

ERK1/2信号通路在 OX-LDL 诱导的血管平滑肌细胞 TLR4 mRNA 表达中的作用*

徐斌, 张延斌*, 许旭光, 王大杰, 潘德峰, 李东野

(徐州医学院附属医院心内科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨 ERK1/2 信号通路在氧化性低密度脂蛋白 (OX-LDL) 诱导的血管平滑肌细胞 (VSMCs) Toll 样受体-4 (TLR4) mRNA 表达中的作用。方法 采用贴块法培养大鼠 VSMCs 在氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 及 PD98059 (ERK1/2 特异性抑制剂) 作用下采用 RT-PCR 检测 VSMCs TLR4 mRNA 的表达, 用 Western blotting 检测 ERK1/2 磷酸化水平的变化。结果 OX-LDL 使 VSMCs ERK1/2 磷酸化水平升高; PD98059 抑制 ERK1/2 的磷酸化; OX-LDL 刺激 VSMCs 上调 TLR4 mRNA 的表达 ($P < 0.05$); PD98059 预孵育后 TLR4 mRNA 的表达较单独 OX-LDL 刺激情况下降低 ($P < 0.05$)。结论 OX-LDL 通过或部分通过 ERK1/2 信号通路介导 VSMCs TLR4 mRNA 的表达。

关键词: 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 氧化性低密度脂蛋白; Toll 样受体-4; ERK1/2

中图分类号: R543.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2010)02-0086-03

Role of ERK1/2 pathway in the oxidized low density lipoprotein induced TLR4 mRNA expression in vascular smooth muscle cells

XU Bin, ZHANG Yanbin*, XU Xuguang, WANG Dajie, PAN Defen, LI Dongye

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the role of ERK1/2 pathway in the Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA expression in vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by oxidized low density lipoprotein (OX-LDL). Methods VSMCs were isolated from the thoracic aorta of rats by explant technique. TLR4 mRNA expression in VSMCs stimulated with OX-LDL and PD98059 (ERK1/2 specific inhibitor) were detected by RT-PCR. The variations of phosphorylation levels of ERK1/2 were detected by Western blotting. Results OX-LDL up-regulated the phosphorylation of ERK1/2; PD98059 down-regulated the phosphorylation of ERK1/2; the expression of TLR4 mRNA was up-regulated by OX-LDL stimulation in VSMCs ($P < 0.05$), while it was diminished by PD98059 preincubation as compared to OX-LDL stimulation alone ($P < 0.05$). Conclusion The expression of TLR4 mRNA in VSMCs could be mediated by OX-LDL at least in part via ERK1/2 pathways.

Key words: atherosclerosis; smooth muscle cells; oxidized low density lipoprotein; Toll-like receptor 4; ERK1/2

近年来炎症在动脉粥样硬化 (atherosclerosis AS) 形成和发展中的作用已经越来越引起人们的重视^[1], 可以认为 AS 以慢性炎症为基础, 以天然和获得性免疫细胞在动脉壁内膜聚集为特征^[2]。参与 AS 形成的多种细胞, 如巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells VSMCs) 等, 都能表达 Toll 样受体-4 (Toll-like receptor 4, TLR4)。TLR4 作为一种模式识别受体是一种介导天然免疫的跨膜信号传递受体, 识别致病原相关分子模式, 是联系天然免疫和获得性免疫的

桥梁。越来越多的证据表明 TLR4 在 AS 的形成和进展过程中发挥了重要作用^[3]。本研究旨在探讨氧化低密度脂蛋白 (OX-LDL) 对 VSMCs TLR4 mRNA 表达的影响, 并从 ERK1/2 信号转导途径探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); RT-PCR 试剂盒、Trizol (Promega 公司); PCR 引物 (上海生工生物工程有限公

* * 通信作者, E-mail: zhangyanbin99@sina.com

司); OX- LDL (协和医科大学生物化学教研室); 山羊抗兔二抗(碧云天生物技术研究所); 兔抗大鼠 ERK1/2、p-ERK1/2、 β -actin-抗(北京中杉金桥生物技术有限公司); PD98059(ERK1/2上游激酶的特异性抑制剂, Signa公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠主动脉 VSMCs 培养 雄性 SD 大鼠(徐州医学院实验动物中心提供), 200~250 g 断头处死, 取胸主动脉中膜以贴块法培养于含 20% 胎牛血清的 DMEM 中, 置于 37°C、5% CO_2 孵箱中培养, 5 天后可见细胞从组织块边缘爬出, 10 天后出现致密细胞层。此时以含 10% 胎牛血清的 DMEM 传代, 传代细胞呈典型的“峰与谷”样生长, 细胞经 α -SM actin-抗鉴定为 VSMCs。取生长良好的第 4 代细胞用于实验, 接种于六孔培养板内。细胞基本融合后, 用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h 使细胞处于 G_0/G_1 期, 备用。

1.2.2 Western blotting 检测 ERK1/2 磷酸化水平 实验分为 3 组 ($n=3$): 空白对照组、OX- LDL 组 (50 mg/L) 和 OX- LDL +PD98059 组 (PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 预孵育 1 h 然后加 OX- LDL 50 mg/L 刺激), 45 min 后收集细胞。细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, Lowry 法进行蛋白质定量, 以每孔 50 μg 上样, 经 12% SDS-PAGE 电泳, 实验独立重复 3 次。

1.2.3 RT-PCR 法检测 TLR4 mRNA 的水平 实验分为 5 组 ($n=3$): ①空白对照组; ② OX- LDL 组 (加 OX- LDL 50 mg/L 6 h 后收集细胞); ③ OX- LDL +PD98059 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 (PD98059 10 $\mu\text{mol/L}$ 预孵育 1 h 然后加 OX- LDL 50 mg/L 刺激, 6 h 后收集细胞); ④ OX- LDL +PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 (PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 预孵育 1 h 然后加 OX- LDL 50 mg/L 刺激, 6 h 后收集细胞); ⑤ OX- LDL +PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 组 (PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 预孵育 1 h 然后加 OX- LDL 50 mg/L 刺激, 6 h 后收集细胞)。总 RNA 按 Trizol 试剂盒说明书的步骤提取。每组取 4 μg 总 RNA 采用 Promega 公司一步法 Access RT-PCR 系统进行反应。反应体系为 25 μl AMV/Tfi 5 \times 反应缓冲液 5 μl dNTP 0.5 μl 上、下游引物各 0.5 μl AMV 反转录酶 0.5 μl Tfi DNA 聚合酶 0.5 μl RNA 样品 1 μl 25 mmol/L MgSO_4 1.5 μl 剩余用无核酶水补足。TLR4 引物序列: 正义为 5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG TGG T-3'; 反义为 5'-ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTT T-3'; 预计扩增长度为 356 bp。内参为甘油醛-3-磷

酸脱氢酶 (GAPDH) 引物序列: 正义为 5'-TCC GCC CCT TCC GCT GAT G-3'; 反义为 5'-CAC GGA AGG CCA TGC CAG TGA-3'; 预计扩增长度为 340 bp。扩增条件: 95°C 变性 45 s 54°C 退火 45 s 72°C 延伸 1 min 循环 35 周期, 然后 72°C 延伸 2 min。取 2 μl 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中, 90 V 电泳 30 min。紫外灯下观察结果, 拍照并保存结果。Image J 图像分析软件对电泳条带进行半定量分析, TLR4 和 GAPDH 的光密度比值代表 mRNA 的相对表达水平。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据总体差异的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 OX- LDL 及 PD98059 对 VSMCs ERK1/2 磷酸化水平的影响 50 mg/L OX- LDL 刺激下 VSMCs 的 ERK1/2 磷酸化水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.05$)。予 40 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 预孵育 1 h 后, OX- LDL 诱导的 ERK1/2 磷酸化水平升高可部分抑制, 说明 PD98059 可以抑制 ERK1/2 磷酸化 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 OX- LDL 和 PD98059 作用下 ERK1/2 磷酸化水平变化 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-ERK/ERK
空白对照组	0.199 \pm 0.001
OX- LDL 组	0.944 \pm 0.008*
OX- LDL +PD98059 组	0.441 \pm 0.005 [#]

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 OX- LDL 组比较: [#] $P < 0.05$

2.2 OX- LDL 及 PD98059 对 VSMCs TLR4 mRNA 表达的影响 空白对照组 VSMCs 存在着 TLR4 mRNA 的基础表达; 加入 OX- LDL 处理 6 h 后, TLR4 mRNA 的表达明显上调 ($P < 0.05$)。预先加入 3 个浓度的 PD98059 预孵育 VSMCs 1 h 则 OX- LDL 诱导的 VSMCs TLR4 mRNA 表达上调可部分抑制, 并且随着 PD98059 浓度的升高抑制作用加强 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 OX-LDL及 PD98059对 VSMCs TLR4 mRNA 表达的影响 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组 别	MCP-1/GAPDH
空白对照组	0.253±0.017
OX-LDL组	1.325±0.030*
OX-LDL+PD98059 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.780±0.012 [#]
OX-LDL+PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.428±0.007 [#]
OX-LDL+PD98059 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.407±0.005 [#]

与空白对照组比较: * P<0.05; 与 OX-LDL组比较: [#] P<0.05

3 讨 论

AS是一种免疫炎症反应,而 TLR4介导的免疫细胞炎症反应过程把 AS形成中的脂代谢紊乱、自身免疫反应及慢性炎症过程连接到了一起^[4-5]。在 AS斑块中存在大量 OX-LDL。OX-LDL可通过 TLR4信号通路促进单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等的表达,以及大量的单核巨噬细胞和 T淋巴细胞向血管内皮迁移,聚集并沉积于内膜下摄取 OX-LDL,进一步促进动脉粥样硬化的形成。除此之外,TLR4还和 AS斑块的稳定性有关。有研究表明,颈动脉粥样斑块内皮细胞 TLR4的高表达预示着 AS患者斑块的不稳定^[6]。

OX-LDL可诱导多种血管壁细胞通过 TLR4通路介导 AS形成。血管平滑肌细胞致 AS主要通过促进炎症因子分泌和增殖来实现。Yang等^[7]利用低浓度大肠杆菌刺激人 VSMCs发现,TLR4信号途径能够促进 VSMCs转化为促炎表型,从而导致 VSMCs释放趋化因子、促炎细胞因子,在血管炎症及 AS的发生、发展过程中发挥重要作用。另一方面,VSMCs的异常增殖也是 AS形成的一个早期事件,可能是 AS形成的病因之一,多种刺激物都能引起 VSMCs的增殖,但是 Sasu等^[8]研究发现作用都是间接的,至少有一部分是通过 TLR4信号转导通路来实现的,使用 TLR4抑制剂能够削弱或阻止这些刺激物诱导的 VSMCs增殖。

研究发现,来源于人体冠状动脉的 VSMCs表达 mRNA编码 TLR4、TLR4联合分子 MD-2以及细胞表面分化抗原 CD14。多种因素均可上调 TLR4,如 LPS^[9]、血管紧张素 II 等^[10]。OX-LDL也可促进 TLR4的表达^[11],但其机制尚不明确。本实验中正常未经刺激的 VSMCs也有 TLR4 mRNA 的表达。加入 OX-LDL刺激后 VSMCs TLR4 mRNA 的表达明显提高。在此基础上应用 ERK1/2 阻断剂 PD98059

阻断 ERK1/2 信号转导通路,再用 OX-LDL 刺激 VSMCs TLR4 mRNA 的表达升高被部分抑制。由此证明 OX-LDL 通过 ERK1/2 诱导 VSMCs TLR4 mRNA 的表达。但是 PD98059 不能完全阻断 TLR4 mRNA 的表达,因此推测尚有其他信号转导通路促进 TLR4 mRNA 的表达,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Satoh M, Ishikawa Y, Minami Y, et al. Role of Toll like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease [J]. *Front Biosci* 2008, 13: 6708-6715.
- [2] Tobias P, Curtiss LK. Thematic review series: The immune system and atherogenesis: Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis [J]. *Lipid Res* 2005, 46 (3): 404-411.
- [3] Pasterkamp G, van Keulen JK, de Kleijn DPV. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease [J]. *Eur J Clin Invest* 2004, 34(5): 328-334.
- [4] Miller YI, Chang MK, Binder CJ, et al. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors [J]. *Curr Opin Lipidol* 2003, 14(5): 437-445.
- [5] Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake [J]. *Circ Res* 2009, 104(12): 1355-1363.
- [6] Katsargyris A, Theocharis SE, Tsioudas S, et al. Enhanced TLR4 endothelial cell immunohistochemical expression in symptomatic carotid atherosclerotic plaques [J]. *Expert Opin Ther Targets* 2010, 14(1): 1-10.
- [7] Yang X, Coriolan D, Murthy V, et al. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 289 (3): H1069-H1076.
- [8] Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, et al. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation [J]. *Circ Res* 2001, 89 (3): 244-250.
- [9] Heo SK, Yun HJ, Noh EK, et al. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production [J]. *Immunol Lett* 2008, 120(1-2): 57-64.
- [10] Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries [J]. *Heart Vessels* 2007, 22 (6): 416-422.
- [11] Pasini AF, Anselmi M, Gabini U, et al. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27 (9): 1991-1997.

收稿日期: 2009-12-03 修回日期: 2010-01-15

本文编辑: 吴进