

LDL、oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9、LDLR 表达的影响研究 *

刘录山 ** 程艳丽 谢 闵 杨 琼 潘利红 姜志胜 唐朝克 危当恒 唐志晗

(南华大学心血管病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 衡阳 421001)

摘要 为研究低密度脂蛋白(LDL)、氧化修饰的低密度脂蛋白(oxLDL)对 THP-1 源性巨噬细胞中 PCSK9、LDLR 表达的影响及两者之间的关系. 分别用 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L 的 LDL 和 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L 的 oxLDL 处理 THP-1 巨噬细胞, 油红 O 染色检测细胞荷脂情况, 免疫荧光检测 THP-1 巨噬细胞上 PCSK9 蛋白表达及分布情况, RT-PCR、Western blot 检测 THP-1 巨噬细胞上 PCSK9、LDLR mRNA、蛋白质的表达. 结果发现, 不同浓度 LDL 处理 THP-1 巨噬细胞后, 随着 LDL 浓度的增大, 细胞内脂滴数目略有增多. 免疫荧光染色发现, PCSK9 在 THP-1 巨噬细胞上的表达随 LDL 浓度的增加而增多, 胞浆内定位于某一特定细胞器中; RT-PCR、Western blot 检测发现, LDL 可以呈浓度依赖性下调 THP-1 巨噬细胞中 LDLR 的表达和上调 PCSK9 的表达. 不同浓度 oxLDL 处理 THP-1 巨噬细胞后, 随 oxLDL 浓度的增大, 脂滴颗粒明显增加; oxLDL 处理对 THP-1 巨噬细胞上 PCSK9、LDLR mRNA、蛋白质的表达影响均不明显. 研究结果表明: THP-1 巨噬细胞上, 同时有 PCSK9 和 LDLR 的表达, 且 PCSK9 定位于胞浆中某一特定细胞器; oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞 LDLR 和 PCSK9 表达没有影响; LDL 能够降低 THP-1 巨噬细胞表面 LDLR 的表达, 同时上调 PCSK9 表达, 初步说明在 THP-1 巨噬细胞中, 两者有一定的相关性.

关键词 低密度脂蛋白(LDL), 氧化修饰的低密度脂蛋白(oxLDL), PCSK9/NARC-1, 低密度脂蛋白受体(LDLR), 动脉粥样硬化, THP-1 巨噬细胞

学科分类号 R363

前蛋白转化酶(proprotein convertase, PC)家族在多种前蛋白的生成过程中起重要作用. PCSK9 基因(proprotein convertase subtilisin/kexin 9- 丝氨酸蛋白酶)编码神经凋亡调节转化酶(neural apoptosis-regulated convertase 1, NARC-1), 是 PC 家族的成员之一, 它能够在蛋白质水平降低肝细胞上低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)的数量, 影响低密度脂蛋白(LDL)的内化, 使血液中 LDL 不能被清除, 从而导致高胆固醇血症. 该基因的突变成为继 LDLR、apoB100 基因之后的第三种引起常染色体显性高胆固醇血症的基因^[1]. 高 LDL 胆固醇血症是一个已被确认的动脉粥样硬化独立危险因素^[2]. 但是经 LDLR 进入细胞的 LDL 水解后产生的游离胆固醇可引起负反馈调节, 所以 LDL 本身并不会导致细胞内的胆固醇蓄积, 当血液中 LDL 胆固醇浓度过高时, 过量的 LDL 会滞留

于内皮下, 经过细胞氧化修饰形成 oxLDL. 动脉粥样硬化发生主要是血管壁巨噬细胞和 / 或平滑肌细胞大量摄取进入血管壁的脂质, 尤其发生氧化修饰的脂质, 从而导致泡沫细胞和脂质池的形成. PCSK9 是否直接影响巨噬细胞和平滑肌细胞脂质代谢? 脂质对这二种参与血管壁脂质代谢的细胞 PCSK9 表达的影响如何? 本研究以 THP-1 巨噬细胞为研究对象, 经过 LDL、oxLDL 处理后, 观察细胞水平 PCSK9、LDLR 的变化及其规律, 为 PCSK9 在动脉粥样硬化发生发展中的作用提供实验依据.

* 国家自然科学基金资助项目(30700325)和湖南省教育厅资助项目(07C618).

** 通讯联系人.

Tel: 0734-8281279, E-mail: liuls2000@126.com

收稿日期: 2007-09-06, 接受日期: 2007-10-07

1 材料与方法

1.1 细胞培养

THP-1 细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞中心, 在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯(PMA)孵 THP-1 细胞 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。

1.2 脂蛋白的分离、氧化修饰及鉴定

健康人血浆购自衡阳市中心血站。先用超速离心法制备低密度脂蛋白, 取部分用 10 μ mol/L CuSO₄ 氧化修饰成氧化低密度脂蛋白, 4℃ 保存。0.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定氧化与否。

1.3 实验分组

实验一: LDL 处理组。a. 空白对照组: 无血清培养基培养; b. 低浓度组: 用 10 mg/L LDL 处理 24 h; c. 中浓度组: 用 20 mg/L LDL 处理 24 h; d. 高浓度组: 用 30 mg/L LDL 处理 24 h。

实验二: oxLDL 处理组。a. 空白对照组: 无血清培养基培养; b. 低浓度组: 用 10 mg/L oxLDL 处理 24 h; c. 中浓度组: 用 20 mg/L oxLDL 处理 24 h; d. 高浓度组: 用 30 mg/L oxLDL 处理 24 h。

1.4 油红 O 染色

将 THP-1 细胞培养于放有盖玻片的 6 孔板内, 待细胞被诱导为巨噬细胞后, 换无血清培养基培养 12 h, 加入不同浓度的 LDL 或 oxLDL 处理 24 h。细胞贴壁生长于培养板, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。4%冰多聚甲醛固定 10 min, 油红 O 染色 10 min, 苏木素染色 30 s, 盐酸酒精分色 6 s。水性封片剂封片, 显微镜观察; 细胞内脂质颗粒呈红色, 细胞核呈蓝色。

1.5 细胞免疫荧光

将 THP-1 细胞培养于 6 孔板内待细胞被诱导为巨噬细胞后, 换无血清培养基培养 12 h, 加入不同浓度的 LDL 处理 24 h。贴壁细胞用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 4%冰多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min, 5%BSA 封闭 20 min, 加入 NARC-1 一抗, 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 孵育荧光二抗, 常温 45 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 荧光显微镜观察。

1.6 逆转录-聚合酶链反应

用 TRIzol 试剂(Gibco 公司)提取总 RNA, 逆转

录成 cDNA, 再进行 PCR 循环。LDLR 的引物序列为: 上游 5' AGGAG ACGTGCTTGCTGTC 3', 下游 5' CTGAGCCGTTGTCGCAGT 3', 扩增片段长度为 120 bp。内参照采用 GAPDH 和 β -actin, GAPDH 引物序列为上游 5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG 3', 下游 5' TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG 3', 扩增片段长度为 697 bp。 β -actin 引物序列为上游 5' ATCCCTGTACGCCTCTGG 3', 下游 5' TCCTTCTGCATCCTGTCG 3', 扩增片段长度为 500 bp。PCSK9 的引物序列: 上游 5' ACGATGCCTGCCTCTACTCC 3', 下游 5' GCCTGTGATG TCCCCTCTGT 3', 扩增片段长度为 205 bp。取 RT-PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶电泳中电泳, LDLR、PCSK9 加样量均为 10 μ l, 内参的加样量为 3 μ l, 溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析。

1.7 Western blot

收集细胞, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入悬浮细胞裂解液裂解细胞, 置于冰上 20 min 后, 于 4℃, 10 000 r/min 离心 10 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量, 每条泳道取 50 μ g 蛋白质 / 泳道加入等体积 5×SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸使蛋白质变性。80 V 积层胶, 120 V 分离胶, 电泳分离蛋白质, 800 mA 1 h 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶 4℃ 封闭 12 h, 加入一抗 (NARC-1、LDLR 一抗购自 Cayman 公司), 4℃ 8 h。TBST 洗膜 15 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 15 min, 然后用 Western blot 荧光检测试剂激发荧光, 显示于 X 光片, 显影, 定影后进行图像分析。

1.8 统计学处理

实验所得数据采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间采用方差分析及 *t* 检验, 由 SPSS11.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 THP-1 巨噬细胞油红 O 染色结果

oxLDL 处理组中, 细胞内脂滴随着 oxLDL 浓度的增大而逐渐增大增多, 而在 LDL 处理组中, 随着 LDL 浓度的增大, 细胞内脂滴颗粒增多, 但是颗粒较小, 呈散在分布(图 1 和图 2)。

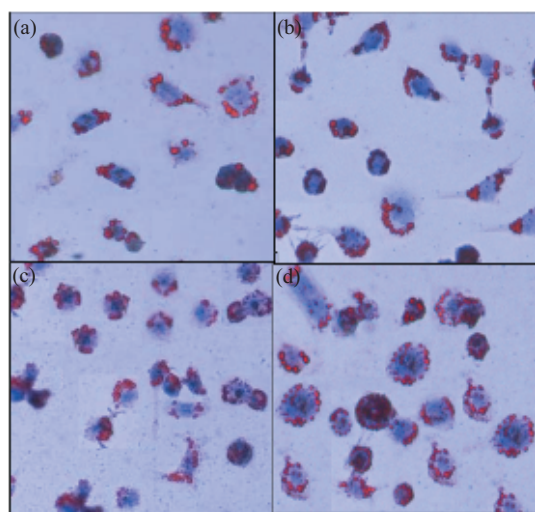


Fig. 1 Accumulation of lipid in THP-1 macrophages co-incubated with oxLDL

THP-1 macrophages were co-incubated with oxLDL with different concentrations for 24 h respectively, Oil red O staining showed that a number of visualized lipid droplet is big and accumulating in cells ($\times 400$). (a), (b), (c), (d) corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

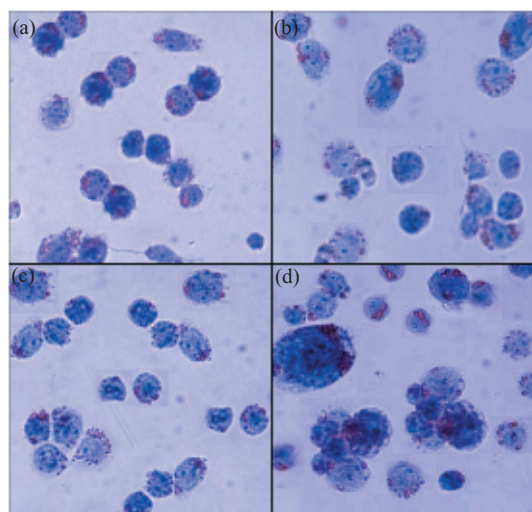


Fig. 2 Accumulation of lipid in THP-1 macrophages co-incubated with LDL

THP-1 macrophages were co-incubated with LDL with different concentrations for 24 h respectively, Oil red O staining showed that a number of visualized lipid droplet is small and dispersing in cells ($\times 400$). (a), (b), (c), (d) corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

2.2 THP-1 巨噬细胞中 NARC-1 表达及初步定位的免疫荧光染色结果

将 THP-1 细胞 PMA 诱导分化为巨噬细胞后, 0、10、20、30 mg/L LDL 孵育 24 h, 抗 NARC-1 免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察, 随着 LDL 浓度增大, THP-1 巨噬细胞上的荧光逐渐增强. Triton

X-100 处理后免疫荧光染色, 可见 NARC-1 定位于胞浆中某特定细胞器(图 3, 图 4).

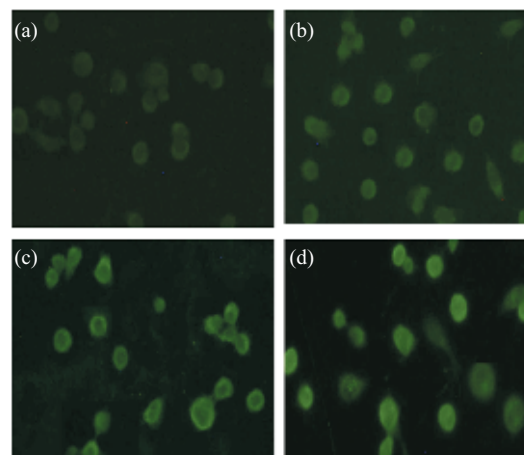


Fig. 3 Expression of matured PCSK9 (NARC-1) in THP-1 macrophages co-incubated with LDL

THP-1 macrophages were co-incubated with LDL with different concentrations for 24 h respectively, Matured PCSK9 (NARC-1) are expressed on the cell surface and increased with the increasing of LDL concentration through immunofluorescence assay ($\times 400$). (a), (b), (c), (d) corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

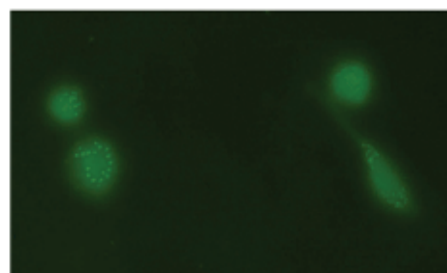


Fig. 4 Location of matured PCSK9 (NARC-1) in THP-1 macrophages

After treated with Triton X-100, the expression of matured PCSK9 (NARC-1) is localized in some organelle ($\times 400$).

2.3 LDL 对 THP-1 巨噬细胞中 LDLR、PCSK9 表达的影响

2.3.1 LDL 对 THP-1 巨噬细胞 LDLR 表达的影响

THP-1 巨噬细胞分别与 0、10、20、30 mg/L LDL 孵育 24 h 后, 用 RT-PCR 方法检测各实验组 LDLR mRNA 的水平(图 5). 结果显示, 10 mg/L (面积灰度比值为 0.4707)、20 mg/L (面积灰度比值为 0.4359)、30 mg/L (面积灰度比值为 0.4102), 与 0 mg/L (面积灰度比值为 0.5436) 处理组相比, 各浓度处理组细胞 LDLR mRNA 的表达均有所减少, 以 30 mg/L 浓度处理组减少最明显, 是 0 mg/L 处理组的 75% ($P < 0.05$).

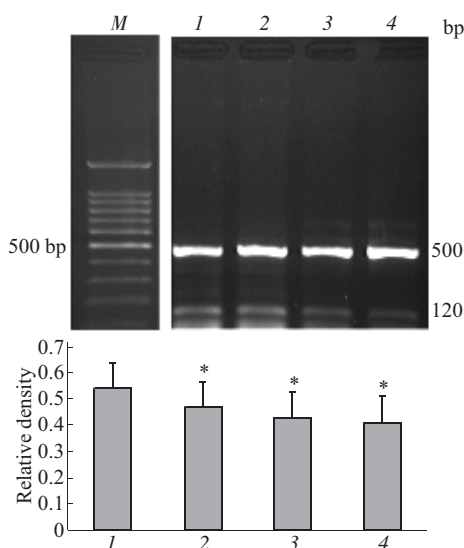


Fig. 5 Effect of LDL on the expression of LDL receptor mRNA in THP-1 macrophages

($n=3$, * $P < 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

用 Western blot 检测各实验组细胞中 LDLR 蛋白质表达(图 6)。结果显示, 10 mg/L(面积灰度比值为 0.6345)、20 mg/L(面积灰度比值为 0.5639)、30 mg/L(面积灰度比值为 0.4683)与 0 mg/L(面积灰度比值为 0.6913)比较, LDLR 蛋白质表达逐渐减少, 其中以 30 mg/L 浓度处理组细胞中减少最明显, 是 0 mg/L 的 66% ($P < 0.05$)。

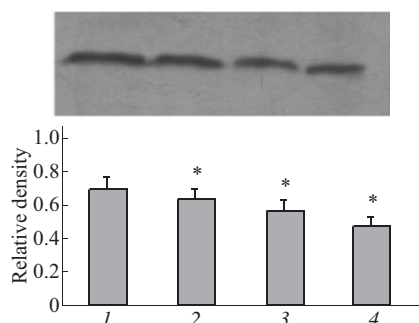


Fig. 6 Effect of LDL on the expression of LDL receptor protein in THP-1 macrophages

($n=3$, * $P < 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

2.3.2 LDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9 表达的影响. THP-1 巨噬细胞分别与 0、10、20、30 mg/L LDL 孵育 24 h 后, 用 RT-PCR 方法检测各实验组 PCSK9 的水平(图 7)。结果显示, 与 0 mg/L 组比较, 各浓度处理组细胞 PCSK9 mRNA 的表达有所增加, 30 mg/L 浓度处理组增加最明显($P < 0.05$)。

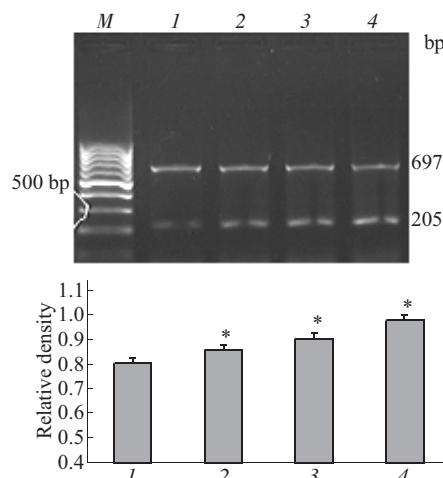


Fig. 7 Effect of LDL on the expression of PCSK9 mRNA in THP-1 macrophages

($n=3$, * $P < 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

用 Western blot 检测各实验组细胞 PCSK9 蛋白质表达(图 8)。结果显示, 10 mg/L(面积灰度比值为 0.44)、20 mg/L(面积灰度比值为 0.51)、30 mg/L(面积灰度比值为 0.67)处理组与 0 mg/L(面积灰度比值为 0.36)处理组比较, PCSK9 蛋白质表达逐渐上调, 其中以 30 mg/L 浓度处理组增加最明显($P < 0.05$)。

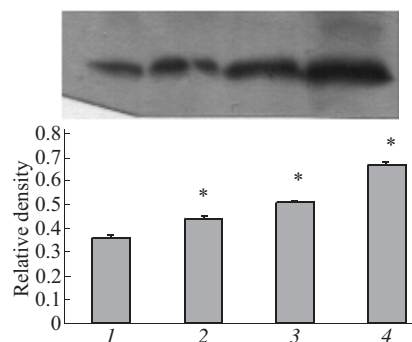


Fig. 8 Effect of LDL on the expression of PCSK9 protein in THP-1 macrophages

($n=3$, * $P < 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

2.4 oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞中 LDLR、PCSK9 表达的影响

2.4.1 oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞 LDLR 表达的影响. THP-1 巨噬细胞分别与 0、10、20、30 mg/L oxLDL 孵育 24 h 后, 用 RT-PCR 方法检测各实验组 LDLR mRNA 的水平(图 9)。结果显示, 随着 oxLDL 浓度的增大, LDLR 的表达所受影响不明显($P > 0.05$)。

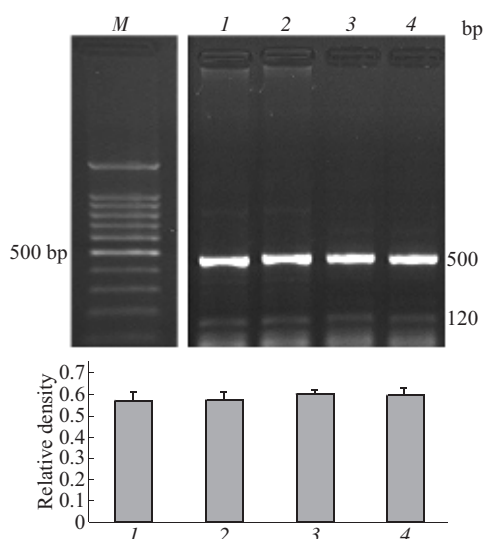


Fig. 9 Effect of oxidized LDL on the expression of LDL receptor mRNA in THP-1 macrophages

($n=3$, $^*P > 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

Western blot 检测各实验组细胞中 LDLR 蛋白质表达(图 10). 结果显示, 10 mg/L (面积灰度比值为 0.7907)、20 mg/L (面积灰度比值为 0.8032)、30 mg/L (面积灰度比值为 0.7905), 各处理组与 0 mg/L 组(面积灰度比值为 0.8321)比较, LDLR 蛋白质表达无明显变化($P > 0.05$).

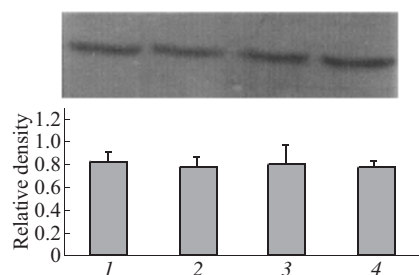


Fig. 10 Effect of oxidized LDL on the expression of LDL receptor protein in THP-1 macrophages

($n=3$, $^*P > 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

2.4.2 oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9 表达的影响. THP-1 巨噬细胞分别与 0、10、20、30 mg/L oxLDL 孵育 24 h 后, 用 RT-PCR 方法检测各实验组 PCSK9 mRNA 的水平(图 11). 结果显示, 0、10、20、30 mg/L 浓度处理组中, 细胞内 PCSK9 mRNA 的表达没有差异($P > 0.05$).

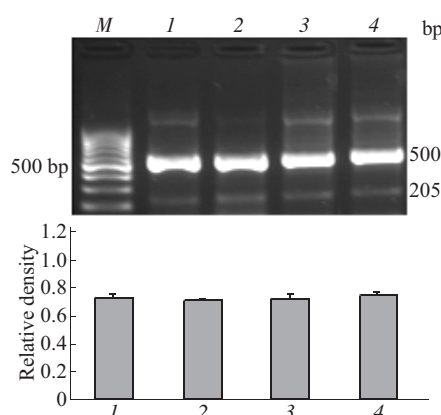


Fig. 11 Effect of oxidized LDL on the expression of PCSK9 mRNA in THP-1 macrophages

($n=3$, $^*P > 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

Western blot 方法检测各实验组细胞 PCSK9 蛋白质表达(图 12). 结果显示, 10 mg/L (面积灰度比值为 0.3801)、20 mg/L (面积灰度比值为 0.3825)、30 mg/L (面积灰度比值为 0.4010)处理组与 0 mg/L 组(面积灰度比值为 0.3945)比较, PCSK9 蛋白质表达并不随 LDL 浓度的增大而增大($P > 0.05$).

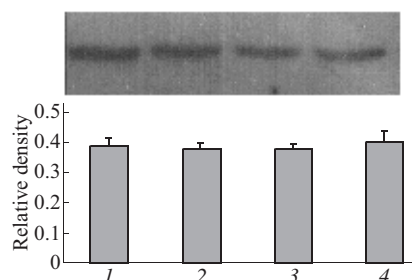


Fig. 12 Effect of oxidized LDL on the expression of PCSK9 protein in THP-1 macrophages

($n=3$, $^*P > 0.05$ compared with 1). 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 10, 20, 30 mg/L.

3 讨 论

高胆固醇血症是动脉粥样硬化最重要的危险因素之一, 也是目前唯一能够单独复制出实验性动脉粥样硬化动物模型的危险因素^[2]. 正常血脂情况下, 血液中脂质进入血管壁, 可以被血管壁巨噬细胞通过 LDL 受体摄取而及时清除和 / 或通过其他系统转运出血管壁, 不会有大量的脂质沉积. 但随血液中脂质浓度升高, 进入血管壁的脂质增加, 巨

噬细胞 LDL 受体清除途径受到负反馈调节, 使血管壁中脂质含量增加, 进而被氧化修饰, 再通过巨噬细胞表面清道夫受体途径进入巨噬细胞内, 由于该途径缺乏负反馈调节机制, 巨噬细胞大量摄取氧化修饰的脂质而成为泡沫细胞, 最终导致动脉粥样硬化发生^[3,4].

但是大量的临床实践发现^[5], 有近 50% 发生急性冠脉综合征的患者血脂水平正常. 此类患者中单纯用 LDL 负反馈调节机制很难解释脂质在血管壁积聚的原因, 这表明有其他的机制参与其中.

近来有研究发现, PCSK9 能够降解肝细胞表面 LDLR, 影响肝脏对血液中 LDL 的清除, 导致 LDL 水平升高^[6,7]. PCSK9 基因的突变被认为是家族性高胆固醇血症的第三种类型, 在许多种族人群的研究中, 都发现了 PCSK9 与血浆胆固醇浓度有非常密切的关系^[8~11]. 巨噬细胞同样通过 LDL 受体调节血管壁脂质代谢, 那么巨噬细胞中 PCSK9 表达如何呢? PCSK9 是否可直接通过在巨噬细胞中起作用而直接参与动脉粥样硬化的发生呢^[12]? PCSK9 与 LDLR 之间的相互作用需要其他蛋白质的参与, 而且这种蛋白质并不存在于所有细胞中, 但是究竟需要哪种蛋白质的辅助当前研究没有统一的结论. 因此不是在所有表达 PCSK9 的细胞中都能够抑制 LDLR, 在 HepG-2、HEK293 细胞中, PCSK9 的过表达可以对 LDLR 产生抑制作用, 但是在人成纤维细胞、人肝癌细胞 Huh7 中就没有这种作用^[13]. 我们在实验初期就发现, 在 THP-1 巨噬细胞中, PCSK9 有较高的表达, 这为研究 PCSK9 与动脉粥样硬化发生的可能直接关系以及研究 PCSK9 与 LDL 受体两者之间的关系找到了一种新的细胞模型.

本研究发现, 在 THP-1 巨噬细胞中, 与 HepG-2、HEK293 细胞一样, PCSK9 与 LDLR 的表达也呈负相关. 采用 LDL 和 oxLDL 这两种不同的处理因素处理细胞后, 在相同的浓度下, 两种不同的处理使 PCSK9 基因出现了不同的变化. 在 LDL 处理组中, 随着处理浓度的增加, PCSK9 mRNA 和蛋白质的表达均上调, 呈浓度依赖性, 而在 oxLDL 处理组, PCSK9 mRNA 和蛋白质的表达变化不明显. LDL 是细胞外源性胆固醇的重要来源之一, 在血液中可被肝及肝外组织细胞表面的^[14] apoB/apoE 受体即 LDLR 识别, 吞入细胞内进行水解, 发挥一系列功能. 当细胞外 LDL 逐渐升高时, 细胞内的胆固醇会进一步抑制 LDLR 的合

成, 引起 LDLR 表达降低. 细胞对 oxLDL 的摄取则通过清道夫受体. 因此, 本研究中 oxLDL 处理时, LDLR 的表达没有明显变化. 而在 LDL 处理组, 由于细胞通过 LDLR 对 LDL 的摄取, 使细胞的 LDLR 数量减少, 而与此同时 PCSK9 却出现了上升的趋势, 与 oxLDL 组不一样, 在 oxLDL 处理组, PCSK9 也没有明显变化. 但是实验中发现, 当 oxLDL 处理浓度达到 50 mg/L 时, 由于细胞内胆固醇浓度升高, PCSK9 的表达也因此而明显上调(这一结果未在论文中出示). 此种 LDL 和 oxLDL 对 PCSK9 表达调节差别的机理有待进一步探讨. 研究表明, 在许多细胞中 LDLR 的变化与 PCSK9 的表达成负相关^[13,14], 但是在 FAO-1 细胞中这种关系并不存在^[15]. 在 THP-1 巨噬细胞中还需要进一步的实验证明是否呈负相关.

本实验工作结果证明, 在 THP-1 巨噬细胞中, PCSK9 和 LDLR 都有表达. oxLDL 处理后, PCSK9 和 LDLR 的表达均无明显变化, 但是 LDL 处理细胞后发现在 THP-1 巨噬细胞中, LDLR 表达降低, PCSK9 表达增高, 均呈浓度依赖性, 说明 THP-1 细胞中, PCSK9 和 LDLR 的表达相关. 研究还发现, 30 mg/L LDL 处理 THP-1 巨噬细胞后, LDLR 蛋白水平下降了 50%, 而 mRNA 水平只下降了 30%, 与蛋白质水平下降程度不一致, 这表明除了 LDLR 负反馈调节途径外, 很可能是 PCSK9 在此发挥了对 LDLR 蛋白的直接作用导致了 LDLR 蛋白质水平的下降. 这也可能是正常血脂水平患者发生急性冠脉综合征的原因, 即在这部分患者中, 可能存在 PCSK9 的高活性或高表达, 使得血管壁巨噬细胞表面 LDLR 被降解, 即使进入血管壁的脂质不多, 但得不到清除, 从而积聚并被氧化修饰, 再通过清道夫受体途径被巨噬细胞摄取, 导致泡沫细胞形成和动脉粥样硬化发生. 这需要进一步的人群实验加以验证.

PCSK9 降解 LDLR 的机制目前尚未完全阐明. Thomas 等^[16,17]发现内源性 PCSK9 合成后能够迅速分泌出细胞, 降解 LDLR, 而且含有 PCSK9 蛋白的培养基能够降解 HepG2 和原代肝细胞的 LDLR, PCSK9 可能是直接与 LDLR 结合而将其降解, 这两种蛋白质都定位于一种晚期的内吞体/溶酶体样成分中. 但也有研究认为 PCSK9 和 LDLR 结合后内化至细胞里, 然后通过其他蛋白酶的作用降解 LDLR 是 PCSK9 发挥作用的机制^[18]. 在本研究中, PCSK9 表达与 THP-1 巨噬细胞的细胞膜上, 而且

在细胞浆中的一未知细胞器中, 免疫荧光染色发现了大量的 PCSK9 聚集, 该处可能是 PCSK9 降解 LDLR 的部位. 但还需要进一步的实验研究证明具体发生于细胞浆中的何种细胞器以及通过 PCSK9 是直接降解 LDLR 还是需要其他蛋白酶的参与, 这将是本文后续研究中需要阐明的重要目标.

参 考 文 献

- 程艳丽, 谢 闵, 刘录山, 等. PCSK9 基因突变与胆固醇血症. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, **23**(3): 172~176
Cheng Y L, Xie M, Liu L S, *et al.* Chin J Biolchem Mol Biol, 2007, **23**(3): 172~176
- 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床. 北京: 科学出版社, 2004. 11~14
Yang Y Z. Basic and Clinical Research on Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. Beijing: Science Press, 2004. 11~14
- Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, 1986, **232**(4746): 34~47
- Parthasarathy S, Printz D J, Boyd D, *et al.* Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. Atherosclerosis, 1986, **6**(5): 505~510
- Manurung D. Lipid profiles of acute coronary syndrome patients hospitalized in ICCU of Cipto Mangunkusumo Hospital. Acta Med Indones, 2006, **38**(4): 196~201
- Maxwell K N, Breslow J L. Adenoviral-mediated expression of PCSK9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, **101**(18): 7100~7105
- Maxwell K N, Fisher E A, Breslow J L, *et al.* Over expression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(6): 2069~2074
- Jirholt P, Adiels M, Boren J. How does mutant proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 induce autosomal dominant hypercholesterolemia?. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, **24**(8): 1334~1336
- Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, *et al.* Genetic variants in PCSK9 affect the cholesterol level in Japanese. J Hum Genet, 2004, **49**(2): 109~114
- Naoumova R P, Tosi I, Patel D, *et al.* Severe hypercholesterolemia in four british families with the D374Y mutation in the PCSK9 gene: long-term follow-up and treatment response. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, **25**(12): 2654~2660
- Damgaard D, Jensen J M, Larsen M L, *et al.* No genetic linkage or molecular evidence for involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 genes in the Familial Hypercholesterolemia phenotype in a sample of Danish families without pathogenic mutations in the LDL receptor and apoB genes. Atherosclerosis, 2004, **177**(2): 415~422
- Brown M S, Goldstein J L. Lowering LDL-not only how low, but how long?. Science, 2006, **311**: 1721~1723
- Park S W, Moon Y A, Horton J D, *et al.* Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. J Biol Chem, 2004, (79): 50630~50638
- Rashid S, Curtis D E, Garuti R, *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(15): 5374~5379
- Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, **24**(8): 1454~1459
- Thomas A L, David E C, Rita G, *et al.* Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. J Clin Invest, 2006, **116**(11): 2995~3005
- Holla O L, Cameron J, Berge K E, *et al.* Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. BMC Cell Biol, 2007, **8**: 9
- Qian Y W, Schmidt R J, Zhang Y, *et al.* Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. J Lipid Res, 2007, **48**(7): 1488~1498

Effects of LDL and oxLDL on Expression of PCSK9 and LDLR in THP-1 Macrophages*

LIU Lu-Shan**, CHENG Yan-Li, XIE Min, YANG Qiong, PAN Li-Hong,
JIANG Zhi-Sheng, TANG Chao-Ke, WEI Dang-Heng, TANG Zhi-Han

(Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract In order to study the effects of LDL and oxLDL on expression of PCSK9 and LDLR in THP-1 macrophages and find the relationship between them. THP-1 cells were induced to differentiate into macrophages by PMA treatment. Cells were then co-incubated with LDL or oxLDL with a concentration of 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L for 24h respectively. Cellular lipid was visualized by oil red O staining. The localization and semiquantitation of PCSK9 was confirmed by immunofluorescence assay, the expression of PCSK9 and LDLR was analyzed by RT-PCR and Western blotting. Oil red O staining showed that a number of visualized lipid droplet accumulated within THP-1 cells. The lipid droplet is big and accumulating in cells co-incubated with oxLDL but small and dispersing when co-incubated with LDL. Matured PCSK9 are expressed on the cell surface and some organelle, and increased with the increasing of LDL concentration through immunofluorescence assay. RT-PCR, Western blot showed that, in THP-1, LDLR was downregulated while PCSK9 was upregulated especially when treated with LDL, but the treatment of low concentration of oxLDL likely had no effect on expression of LDLR and PCSK9. Together, these results reveal that PCSK9 and LDLR may co-expressed in THP-1 cells, which are unable to be influenced by oxLDL, but may be down-regulated (LDLR) or up-regulated (PCSK9) by LDL, providing primary evidence of the correlation between PCSK9 and LDLR.

Key words LDL, oxLDL, PCSK9/NARC-1, LDLR, atherosclerosis, THP-1 macrophage

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700325) and Hunan Province Department of Education (07C618).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281279, E-mail: liuls2000@126.com

Received: September 6, 2007 Accepted: October 7, 2007