

pcsk9 siRNA 对 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响 *

刘录山** 谢 闵 姜志胜** 杨 琼 潘利红

武春艳 唐志晗 唐朝克 危当恒 王 佐

(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 *pcsk9* 基因沉默后对氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)诱导 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响, 用不同浓度 oxLDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 48 h, Hoechst33258 染色检测细胞凋亡, RT-PCR、Western blot 分别检测 *pcsk9* mRNA、NARC-1 蛋白的表达. 应用 Lipofectamine2000 转染 3 对 *pcsk9* siRNAs 进 THP-1 源性巨噬细胞中, 筛选出最有效的 siRNA 再转染入 THP-1 源性巨噬细胞, 24 h 后加入 oxLDL 处理 48 h, Hoechst33258 染色观察细胞评价细胞凋亡, 流式细胞术计数检测细胞凋亡率. 结果发现, 75 mg/L oxLDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 48 h 后, Hoechst33258 染色可见大量凋亡细胞. 同时 RT-PCR、Western blot 检测发现, *pcsk9* mRNA 和 NARC-1 蛋白质表达量均随 oxLDL 浓度的增加而增加, 75 mg/L oxLDL 组增加最明显. 不同浓度 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞后, RT-PCR 筛选出 3 对 siRNAs 的终浓度为 80 nmol/L 均可出现明显的沉默效应. 选取此浓度在蛋白质水平检测基因抑制情况, 筛选出最有效的一对 siRNA. 将筛选出来的 siRNA 转染细胞 24 h 后, 再用 oxLDL 处理 48 h, Hoechst33258 染色及流式细胞计数结果显示, 转染 siRNA 组凋亡明显被抑制. 结果表明, 在本研究的浓度范围内, 随着 oxLDL 浓度增加 *pcsk9* 的表达随之增加, 同时, THP-1 源性巨噬细胞凋亡也明显增加, 75 mg/L oxLDL 最明显, *pcsk9* mRNA 和蛋白质的表达也在该浓度最高. 提示 *pcsk9* siRNA 能有效抑制 *pcsk9* 基因的表达, 从而有效抑制由 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞的凋亡.

关键词 氧化型低密度脂蛋白, 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9/ 神经细胞凋亡调节转化酶 -1, 巨噬细胞, 凋亡, 小分子干扰 RNA

学科分类号 R363

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00427

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9, *pcsk9*) 基因编码神经细胞凋亡调节转化酶 -1 蛋白 (neural apoptosis-regulated convertase 1, NARC-1), 该基因属于蛋白质转化酶家族^[1,2]. 目前对 *pcsk9*/NARC-1 的研究发现, 其生物学功能主要有两种^[3~7]: 一是通过调节肝细胞表面低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR), 从而在血液脂质代谢中发挥重要作用; 其次是影响神经系统分化, 调节神经元凋亡. 近来有研究者提出, *pcsk9* 除了通过对肝细胞 LDLR 表达的调节作用参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生, 它还可能发挥对血管壁的直接毒性作用, 通过影响巨噬细胞和平滑肌细胞脂质代谢以及细胞凋亡来促进 As 的发展^[8]. 课题组前期研究发现, 巨噬细胞中有 *pcsk9*/

NARC-1 的表达, 其表达受 LDL 调节, 并且发现高浓度 oxLDL 也能调节 *pcsk9*/NARC-1 的表达^[9]. 本研究以 THP-1 源性巨噬细胞为研究对象, 观察 oxLDL 孵育的巨噬细胞中 *pcsk9* 表达变化, 同时运用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术将 *pcsk9* 基因沉默, 观察对 oxLDL 诱导的巨噬细胞凋亡的影响, 为 *pcsk9* 在 As 发生发展中的直接作用提供实验依据, 对阐明 As 发生机制具有重要的意义, 并有可能为 As 防治提供新的作用靶点.

* 国家自然科学基金资助项目 (30700325) 和湖南省科技厅科技计划重点项目 (2008FJ2006).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2008-06-13, 接受日期: 2008-07-31

1 材料与方法

1.1 细胞培养

THP-1 源性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, 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养. 培养基中加 HEPES 10 mmol/L, 在每次实验前用 160 nmol/L 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)孵育 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. 用超速离心法制备低密度脂蛋白, 用 10 μmol/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 Hoechst33258 染色观察 THP-1 源性巨噬细胞凋亡

THP-1 源性巨噬细胞接种于 6 孔板内, 在每次实验前换无血清培养基培养 12 h, 实验分组如下: a. 空白对照组, 无血清培养基培养 48 h; b. 25 mg/L oxLDL 处理 48 h; c. 50 mg/L oxLDL 处理 48 h; d. 75 mg/L oxLDL 处理 48 h; e. 100 mg/L oxLDL 处理 48 h.

Hoechst33258 染色, 以紫外光 340 nm 波长激发, 荧光显微镜下观察、摄片. 在凋亡细胞中, 细胞膜对 Hoechst33258 的摄取增高, 并且由于染色体高度浓缩, Hoechst33258 与之结合增强, 染色呈强蓝色荧光, 而正常细胞只呈微弱荧光, 死细胞则不被染色.

1.4 逆转录-聚合酶链反应检测 *pcsk9* mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 再进行 PCR 循环扩增. *pcsk9* 的引物序列: 上游 5' ACGATGCCTGCCTCTACTCC 3', 下游 5' GCCTGTGATGTCCCACTCTGT 3', 扩增片段长度为 205 bp. 内参照采用 GAPDH, 引物序列: 上游 5' TCACCATCTTCCAGGAGCGAG 3', 下游 5' TGTCGCTGTTGAAGTCAG AG 3', 扩增片段长度为 697 bp. 取 RT-PCR 产物在 1.2%的琼脂糖凝胶中电泳, *pcsk9* 加样量均为 10 μl, 内参的加样量为 3 μl, 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, 以各组的基因与内参照基因吸光度的比值来比较待测基因的 mRNA 表达差异.

1.5 Western blot 检测 NARC-1 蛋白的表达

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 g 离心 10 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量, 取 50 μg 蛋白质每泳道加入等体积 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, 80 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, 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 Wsetern 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.

1.6 筛选有效的 siRNA

1.6.1 siRNA 的设计制备. 在 GenBank 中查到人 *pcsk9* mRNA 序列(编号 NM_174936), 选择不同位点设计了 3 对 *pcsk9* siRNAs, 以上序列经序列相似性软件比对不与任何已知基因有同源性. *pcsk9* siRNAs 由广州锐博生物科技有限公司合成并进行荧光标记, *pcsk9* siRNA-1 正义链: 5' CCUGG-AGUUUAUUCGAAA dTdT 3', 反义链: 3' dTdT GGACCUCAAAUAAGCCUUU 5'. *pcsk9* siRNA-2 正义链: 5' GGCAGAGACUGAUCCACUU dTdT 3', 反义链: 3' dTdT CCGUCUCUGACUAGGUG-AA 5'. *pcsk9* siRNA-3 正义链: 5' GGUCUG-GAAUGCAAAGUCA dTdT 3', 反义链: 3' dTdT CCAGACCUUACGUUUCAGU 5'. 阴性对照 siRNA 由该公司提供. siRNA 成品为已退火的冻干粉, 使用前用稀释缓冲液将其溶解成 20 μmol/L 的工作母液. 所有 siRNA 均经过变性和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 去除未配对单链.

1.6.2 脂质体介导 *pcsk9* siRNA 转染细胞. 在 5 nmol 的 siRNA 中加入 250 μl 无 RNA 酶水(公司配送), 得到浓度为 20 μmol/L 的 siRNA 母液. 转染前 24 h 将细胞接种至 6 孔板. siRNA 用 Opti-MEM I 稀释, 待加入细胞后, 终浓度达 30nmol/L、50 nmol/L、80 nmol/L.

1.6.3 荧光显微镜检测 *pcsk9* siRNA 的转染效率. 在转染 6 h 后, 先用 PBS 洗涤细胞 1~2 次, 洗脱残留在培养基或细胞表面的 FAM-siRNA, 减少背景干扰. 荧光显微镜观察, 成功转染的细胞可看到 FAM 绿色荧光散在分布在细胞质中.

1.6.4 RT-PCR 检测转染后 *pcsk9* mRNA 的表达. 转染不同浓度的 siRNA(30 nmol/L、50 nmol/L、

80 nmol/L)24 h 后, 提取 RNA, 用 RT-PCR 的方法检测各实验组 *pcsk9* mRNA 的表达, 从而选取最有效的 siRNA 浓度. 设立空白对照组(blank control), 转染试剂组(transfection reagent), 阴性对照组(negative control), siRNA 组.

1.6.5 Western blot 检测转染后 NARC-1 蛋白质的表达. 选定 RT-PCR 结果筛选出的有效的 siRNA 浓度, 转染三对针对不同靶点设计的 siRNAs. 48 h 后提取蛋白质, 用 Western blot 方法检测各实验组 NARC-1 蛋白表达. 从而筛选出最有效的一对 siRNA. 分组同前.

1.7 观察 *pcsk9* siRNA 对 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响

1.7.1 Hoechst33258 染色形态学观察细胞凋亡. 用筛选好浓度的有效 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞后, oxLDL 处理 48 h, Hoechst33258 染色形态学观察细胞凋亡.

1.7.2 PI 染色流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率. 用筛选好浓度的有效 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞后, oxLDL 处理 48 h, 收集细胞, 加 PI 至终浓度 5 mg/L, 350 目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块, 4℃ 避光染色 30 min 后, 上流式细胞仪检测(激发波长 488 nm, 发射波长 610 nm)各期细胞 DNA 的含量. 测定数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理.

1.8 统计学处理

所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)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 实验结果

2.1 Hoechst33258 染色结果

75 mg/L oxLDL 组处理 THP-1 源性巨噬细胞中, 出现大量的核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞. 100 mg/L oxLDL 组处理 THP-1 源性巨噬细胞中, 因为细胞出现较多死亡, 细胞数目减少, 凋亡细胞反而较少(图 1).

2.2 oxLDL 对 THP-1 源性巨噬细胞 *pcsk9*/NARC-1 表达的影响

THP-1 源性巨噬细胞分别与 0、25、50、75、100 mg/L oxLDL 孵育 48 h 后, 用 RT-PCR 方法检测各实验组 *pcsk9* mRNA 的水平(图 2). 结果显示: 25 mg/L(面积灰度比值为 0.769)、50 mg/L(面积灰度比值为 0.946)、75 mg/L(面积灰度比值为 1.019),

100 mg/L(面积灰度比值为 0.995)与 0 mg/L(面积灰度比值为 0.752)处理组相比, 各浓度处理组细胞 *pcsk9* mRNA 的表达均有所增加, 以 75 mg/L 浓度处理组增加最明显($P < 0.05$).

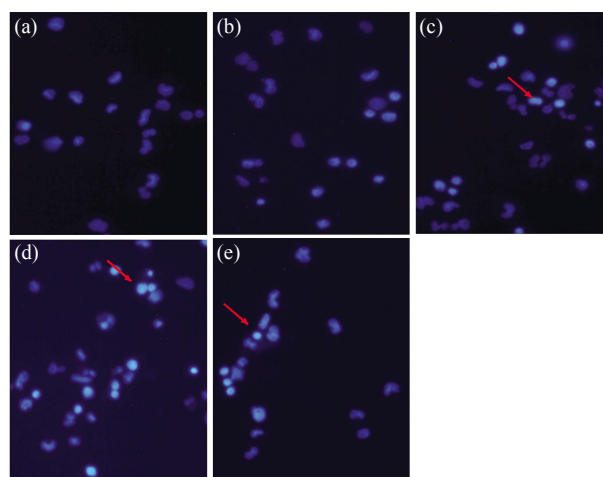


Fig. 1 THP-1 macrophages were co-incubated with oxLDL with different concentrations for 48 h respectively. Hoechst33258 staining showed that the number of cells with nuclear condensation increased significantly after induced by 75 mg/L oxLDL ($\times 200$). (a)(b)(c)(d)(e) corresponding to 0, 25, 50, 75, 100 mg/L.

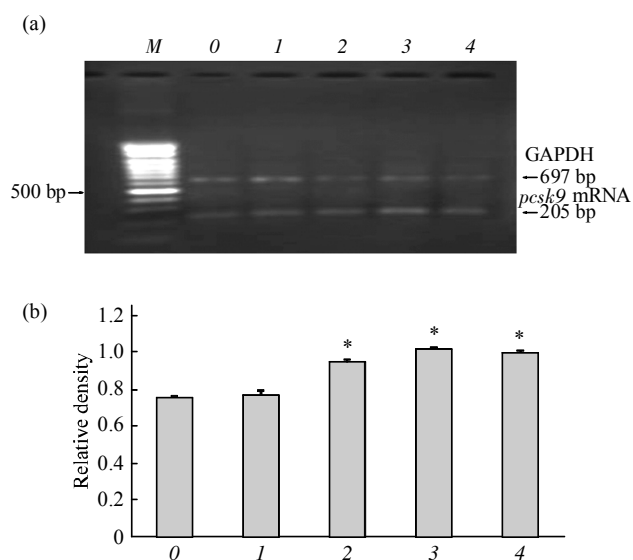


Fig. 2 Effect of oxLDL on the expression of *pcsk9* mRNA in THP-1 macrophages

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with 0. 0, 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 25, 50, 75, 100 mg/L, M: Marker.

THP-1 源性巨噬细胞分别与 0、25、50、75 mg/L oxLDL 孵育 48 h 后, 用 Western blot 方法检测各实验组细胞 NARC-1 蛋白表达(图 3). 结果显示, 25 mg/L(面积灰度比值为 0.937)、50 mg/L

(面积灰度比值为 0.951), 75 mg/L(面积灰度比值为 1.009)、100 mg/L(面积灰度比值为 0.997)与 0 mg/L(面积灰度比值为 0.934)处理组相比, 各浓度处理组细胞 NARC-1 蛋白的表达均有所增加, 以 75 mg/L 浓度处理组增加最明显($P < 0.05$).

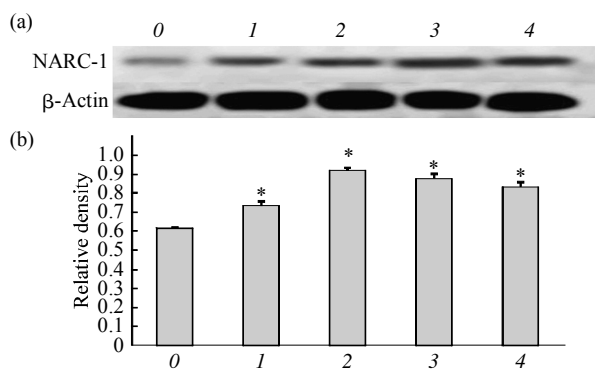


Fig. 3 Effect of oxLDL on the expression of NARC-1 in THP-1 macrophages

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with 0. 0, 1, 2, 3, 4 corresponding to 0, 25, 50, 75, 100 mg/L.

2.3 荧光标记的 siRNA (FAM-siRNA) 转染结果鉴定

在转染 6 h 后用荧光显微镜检测, 如图 4 中发绿色荧光的细胞表示 siRNA 已成功转染入细胞内. 与同一视野下光学显微镜图片对照, 大致判断有较高的转染效率(图 4).

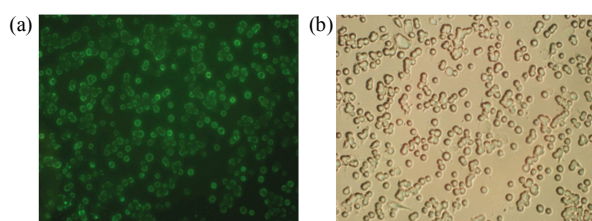


Fig. 4 THP-1 macrophages transfected with FAM-siRNA 6 h through immunofluorescence assay ($\times 200$)

(a)(b) corresponding to the same visual field under a fluorescence microscope and an optical microscope respectively.

2.4 *pcsk9* siRNAs 对 THP-1 源性巨噬细胞 *pcsk9* mRNA 表达水平的影响

转染不同浓度的 siRNA 24 h 后, 提取 RNA, 用 RT-PCR 的方法检测各组 *pcsk9* mRNA 表达(图 5, 6, 7). 结果显示: siRNA 浓度为 80 nmol/L, 三对 siRNA 均出现明显的 *pcsk9* 基因沉默效应, 而其中 *pcsk9* siRNA-1 与 *pcsk9* siRNA-3 在浓度为 30 nmol/L 时 *pcsk9* 表达反而出现上调.

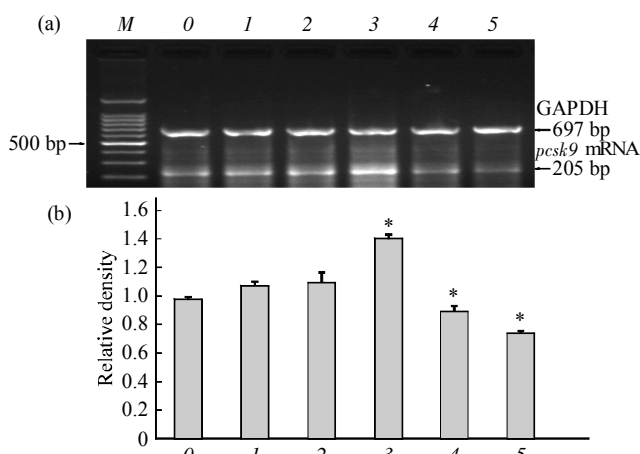


Fig. 5 Expression of *pcsk9* mRNA of THP-1 macrophage transfected with *pcsk9* siRNA-1

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with 0. 0, 1, 2, 3, 4, 5 corresponding to blank control, transfection reagent, negative control, 30 nmol/L siRNA-1, 50 nmol/L siRNA-1, 80 nmol/L siRNA-1. M: Marker.

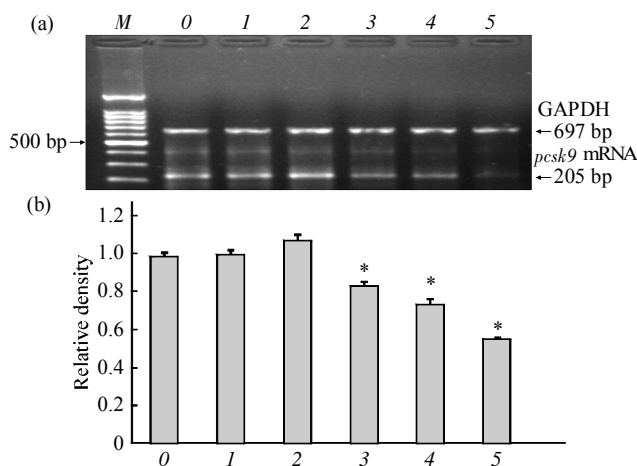


Fig. 6 Expression of *pcsk9* mRNA of THP-1 macrophage transfected with *pcsk9* siRNA-2

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with 0. 0, 1, 2, 3, 4, 5 corresponding to blank control, transfection reagent, negative control, 30 nmol/L siRNA-2, 50 nmol/L siRNA-2, 80 nmol/L siRNA-2. M: Marker.

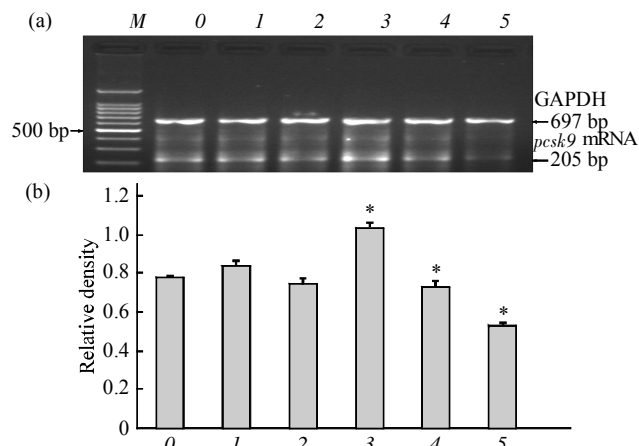


Fig. 7 Expression of *pcsk9* mRNA of THP-1 macrophage transfected with *pcsk9* siRNA-3

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with 0. 0, 1, 2, 3, 4, 5 corresponding to blank control, transfection reagent, negative control, 30 nmol/L siRNA-3, 50 nmol/L siRNA-3, 80 nmol/L siRNA-3. M: Marker.

2.5 *pcsk9* siRNAs 对 THP-1 源性巨噬细胞 NARC-1 蛋白表达水平的影响

选取 80 nmol/L 作为 *pcsk9* siRNA 实验浓度, 转染 3 对 *pcsk9* siRNAs 48 h 后, 提取蛋白质, 用 Western blot 方法检测各实验组 NARC-1 蛋白表达 (图 8)。结果显示, 与对照组相比, 实验选取的三对 *pcsk9* siRNAs 均能在蛋白质水平抑制 NARC-1 蛋白的表达。

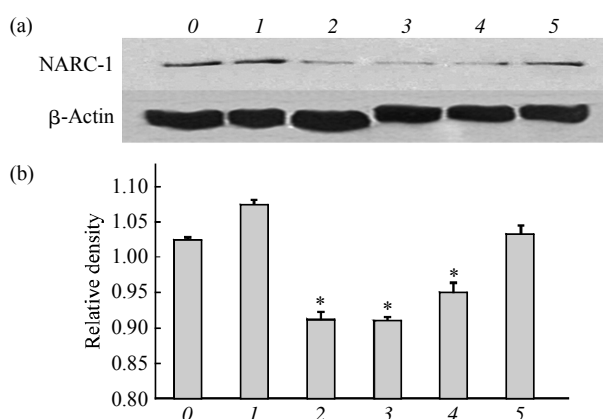


Fig. 8 Expression of NARC-1 protein of THP-1 macrophage transfected with *pcsk9* siRNAs

$n=3$, * $P < 0.05$ compared with blank control. 0, 1, 2, 3, 4, 5 corresponding to blank control, transfection reagent, 80 nmol/L siRNA-1, 80 nmol/L siRNA-2, 80 nmol/L siRNA-3, negative control.

2.6 *pcsk9* siRNA 对 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞凋亡的影响

2.6.1 细胞形态学检测。Hoechst33258 染色后, 荧

光显微镜观察细胞核形态, 结果如图 9 所示, 与空白对照组相比, 75 mg/L oxLDL 处理组其细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞较多, 凋亡形态较明显, 而转染有效浓度 *pcsk9* siRNA-2 后用 75 mg/L oxLDL 处理组凋亡则不明显。

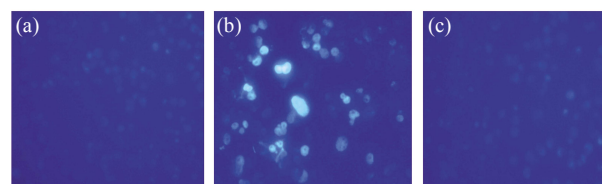


Fig. 9 After transfected *pcsk9* siRNA 24 h, THP-1 macrophages were co-incubated with oxLDL for 48 h

Hoechst33258 staining showed that compared with 75 mg/L oxLDL, the number of cells with nuclear condensation decreased significantly after transfected 80 nmol/L siRNA-2($\times 200$). (a)(b)(c) corresponding to blank control, 75 mg/L oxLDL, 80 nmol/L siRNA-2+75 mg/L oxLDL.

2.6.2 流式细胞术计数检测凋亡率。细胞经 PI 染色后, 用流式细胞仪分析凋亡细胞可在 G0/G1 期前形成一亚二倍体凋亡峰。结果如图 10 所示, THP-1 源性巨噬细胞自然凋亡率为 1.04%, 经 75 mg/L oxLDL 处理 48h 后, 凋亡率为 19.8%, 转染 *pcsk9* siRNA-2 后用 75 mg/L oxLDL 处理组凋亡率为 4.11%。表明转染 *pcsk9* siRNA 后可抑制 oxLDL 诱导的 THP-1 源性巨噬细胞的凋亡。

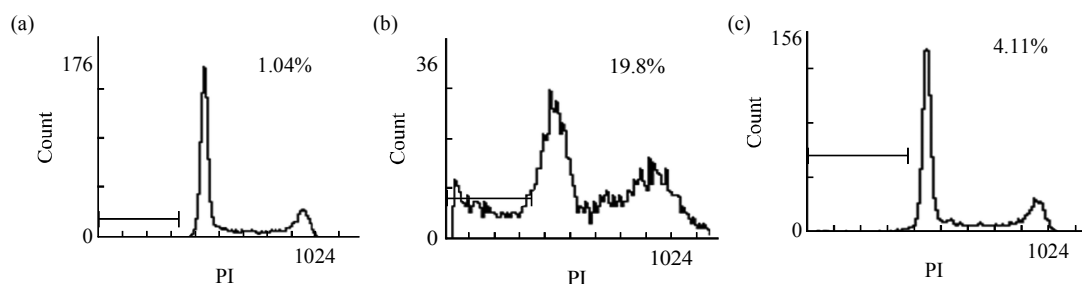


Fig. 10 Flow cytometrical analysis of PI-stained THP-1 macrophages.

After transfected siRNA-2 24 h, THP-1 macrophages were co-incubated with oxLDL for 48 h. (a)(b)(c) corresponding to blank control, 75 mg/L oxLDL, 80 nmol/L siRNA-2+75 mg/L oxLDL.

3 讨 论

巨噬细胞在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有重要作用。巨噬细胞摄取大量脂质成为荷脂细胞, 荷脂巨噬细胞的凋亡增加脂质的沉积, 同时分泌大量炎症因子影响斑块的稳定性^[10, 11]。本实验采

用 oxLDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞凋亡, 选取 5 个浓度梯度, 诱导 48 h 后, 经 Hoechst33258 染色荧光显微镜下观察发现, 可以看出随着 oxLDL 浓度的增加, THP-1 源性巨噬细胞核呈浓染致密的固缩形态或颗粒状荧光的凋亡细胞有增多趋势, 75 mg/L oxLDL 处理 48 h 可以诱导 THP-1 源性巨

噬细胞出现凋亡最明显, oxLDL 浓度增加到 100 mg/L 时, 细胞出现较多坏死, 凋亡细胞反而较少.

当前的研究表明, *pcsk9* 主要是通过调节肝细胞表面低密度脂蛋白受体(LDLR)参与胆固醇代谢从而间接参与 As 的发生^[12]. *pcsk9* 是否对血管壁有直接毒性作用及其作用机制目前并不清楚^[8, 13]. 课题组前期研究发现, oxLDL 在 10~30 mg/L 时对 THP-1 源性巨噬细胞中 *pcsk9* 表达没有影响, 但当 oxLDL 浓度达到 50 mg/L 时 *pcsk9* 表达明显上调, 提示 *pcsk9* 可能在 oxLDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞生物学性质改变中起作用^[9]. *pcsk9* 是一种神经细胞凋亡调节转化酶, 体外细胞实验也发现 *pcsk9* 参与了神经细胞的凋亡, *pcsk9* 是否参与巨噬细胞的凋亡呢? 本实验从 *pcsk9* 对巨噬细胞凋亡作用入手, 研究 *pcsk9* 是否是发挥对血管壁细胞的直接作用来参与动脉粥样硬化. 实验结果发现, 高浓度的 oxLDL 可以诱导巨噬细胞凋亡, 75 mg/L 时细胞凋亡最明显. 同时, 随着 oxLDL 处理浓度的增加, *pcsk9* mRNA 和 NARC-1 蛋白的表达均上调, 在 75 mg/L 时表达最高. 这些结果一定程度上提示巨噬细胞这种凋亡与 *pcsk9* 表达可能存在某种相关性. 也根据此结果设定 75 mg/L 作为本实验后续 oxLDL 处理浓度.

RNA 干扰(RNAi)是一种由双链 RNA 所引起的序列特异性基因沉默. RNAi 技术作为新兴的基因阻抑方法, 在功能基因组学、微生物学、基因表达调控机理研究等领域得到了广泛应用^[14]. 本实验选择化学合成法合成 siRNA, 有利于应用荧光物质标记 siRNA, 便于用荧光显微镜分析 siRNA 进入细胞过程或者在细胞中的定位. 本实验中 THP-1 源性巨噬细胞经佛波酯(phorbol myristoyl acetate, PMA)诱导后为贴壁细胞, 较之悬浮细胞具有转染效率高的特点, 实验更具可行性, 保证了后继实验的效果. 研究已经证实, 不同位点的 siRNAs 具有不同的干扰效率, 所以本实验设计了多对针对 *pcsk9* 不同位点的 siRNAs 进行筛选, 以保证干扰的有效性. 实验设定 3 个 siRNAs 浓度梯度(30、50、80 nmol/L), 先在 mRNA 水平检测基因抑制情况, 发现随着浓度的提高这种沉默效应明显, 在 siRNA 的终浓度为 80 nmol/L 时出现明显的沉默效应. 但也发现, 有在 30 nmol/L 时基因的表达反而出现了上调的情况, 此种剂量效应的缺失与 siRNA 所致的基因抑制效应和某些尚不清楚的机制导致的

基因表达活化效应这两者间的此消彼长有关^[15]. 实验选取终浓度为 80 nmol/L 的 siRNA 进一步检测蛋白质水平基因抑制情况, 筛选出最有效的一对 siRNA. 在多数哺乳动物细胞中转染人工合成的 siRNA 后, 基因的抑制高峰时间为 48~72 h^[16], 而本实验中, 24 h mRNA 抑制效应就开始显现, 48 h 蛋白质抑制效应出现. 但本实验没有选择多个时间点采样, 缺少了这种抑制效应维持时间的证据. 实验结果表明, 本实验设计的 siRNAs 能有效抑制 *pcsk9* 基因的表达. 为了进一步证实 *pcsk9* 与巨噬细胞凋亡之间可能的相关性, 进一步通过形态学和流式细胞计数评价了 *pcsk9* 基因沉默后, 对巨噬细胞凋亡的影响. 实验结果表明, 将能有效抑制 *pcsk9* 基因表达的 siRNA 转染 THP-1 源性巨噬细胞后, oxLDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞发生凋亡的作用被明显抑制.

综上所述, 我们的研究表明, 较高浓度 oxLDL 对巨噬细胞有明显促凋亡作用, 随着 oxLDL 浓度增加巨噬细胞凋亡明显, 同时 *pcsk9* 的表达也随之变化, 且趋势相一致. 进一步将 *pcsk9* 基因沉默之后, 观察这种凋亡作用是否有影响, 结果发现, 应用 siRNA 干扰 *pcsk9* 表达后对 oxLDL 诱导的巨噬细胞的凋亡有抑制作用, 也就是说, *pcsk9* 可促使 THP-1 源性巨噬细胞凋亡. 这些结果表明, *pcsk9* 可能通过促使巨噬细胞凋亡而直接参与血管壁 As 的发生发展, 提供了对 *pcsk9* 在 As 发病机制中功能研究的新方向和 As 防治的新的可能靶点.

许多研究证明, 细胞内有多种蛋白酶与细胞凋亡密切相关, 归结为 Caspase 依赖性和非 Caspase 依赖性 2 条细胞凋亡途径. 其中 Caspase 依赖性途径无论是线粒体介导凋亡途径还是死亡受体介导凋亡途径, 最终都是通过 Caspase-3 作为效应酶, 降解相关的蛋白质, 促使细胞凋亡的发生. 介导非 Caspase 依赖性细胞凋亡途径的蛋白酶已知的包括^[17, 18]: a. Fragmentin/granzymes; b. 丝氨酸蛋白酶; c. Calpains; d. Ubiquitin 依赖性的蛋白质降解作用; e. Cathepsin D 和 Cathepsin B 等. *pcsk9* 作为一种蛋白水解酶, 是通过活化 Caspase 家族启动 Caspase 依赖性细胞凋亡途径, 还是本身直接降解与凋亡相关蛋白质, 从而启动细胞凋亡, 成为一条新的非 Caspase 依赖性细胞凋亡途径? 除了 LDLR 外, *pcsk9* 是否还有其他的作用底物目前还不清楚, 因此, 发现 *pcsk9* 新的作用底物, 进而研

究 *pcsk9* 促细胞凋亡的具体机制将是本课题组下一步研究目标。

参 考 文 献

- 1 Elagoz A, Benjannel S, Mammabassi A, *et al.* Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/SIP: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (13): 11265~11275
- 2 Seidah N G, Benjannel S, Wickham L, *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(3): 928~933
- 3 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
- 4 谢 闵, 潘利红, 刘录山, 等. *pcsk9*/NARC-1 在脂质代谢和神经系统中的作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, **24**(1): 6~10
Xie M, Pan L H, Liu L S, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, **24** (1): 6~10
- 5 Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, *et al.* Implication of the proprotein convertase PCSK9/NARC-1 in the development of the nervous system. *J Neurochem*, 2006, **98**(3): 838~850
- 6 Peterson A S, Fong L G, Young S G. PCSK9 function and physiology. *J Lipid Res*, 2008, **49**(6): 1152~1156
- 7 Bingham B, Shen R, Kotnis S, *et al.* Proapoptotic effects of NARC 1 (= PCSK9), the gene encoding a novel serine proteinase. *Cytometry A*, 2006, **69**(11): 1123~1131
- 8 Brown M S, Goldstein J L. Lowering LDL-not only how low, but how long?. *Science*, 2006, **311**(5768): 1721~1723
- 9 刘录山, 程艳丽, 谢 闵, 等. LDL、oxLDL 对 THP-1 巨噬细胞 PCSK9、LDLR 表达的影响研究. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(5): 540~547
- 10 Libby P, Geng Y J, Aikawa M, *et al.* Macrophage and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*, 1996, **7**(5): 330~335
- 11 Boyle J J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, **3** (1): 63~68
- 12 Schmidt R J, Beyer T P, Bensch W R, *et al.* Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **370**(4): 634~640
- 13 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 Biochem Mol Biol*, 2007, **23**(3): 172~176
- 14 Boshier J M, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, 2000, **2**(2): E31~E36
- 15 Overhoff M, Alken M, Far R K, *et al.* Local RNA target structure influences siRNA efficacy: A systematic global analysis. *J Mol Biol*, 2005, **348**(4): 871~881
- 16 Wilson J A, Jayasena S, Khvorova A, *et al.* RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (5): 2783~2788
- 17 Bröker L E, Krüyt F A, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(9): 3155~3162
- 18 Moffitt K L, Martin S L, Walker B. The emerging role of serine proteases in apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt 3): 559~560

Effects of *pcsk9* siRNA on THP-1 Derived Macrophages Apoptosis Induced by oxLDL*

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

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

Abstract In order to study the effect of *pcsk9* siRNA on THP-1 derived macrophages apoptosis induced by oxLDL, THP-1 derived macrophages were induced to differentiate into macrophages by PMA treatment for 24 h. The experiments were designed as follows: cells were incubated with oxLDL with a concentration of 0, 25, 50, 75, 100 mg/L for 48 h respectively. The apoptosis of THP-1 derived macrophages was observed by staining with Hoechst33258. The expression of *pcsk9* was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot. The siRNAs for *pcsk9* gene were designed and synthesized, then transfected into THP-1 derived macrophages by positive ion liposome Lipofectamine 2000. Transfection efficiency was assessed by fluorescence microscope assay. RT-PCR and Western blot were conducted to detect the expression of *pcsk9* after 24 h, 48 h respectively. The most efficient siRNA was selected to transfect into THP-1 derived macrophages. 24 h after transfection, cells were treated with oxLDL for 48 h, and then Hoechst 33258 staining. The results showed that the number of cells with nuclear condensation induced by 75 mg/L oxLDL increased significantly. In THP-1 derived macrophages, *pcsk9* was upregulated with increasing concentration of oxLDL, while 75 mg/L oxLDL increased significantly. The RNA interference experiment showed that siRNA was successfully transfected into cells and 80 nmol/L as most effective dose of siRNA was selected by RT-PCR and Western blot. Compared with control, the suppression of apoptosis in THP-1 cells transfected with 80 nmol/L of siRNA for 24 h and incubated with 75 mg/L of oxLDL for another 48 h was detected by Hoechst 33258 staining and flow cytometer. Together, these results reveal the expression of *pcsk9* mRNA and protein were increased by oxLDL in a concentration-dependent manner. Expression of *pcsk9* gene could be effectively suppressed by siRNA. The apoptosis of THP-1 derived macrophages induced by oxLDL could be effectively suppressed by *pcsk9* siRNA.

Key words oxidized low-density lipoprotein, proprotein convertase subtilisin/kexin 9/neural apoptosis-regulated convertase 1, macrophages, apoptosis, small interfering RNA

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00427

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30700325) and Key Project of Science and Technology Department of Hunan Province(2008FJ2006).

**Corresponding author.

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

Received: June 13, 2008 Accepted: July 31, 2008