

Wnt5a/PKC δ 信号通路介导氧化低密度脂蛋白
诱导的巨噬细胞自噬*张婵娟^{1,2)**} 杜可^{1,2)**} 敖宝学¹⁾ 朱能³⁾ 颜涛^{1,4)}谢志忠⁵⁾ 廖端芳^{1,2)} 覃丽^{1,2)***}⁽¹⁾ 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; ⁽²⁾ 湖南中医药大学干细胞与中药调控实验室, 长沙 410208;⁽³⁾ 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; ⁽⁴⁾ 湘潭卫职职业技术学院, 湘潭 411101; ⁽⁵⁾ 南华大学药物药理研究所, 衡阳 421001)

摘要 研究发现动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 斑块中巨噬细胞摄取氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 和巨噬细胞极化等关键变化与失调性自噬关系密切. Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family member 5a) 在 AS 病变的富含巨噬细胞区域中高表达, 然而 Wnt5a 是否参与巨噬细胞自噬尚未明确. 本研究发现, 60 mg/L ox-LDL 处理 Raw264.7 细胞 6 h 时, 自噬标志物 LC3 II / I 显著增加, p62 显著减少, 且 Wnt5a、PKC δ 及 STAT3 的表达均增加. 小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 敲低 Wnt5a 后, 逆转 ox-LDL 诱导的 LC3 II / I 和 PKC δ 表达, 上调 p62 表达, 减少细胞内脂质蓄积. PKC δ 抑制剂 Rottlerin 干预后, LC3 II / I 和 STAT3 减少, p62 增加, 降低细胞内脂质含量. 综上, ox-LDL 可能通过 Wnt5a/PKC δ 信号通路诱导巨噬细胞自噬. 因此, 深入研究 Wnt5a/PKC δ 通路在巨噬细胞及 AS 发生发展中的作用, 是研究自噬机制新的着力点, 并为药物干预提供新的靶点.

关键词 Wnt5a/PKC δ 信号通路, 自噬, 氧化低密度脂蛋白, 动脉粥样硬化**中图分类号** R966**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0022

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种以动脉血管中过量脂质蓄积为主要特征性疾病, 已成为全球首位死亡原因之一^[1]. AS 不仅是一种代谢疾病, 也是一种炎症性疾病. 因此, 特征性动脉粥样硬化病变被认为是纤维炎症性脂质斑块^[2]. 晚期动脉粥样硬化病变表现为动脉内膜发生脂质沉积, 形成粥样斑块. 斑块中巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是 AS 发展的关键标志之一, 巨噬细胞作为动脉粥样硬化的主要成分, 通过吞噬氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 形成泡沫细胞, 对 AS 的发展至关重要^[3]. 研究发现 AS 斑块中巨噬细胞吞噬脂质和局部增殖及巨噬细胞极化等关键变化与失调性自噬关系密切^[4].

自噬是真核生物细胞普遍存在的一种保守的自我消化过程, 是损坏和衰老的细胞器、蛋白质等降解的途径. 当细胞受到刺激之后, 在胞质内形成半月形双层膜结构自噬体, 自噬体逐渐延伸包裹住自噬刺激物与细胞器, 并转运至溶酶体降解, 实现物

质代谢和细胞器更新, 有利于维持细胞内环境稳态^[5]. 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 是哺乳动物特征性自噬蛋白, 在自噬体的起始和形成中起重要作用. LC3 I 存在于细胞质中, 与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3 II, LC3 II 又可与自噬体膜结合并作为自噬体的标记物^[6]. 近年来研究表明, AS 斑块中存在巨噬细胞自噬, 且自噬的激活有助于减轻 AS 病变、增强斑块的稳定性, 然而过度自噬则导致细胞凋亡、斑块失稳^[7].

* 国家自然科学基金 (81774130, 81670268), 湖南省自然科学基金杰出青年基金 (2018JJ1018), 湖南省中医药管理局重点项目 (201614), 湖南省教育厅项目 (15A141) 和湖南中医药大学“十三五”一层次学科 (药学) 资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0731-88458238, E-mail: Lqin@hnucm.edu.cn

收稿日期: 2019-03-25, 接受日期: 2019-05-16

Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family member 5a) 是一种与炎症密切相关的蛋白质, 在炎症组织中广泛高表达^[8], 尤其是在AS晚期斑块中表达很高^[9]. Wnt5a可以激活蛋白激酶Cδ (protein kinase Cδ, PKCδ), 启动非mTOR (mammalian target of rapamycin) 依赖的自噬^[10]. 提示Wnt5a在AS斑块中可激活自噬. 本研究主要探讨ox-LDL对巨噬细胞自噬的诱导作用及其潜在机制.

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养基为Gibco产品; 胎牛血清购自四季青公司; RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂和BCA蛋白质定量试剂盒为康为世纪产品; 化学发光辣根过氧化物酶底物和PVDF膜为Millipore产品; LC3、p62、Wnt5a抗体均购自Abcam公司; 兔抗PKCδ抗体、鼠抗STAT3抗体、兔抗mTOR抗体均购自Cell Signaling Technology; 山羊抗兔IgG为Proteintech产品; 磷酸酶抑制剂购自Thermo Fisher Scientific. 饱和油红O染液购自北京索莱宝科技有

限公司; 总胆固醇酶法测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司.

1.2 细胞培养与处理

鼠源RAW264.7巨噬细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5% CO₂的培养箱中培养. 待培养瓶中细胞覆盖瓶底约80%时, 用0.25%胰酶将细胞消化, 接种于6孔板中, 细胞每24 h换液, 以6孔板每孔2 ml培养基计. 细胞处理前需换无血清DMEM培养基同步化12 h.

1.3 Ox-LDL的制备

采用梯度超速离心法分离血清中低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL), PBS透析48 h. 随后加入50 μl浓度为10 μmol/L的CuSO₄溶液氧化LDL, 37℃温育24 h. 在含200 μmol/L EDTA的PBS中透析24 h以去除Cu²⁺, 用PBS透析24 h除去EDTA, 0.22 μm微孔滤膜过滤除菌. 最后用BCA法测定LDL蛋白浓度, 调整蛋白质终浓度至1 g/L, 4℃储存.

1.4 细胞转染

从吉玛基因公司购得Wnt5a干扰链和对照干扰链 (表1).

Table 1 Interference chain sequences

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Wnt5a-mus-748	GGUUGUUAUAGAAGCUAAUTT	AUUAGCUUCUAUACAACCTT
Wnt5a-mus-1227	GGACGCUAGAGAAAGGGAATT	UUCCCUUUCUCUAGCGUCCTT
Wnt5a-mus-1659	GCGUGGCUAUGACCAGUUUTT	AAACUGGUCAUAGCCACGCTT

将细胞种到6孔板上, 待细胞融合至40%时, 各孔加入2 ml培养基. 首先在50 μl培养基中加入5 μl Wnt5a干扰试剂, 孵育5 min. 然后加入5 μl转染试剂Lipofectamine 2000, 孵育15 min. 将上述液体混匀后加入至培养板各孔. 转染效果采用蛋白质印迹 (Western blot) 鉴定.

1.5 蛋白质印迹

蛋白质印迹 (Western blot) 检测细胞中LC3 I、LC3 II、Wnt5a、PKCδ、mTOR、STAT3蛋白的表达. 细胞进行相应处理后, 收集细胞, PBS洗涤3次, 使用RIPA蛋白裂解液抽提总蛋白质, 采用BCA蛋白质定量法测定蛋白质浓度. 进行6%~15% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白质分离后恒定电流300 mA转膜至PVDF膜上; 室温下5%脱脂奶粉封闭膜2 h, 用相应的一抗4℃孵育膜过夜; 洗涤后换二抗室温孵育2 h. 洗涤后采用化学发光辣根过氧化物酶底物显影; 使用Image-Pro Plus软件

分析蛋白质条带积分吸光度 (integrated absorbance, *I*_A) 值, 以靶蛋白*I*_A值与β-actin *I*_A值的比值反映靶蛋白相对表达水平.

1.6 油红O染色

将细胞培养于放有无菌盖玻片的6孔培养板内, 细胞经处理后, PBS润洗, 4%多聚甲醛溶液固定, 油红O染色液染色20 min, 苏木素复染. Olympus显微镜观察, 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色. 每张爬片随机选取5个区域, 采用Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics) 图像分析软件分析实验结果.

1.7 胆固醇酶法

细胞进行相应处理后, 收集细胞, PBS洗涤3次, 裂解后离心, 进行胆固醇含量测定. 根据标准曲线 (采用已知浓度的胆固醇) 计算得出巨噬细胞内总胆固醇 (total cholesterol, TC) 的含量. 同时检测细胞蛋白质含量 (BCA法), 用以标准化各样

本的总胆固醇值.

1.8 统计学处理

数据用均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件处理, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 时为组间具有非常显著差异, 结果具有统计学意义.

2 结 果

2.1 Ox-LDL诱导Raw264.7细胞自噬的量效与时效关系

以浓度为 0、30、60、90 mg/L 的 ox-LDL 处理

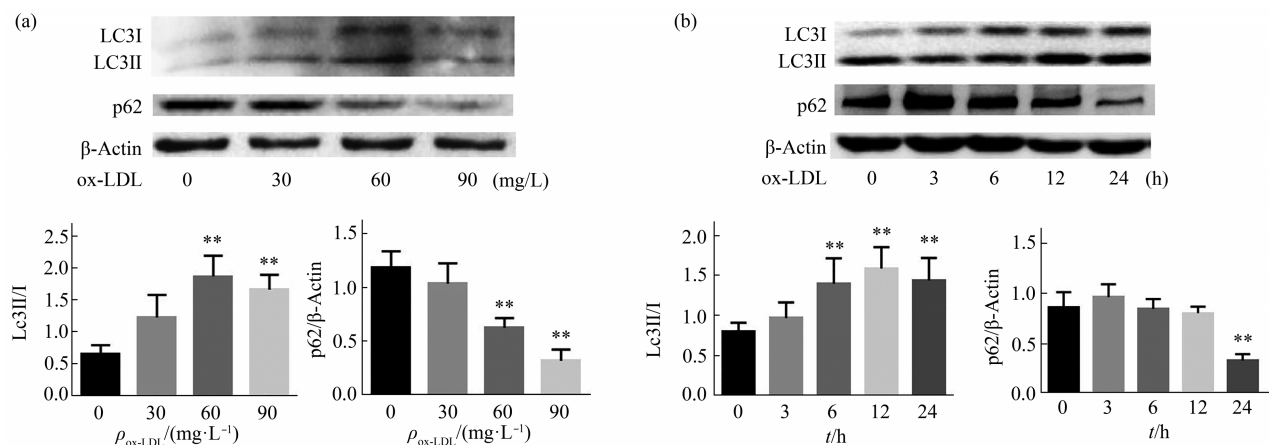


Fig. 1 The autophagy of Raw264.7 cells induced by ox-LDL in a concentration (a) and time (b) dependent manners

The expressions of LC3 I, LC3 II and p62 were measured by Western blot assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to control group.

2.2 Ox-LDL 诱导巨噬细胞中 Wnt5a、PKCδ、STAT3 蛋白质表达

分别采用 30、60、90 mg/L ox-LDL 处理 Raw264.7 细胞 6 h 后进行 Western blot 检测. 结果显示, 与对照组比较, 60 mg/L ox-LDL 诱导的 Raw264.7 细胞中 Wnt5a、PKCδ 和 STAT3 的表达显著上调 ($P < 0.05$) (图 2). 提示 60 mg/L ox-LDL 刺激 Raw264.7 细胞发生的自噬可能依赖 Wnt5a、PKCδ 和 STAT3.

2.3 敲低 Wnt5a 抑制 ox-LDL 诱导的 Raw264.7 细胞自噬

为了验证 Wnt5a 在 ox-LDL 诱导的 Raw264.7 细胞自噬中的作用, 我们首先筛选了有效的 Wnt5a 干扰链. 结果显示, Wnt5a-mus-748 干扰效果最佳 ($P < 0.05$) (图 3a), 因此选用此干扰链进行后续实验. Wnt5a 敲低后, LC3 II/I、PKCδ 和 STAT3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$), p62 表达显著增加

Raw264.7 细胞 6 h. 随着 ox-LDL 浓度增大, LC3 II/I 表达显著增多, 而当浓度达到 90 mg/L 时 LC3 II/I 表达降低 (图 1a). 因此选择 60 mg/L ox-LDL 作为后续处理浓度. 以 60 mg/L ox-LDL 处理细胞 0、3、6、12、24 h. 随着 ox-LDL 处理时间增长, LC3 II/I 增加, p62 表达减少 (图 1b), 表明 ox-LDL 可诱导细胞发生自噬反应.

($P < 0.01$) (图 3b). 油红 O 染色检测结果显示, ox-LDL 处理后, Raw264.7 细胞中脂滴明显增多 (图 3c). 随后, 在敲低 Wnt5a 的细胞中观察荷脂巨噬细胞的脂质蓄积情况. 结果显示, 与 si-NC 细胞相比, 敲低 Wnt5a 细胞内脂滴显著减少 (图 3c), 细胞内总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平明显下降 (图 3d). 因此, 敲低 Wnt5a 抑制自噬发生可能与 PKCδ、STAT3 相关.

2.4 PKCδ 介导 ox-LDL 诱导的 Raw264.7 细胞自噬

为进一步证实 PKCδ 是否参与 ox-LDL 诱导 Raw264.7 细胞自噬, 采用其抑制剂 Rottlerin 阻断 PKCδ 磷酸化. 结果显示, 与加入 ox-LDL 与 DMSO 组相比, Rottlerin 抑制 PKCδ 后, LC3 II/I 和 STAT3 的表达均显著降低, p62 的表达显著增加 (图 4a). 进一步采用油红 O 染色和胆固醇酶法检测脂质蓄积情况. 结果显示, 与 ox-LDL+DMSO 组相比, Rottlerin 处理后细胞内脂质蓄积显著降低

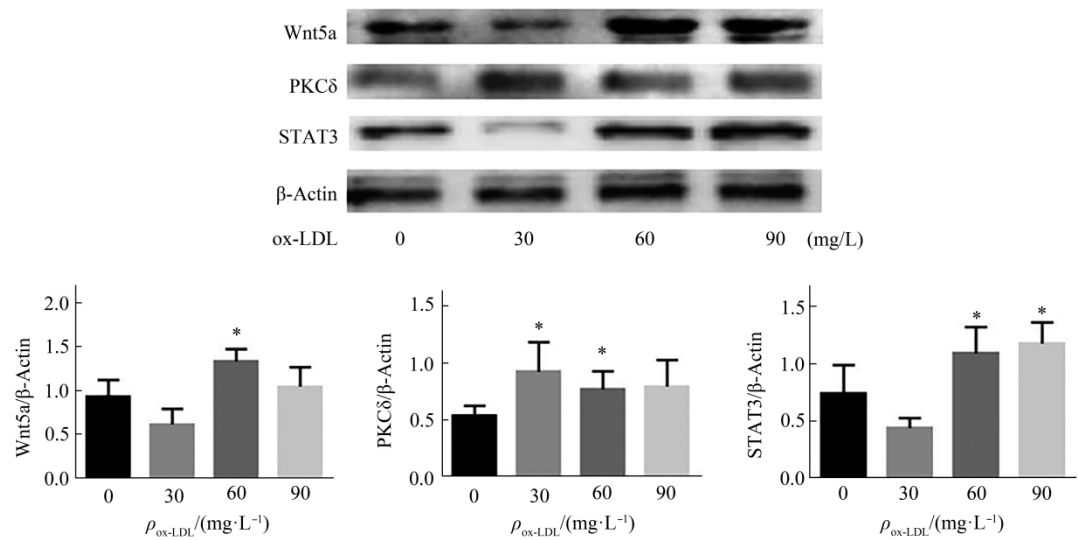


Fig. 2 The expressions of Wnt5a, PKCδ and STAT3 in Raw264.7 cells induced with ox-LDL
The expressions of Wnt5a, PKCδ and STAT3 were measured by Western blot assay. **P*<0.05 compared to control group.

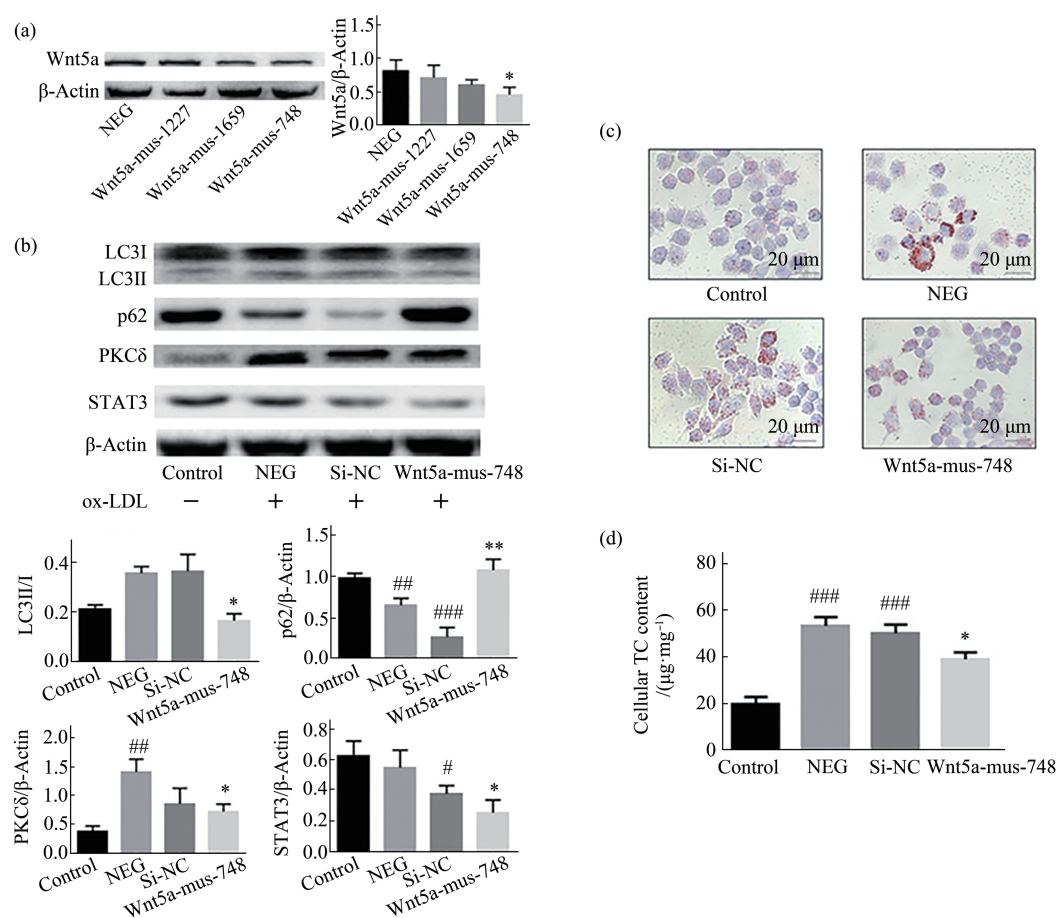


Fig. 3 Knockdown of Wnt5a suppresses autophagy induced by ox-LDL in Raw264.7 cells
(a) The protein expression of Wnt5a was measured by Western blot assay in knock-down of Wnt5a Raw264.7 cells; **P*<0.05 compared to negative group (NEG). (b) The protein expressions of LC3 II/I, p62, PKCδ and STAT3 were detected by Western blot assay. (c) The intracellular lipid droplet was detected by Oil red O staining (×40). (d) TC content in macrophages was detected by cholesterol enzyme link assay. Mean±SD, *n*=3, #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.01 compared to control group, **P*<0.05 compared to si-NC group.

(图4b), 且细胞内TC的含量显著减少(图4c). 提示PKC δ 可介导ox-LDL诱导的Raw264.7细胞自噬, 促进脂质降解.

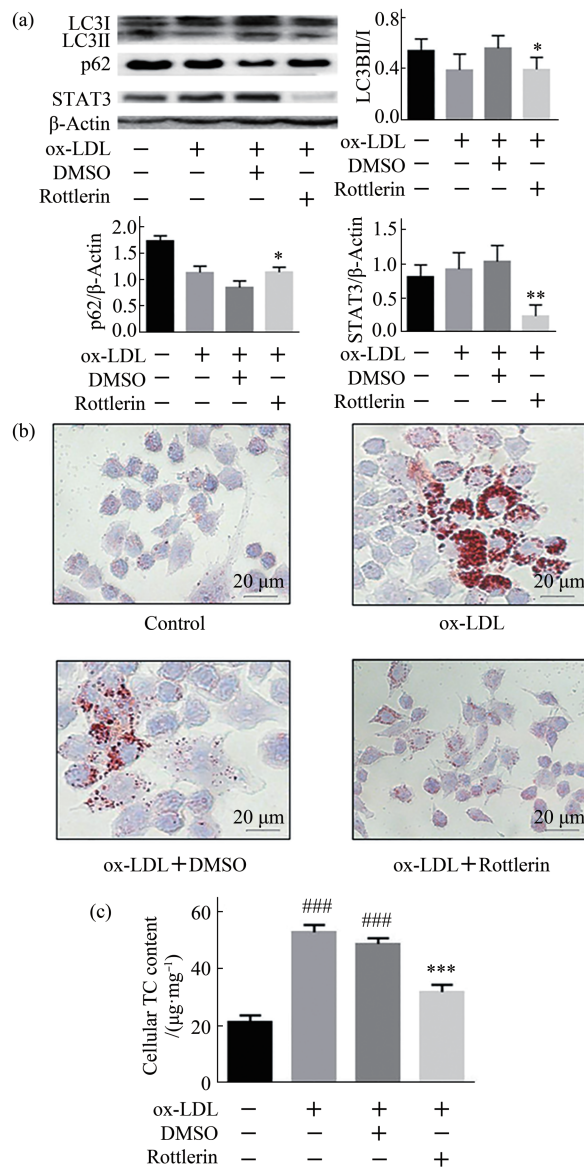


Fig. 4 Ox-LDL-induced autophagy is suppressed by PKC δ inhibitor (Rottlerin) in Raw264.7 cells

(a) The levels of LC3 II/I and STAT3 in Raw264.7 cells were examined by Western blot assay. (b) The intracellular lipid droplet was measured by Oil red O staining ($\times 40$). (c) Cellular TC content was detected by cholesterol enzyme link assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to control group, ### $P < 0.001$ compared to ox-LDL+DMSO group.

3 讨 论

晚期动脉粥样硬化病变的特点之一表现为纤维

帽薄、脂质核大、巨噬细胞积聚丰富, 因此被称为“易损斑块”^[11]. 当巨噬细胞荷脂超过其代谢能力时, 细胞内聚集大量脂质, 促进血管内膜生长与坏死核的形成, 增加斑块破裂的风险. 巨噬细胞凋亡及其缺陷功能促进斑块坏死, 导致斑块不稳定和血栓形成, 并最终引发心肌梗死和脑梗塞^[12]. 以往有研究表明巨噬细胞自噬通过促进胆固醇流出发挥斑块稳定性作用^[13]. 巨噬细胞自噬是由溶酶体系统降解胞内受损、变性及衰老的蛋白质与细胞器的过程, 基础水平的自噬可保护细胞免受环境刺激影响. 自噬在巨噬细胞胆固醇流出所发挥的积极作用, 这种特殊的选择性自噬称为脂噬(lipophagy)^[14]. 此外, 脂质负荷巨噬细胞中, 自噬标记物明显增加, 反之过度自噬则导致细胞死亡、斑块失稳^[15]. 因此巨噬细胞自噬作为一种代偿机制, 对于控制动脉粥样硬化进程具有重要意义.

LC3 前体合成以后, 立即被 Atg4 水解为活化的胞质可溶性的 LC3 I, 随后 Atg7 催化 E2 泛素结合酶 Atg3, 促进 LC3 I 与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3 II. 细胞内 LC3 的含量及 LC3 I 向 LC3 II 转化量被认为是自噬发生的指标^[16]. 低浓度 ox-LDL 诱导总 LC3B 增加而 LC3 II/I 几乎不变. 随着 ox-LDL 浓度增加, LC3 I 的生成增多, 同时 LC3 II 含量也增多. 由于此时溶酶体较多, 所以 LC3 I 向 LC3 II 的转变成为限速步骤, LC3 II/I 也保持恒定. 而当溶酶体缺乏时, LC3 II 开始累积, 此时 LC3 II/I 与总 LC3B 的含量都增加. 然而当 ox-LDL 浓度达到 90 mg/L 时则抑制自噬. 在自噬流出现抑制时, 总 LC3B 蛋白水平改变较为迅速, 而作为自噬底物, p62 的变化具有一定的滞后性, 积累所需时间则较长.

研究显示, AS 斑块处炎症反应与自噬成负相关, 自噬的发生有利于减轻炎症, 延缓 AS, 另一方面, 也有研究认为抑制自噬可以避免凋亡, 减轻炎症^[17]. 同时自噬本身对 AS 的效应也是双面的, 病变早期, 自噬作为潜在的补偿机制, 维持体内平衡, 病变后期, 自噬作为细胞持续应激或无法防御的致病过程的适应性反应, 失调或过度激活直接影响细胞的存活^[18]. 在自噬活动可以有效清除脂质时, 自噬对 AS 进程有益; 在自噬失调后, 无法形成有效的自噬流, 凋亡途径被激发, 进而导致细胞死亡. 自噬可降低巨噬细胞内胆固醇和胆固醇酯水平, 敲除自噬基因后胆固醇酯明显增多, 同时泡沫

细胞形成增加. 在AS斑块处, 炎症因子表达较高, 其中Wnt5a是一种与炎症因子和炎症信号通路密切相关的蛋白质, 且在斑块处表达较高. Wnt5a可专一性激活PKC δ , PKC δ 则是一种可以直接激活STAT3从而启动自噬的关键分子^[10, 19]. STAT3参与自噬过程的多个方面, 其不同亚细胞定位模式激活自噬途径不同^[20]. STAT3直接与beclin-1启动子区域结合, 最终抑制其基因及蛋白质表达^[21]. STAT3可上调缺氧环境下缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达, 激活beclin-1, 从而诱导自噬^[22]. 我们的结果表明, 60 mg/L ox-LDL诱导的Raw264.7细胞中Wnt5a、PKC δ 和STAT3表达增加, 敲低Wnt5a则使ox-LDL诱导的Raw264.7细胞的自噬减少, 也降低了PKC δ 表达, 而PKC δ 可能激活自噬. 进一步使用Rottlerin专一性抑制PKC δ 后, LC3 II/I显著降低, STAT3的表达也降低, 表明抑制了Raw264.7细胞自噬.

综上, ox-LDL可通过诱导Wnt5a/PKC δ 信号通路激活自噬. 随着ox-LDL的浓度逐渐升高, 自噬被过度激活, 导致斑块稳定性降低. 因此, 深入研究Wnt5a/PKC δ 信号通路在巨噬细胞自噬及AS发生发展中的作用机制, 可为自噬机制研究提供新的着力点, 并为药物干预提供新的靶点.

参 考 文 献

- [1] Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2017, **135**(10): e146-e603
- [2] Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein & Cell*, 2012, **3**(3): 173-181
- [3] Moore K J, Sheedy F J, Fisher E A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, 2013, **13**(10): 709-721
- [4] Martinet W, De Meyer G R. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circulation Research*, 2009, **104**(3): 304-317
- [5] Feng Y, He D, Yao Z, *et al.* The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, 2014, **24**(1): 24-41
- [6] Schaaf M B, Keulers T G, Vooijs M A, *et al.* LC3/GABARAP family proteins: autophagy - (un)related functions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2016, **30**(12): 3961-3978
- [7] Vernon P J, Tang D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, **18**(6): 677-691
- [8] Bhatt P M, Malgor R. Wnt5a: a player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis*, 2014, **237**(1): 155-162
- [9] Bhatt P M, Lewis C J, House D L, *et al.* Increased Wnt5a mRNA expression in advanced atherosclerotic lesions, and oxidized LDL treated human monocyte-derived macrophages. *The Open Circulation & Vascular Journal*, 2012, **5**: 1-7
- [10] Koyanagi M, Iwasaki M, Haendeler J, *et al.* Wnt5a increases cardiac gene expressions of cultured human circulating progenitor cells *via* a PKC delta activation. *PloS One*, 2009, **4**(6): e5765
- [11] Rohwedder I, Montanez E, Beckmann K, *et al.* Plasma fibronectin deficiency impedes atherosclerosis progression and fibrous cap formation. *EMBO Molecular Medicine*, 2012, **4**(7): 564-576
- [12] Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*, 2014, **276**(6): 618-632
- [13] Ouimet M, Franklin V, Mak E, *et al.* Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells *via* lysosomal acid lipase. *Cell Metabolism*, 2011, **13**(6): 655-667
- [14] Narabayashi K, Ito Y, Eid N, *et al.* Indomethacin suppresses LAMP-2 expression and induces lipophagy and lipoptosis in rat enterocytes *via* the ER stress pathway. *Journal of Gastroenterology*, 2015, **50**(5): 541-554
- [15] 辛颖, 仲爱芹, 徐士欣, 张军平. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化病理机制中的研究进展. *临床心血管病杂志*, 2015, **31**(07): 700-703
- Xin Y, Zhong A Q, Xu S X, Zhang J P. *Journal of Clinical Cardiology*, 2015, **31**(07): 700-703
- [16] Ichimura Y, Imamura Y, Emoto K, *et al.* *In vivo* and *in vitro* reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J Biol Chem*, 2004, **279**(39): 40584-40592
- [17] Zhou Y, Cao Z Q, Wang H Y, *et al.* The anti-inflammatory effects of Morin hydrate in atherosclerosis is associated with autophagy induction through cAMP signaling. *Mol Nutr Food Res*, 2017, **61**(9): 1600966
- [18] Martinet W, De Meyer I, Verheye S, *et al.* Drug-induced macrophage autophagy in atherosclerosis: for better or worse?. *Basic Research in Cardiology*, 2013, **108**(1): 321
- [19] Kumar R, Sahu S K, Kumar M, *et al.* MicroRNA 17-5p regulates autophagy in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages by targeting Mcl-1 and STAT3. *Cell Microbiol*, 2016, **18**(5): 679-691
- [20] Li H, You L, Xie J, *et al.* The roles of subcellularly located EGFR in autophagy. *Cellular Signalling*, 2017, **35**: 223-230.
- [21] You L, Wang Z, Li H, *et al.* The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*, 2015, **11**(5): 729-739
- [22] Zhang J, Chu D, Kawamura T, *et al.* GRIM-19 repressed hypoxia-induced invasion and EMT of colorectal cancer by repressing autophagy through inactivation of STAT3/HIF-1 α signaling axis. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, **234**(8): 12800-12808

Autophagy of Macrophages Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein via Wnt5a/PKC δ Signaling Pathway*

ZHANG Chan-Juan^{1,2)**}, DU Ke^{1,2)**}, AO Bao-Xue¹⁾, ZHU Neng³⁾, YAN Tao^{1,4)}, XIE Zhi-Zhong⁵⁾,
LIAO Duan-Fang^{1,2)}, QIN Li^{1,2)***}

¹⁾School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

²⁾Division of Stem Cell Regulation and Application, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

³⁾The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

⁴⁾Xiangtan Medical and Health Vocational and Technical College, Xiangtan 411101, China;

⁵⁾Institute of Pharmaceutical Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract Evidence indicated that key changes in macrophage uptake of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and macrophage polarization in atherosclerotic plaques are closely related to dysfunctional autophagy. Wnt5a (wingless-type MMTV integration site family member 5a) is highly expressed in the macrophage-rich region of atherosclerosis (AS) lesions. However, whether Wnt5a is involved in macrophages autophagy is not clear. In this study, we established macrophages-derived foam cell induced by ox-LDL to explore the effects of Wnt5a/PKC δ pathway on autophagy. RAW 264.7 macrophages were incubated with 60 mg/L ox-LDL for 6h. The expression of autophagy marker, LC3 II / I was significantly increased and p62 was decreased obviously. Moreover, the expressions of Wnt5a, PKC δ and STAT3 were also elevated. Knockdown of Wnt5a reduced the expressions of LC3 II / I and PKC δ , induced the expression of p62, inhibited cellular lipid accumulation. Furthermore, PKC δ inhibitor (Rottlerin) was downregulated the levels of LC3 II / I and STAT3, upregulated p62 level, inhibited cellular lipid accumulation. Therefore, ox-LDL induces autophagy in macrophages may be associated with Wnt5a/PKC δ signaling pathway. The present study indicates that Wnt5a/PKC δ signaling pathway may be underlying target for autophagy and drug intervention.

Key words Wnt5a/PKC δ signaling pathway, autophagy, oxidized low-density lipoprotein, atherosclerosis

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0022

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81774130, 81670268), the Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Hunan Province (2018JJ1018), Key Projects of Hunan Traditional Chinese Medicine Administration (201614), Key Projects of Hunan Provincial Education Department (15A141) and "13th Five-Year" First-level Discipline (Pharmacy) Funded Project of Hunan University of Chinese Medicine.

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-731-88458238, E-mail: Lqin@hnucm.edu.cn

Received: March 25, 2019 Accepted: May 16, 2019