通过影响 CD36 表达, 调控巨噬细胞的脂质吞噬和炎症反应, 从而促进动脉粥样硬化的发生、发展。本研究探究 TLR4 在动脉粥样硬化发病中的分子机制, 为寻找动脉粥样硬化药物防治的新靶点提供了新方向。对于 TLR4 调控 CD36 表达和炎症反应的机制, 还有待于更深入的探讨。

### 参·考·文·献

- [1] Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(3): 395-407.
- [2] Modlin RL. Mammalian toll-like receptors[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2002, 88(6): 543-547; quiz 548-550, 583.
- [3] Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(1): 88-95.
- [4] den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization[J]. Atherosclerosis, 2010, 209(2): 314-320.
- [5] Chukkapalli SS, Velsko IM, Rivera-Kweh MF, et al. Global TLR2 and 4 deficiency in mice impacts bone resorption, inflammatory markers and atherosclerosis to polymicrobial infection[J]. Mol Oral Microbiol, 2017, 32(3): 211-225.
- [6] Feng Y, Cai ZR, Tang Y, et al. TLR4/NF-κB signaling pathway-mediated and oxLDL-induced up-regulation of LOX-1, MCP-1, and VCAM-1 expressions in human umbilical vein endothelial cells[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(1): 680-695.
- [7] Janeesh PA, Sasikala V, Dhanya CR, et al. Robinin modulates TLR/NF-

- kappaB signaling pathway in oxidized LDL induced human peripheral blood mononuclear cells[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 18(1): 191-197.
- [8] Chen C, Khismatullin DB. Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0123088.
- [9] Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis[J]. Vascul Pharmacol, 2016, 84: 1-7.
- [10] Singh V, Rana M, Jain M, et al. Curcuma oil attenuates accelerated atherosclerosis and macrophage foam-cell formation by modulating genes involved in plaque stability, lipid homeostasis and inflammation[J]. Br J Nutr, 2015, 113(1): 100-113.
- [11] Rios FJ, Koga MM, Pecenin M, et al. Oxidized LDL induces alternative macrophage phenotype through activation of CD36 and PAFR[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013(4): 198193.
- [12] Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(1): 17-28.
- [13] Toledo J, Esteve M, Grasa M, et al. Data related to inflammation and cholesterol deposition triggered by macrophages exposition to modified LDL[J]. Data Brief, 2016, 8: 251-257.
- [14] Sun N, Wang H, Wang L. Ghrelin inhibits oxLDL-induced inflammation in RAW264.7 mouse macrophages through down-regulation of LOX-1 expression via NF-kappaB signaling pathway[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016, 62(2): 57-61.
- [15] Sun S, Cheng B, Wu X, et al. Chlamydia pneumoniae disrupts lipid metabolism in human umbilical vein endothelial cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 1150-1156.
- [16] Endemann G, Stanton LW, Madden KS, et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein[J]. J Biol Chem, 1993, 268(16): 11811-11816.
- [17] Rao LN, Ponnusamy T, Philip S, et al. Hypercholesterolemia induced immune response and inflammation on progression of atherosclerosis in Apob(tm2Sgy) Ldlr(tm1Her)/J mice[J]. Lipids, 2015, 50(8): 785-797.
- [18] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, et al. Foam cells in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424: 245-252.
- [19] Yang K, Zhang XJ, Cao LJ, 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.
- [20] Hirose K, Iwabuchi K, Shimada K, et al. Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages[J]. Lipids Health Dis, 2011, 10(1): 1.
- [21] Dushkin MI. Macrophage/foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role[J]. Biochemistry (Mosc), 2012, 77(4): 327-338.
- [22] Fenyö IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis[J]. Immunobiology, 2013, 218(11): 1376-1384.
- [23] Yang K, Wang X, Liu Z, et al. Oxidized low-density lipoprotein promotes macrophage lipid accumulation via the toll-like receptor 4-Src pathway[J]. Circ J, 2015, 79(11): 2509-2516.
- [24] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, et al. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.

[收稿日期] 2016-10-07

[本文编辑] 吴 洋

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院附属第九人民医院参加第二十三届国际口腔颌面外科会议

2017年3月—4月，第二十三届国际口腔颌面外科会议在中国香港会展中心召开。来自世界77个国家和地区的共计1500余名代表参会。上海交通大学医学院附属第九人民医院共40余名医护代表参加会议。

口腔颌面科学科带头人沈国芳教授作题为“正颌外科的美学研究和数字化导航在外科在口腔颌面的应用”的大会报告，并主持“颌面导航手术”的专场会议。口腔颌面—头颈肿瘤科主任张陈平教授应邀主持“修复重建专场”，并作题为“颌骨重建的数字化技术”的大会报告，向国际同行展示了在颌骨数字化重建方面的创新性成果和丰富经验。口腔颌面—头颈肿瘤科副主任孙坚作题为“分层式切除与钛网重建——上颌骨巨大骨化纤维瘤的新术式”的大会报告；科副主任季彤作题为“化疗在头颈部肉瘤治疗中的作用”的大会报告；科副主任何锐作题为“从传统皮瓣到穿支皮瓣——上海经验”的大会报告。另有9场分会场发言和13张大会海报，分别从不同角度介绍了口腔颌面—头颈肿瘤科在转化研究、诊断、综合治疗和整体护理方面的最新成果；陈怡雯护师作题为“预防和治疗头颈肿瘤术后深静脉血栓的护理经验”的报告。

口腔颌面科常务副主任王旭东教授与科室于洪波副主任医师、袁灏主治医师、张文斌主治医师、王敏娇医师、袁卫军护士长、李丽主管护师等相继进行大会报告和海报展示。此外，王旭东和于洪波应邀担任正颌与美学分会场主席。口腔外科主任杨驰教授团队围绕关节—颌骨—咬合联合诊治等多个相关领域作特邀发言和大会报告。

