

达格列净在 ox-LDL 诱导形成的 THP-1 源性泡沫细胞焦亡中的作用

龚才伟^{1,2}, 赵广建^{1,2}, 刘大男^{1,2}, 欧航君^{1,2}, 赵权威^{1,2}, 李 辉^{1,2}

摘要 目的 探讨达格列净(DAPA)在氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导形成的人髓系白血病单核细胞(THP-1)源性泡沫细胞焦亡中的作用。方法 通过 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞构建 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型。设置实验分组为:空白对照(NC)组、ox-LDL 组和药物干预(ox-LDL + DAPA)组;以油红 O 法检测巨噬细胞泡沫化水平;细胞增殖与毒性检测试剂盒(CCK-8)检测 DAPA 对泡沫细胞活力的影响;Hoechst 33342/PI 双染检测 THP-1 源性泡沫细胞焦亡;细胞免疫荧光双染检测 DAPA 对泡沫细胞焦亡中焦亡关键因子 Caspase-1 表达的影响;采用微量酶标法检测细胞培养基中乳酸脱氢酶(LDH)活性;采用 qRT-PCR 和 Western blot 分别检测核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、消皮素 D(GSDMD)、白细胞介素(IL)-18、IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平。结果 CCK-8 法检测结果提示 DAPA 的最佳干预浓度为 10 μ mol/L;油红 O 染色结果提示 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞焦亡模型构建成功;与 NC 组比较,ox-LDL 组中 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.05$),碘化丙啶(PI)阳性细胞数及 LDH 活性增加($P < 0.05$),Caspase-1 的荧光强度增强,细胞胞质内的红色脂滴增多;予 DAPA 干预后,ox-LDL + DAPA 组中前述焦亡相关因子的 mRNA 和蛋白表

达水平均降低(均 $P < 0.05$),PI 阳性细胞数及 LDH 活性降低($P < 0.05$),Caspase-1 的荧光强度减弱,细胞胞质内的红色脂滴减少($P < 0.05$)。结论 DAPA 对 ox-LDL 诱导形成的 THP-1 源性泡沫细胞焦亡具有抑制作用。

关键词 达格列净;人髓系白血病单核细胞;泡沫细胞;细胞焦亡;氧化低密度脂蛋白

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1366-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.020

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是动脉血管壁脂质聚积的慢性炎症性疾病^[1],严重危害人类健康,是心血管疾病致死、致残的主要病因。巨噬细胞是 AS 斑块的主要组成细胞,既能吞噬脂质形成泡沫细胞,又能分泌多种促炎细胞因子来维持局部炎症反应,进而导致斑块的不稳定^[2-3]。细胞焦亡是一种与炎症相关的新型程序性细胞死亡,最初发现于巨噬细胞,其发生机制主要分为依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(cystein-containing aspartate-specific protease, Caspase)-1 的经典途径和依赖于 Caspase-4/5/11 的非经典途径^[4]。研究^[5]表明,细胞焦亡在 AS 的发生和发展中起重要作用。目前,临床上用于调脂、稳定斑块的抗 AS 药物主要是他汀类药物,其不良反应多,规律用药后仍难以有效终止 AS 的进展。研究^[6]证实,达格列净(dapagliflozin, DAPA)可减轻 AS、减少巨噬细胞的浸润,并增强斑块的稳定性,但其作用机制不明。该研究拟通过 ox-LDL 诱导 THP-1 源性巨噬细胞构建 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型,探讨 DAPA 对 THP-1 源性泡沫细胞焦亡的调控作用,为 DAPA 用于防治 AS 及

2023-06-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660083);贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2020]5014);贵州省高层次创新型人才培养计划项目(编号:黔科合人才[2015]4026号)

作者单位:¹贵州医科大学附属医院内科,贵阳 550004

²贵州医科大学医学科学研究所,贵阳 550004

作者简介:龚才伟,男,硕士研究生;

刘大男,女,教授,主任医师,硕士生、博士生导师,责任作者, E-mail: Liudanan2000@sina.com

mice in the PMPs group significantly increased ($P < 0.05$), and the permeability of intestinal mucosa increased. Compared with the DSS group, the experimental group mice had higher plasma FITC-D levels ($P < 0.05$) and more electron microscopic colonic epithelial damage. **Conclusion** PMPs induces NETs formation in mice, promotes colonic inflammation in mice, increases intestinal mucosal permeability and aggravates intestinal inflammation in mice with DSS colitis.

Key words inflammatory bowel disease; platelet microparticles; neutrophil extracellular trap; colitis; intestinal permeability

其相关疾病提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 人急性单核白血病细胞系 THP-1 细胞购于江苏齐氏生物科技有限公司。

1.1.2 实验主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基(产品代码:L210KJ)、胎牛血清(货号:S660JY)购于上海源培生物科技股份有限公司;人源氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL, 批号:YB-002)购于广州奕元公司;佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA, 批号:P8139)、达格列净(dapagliflozin, DAPA, 产品编号:SML2804)购于美国 Sigma 公司;细胞计数法-8(CCK-8)试剂盒购于上海东仁化学科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 货号:D8371)、Hoechst 33342/碘化丙啶(ropidium iodide, PI)、油红 O 试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;Millex-HV 0.45 μm PVDF 膜购于美国 Millipore 有限公司;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nod-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteine-containing aspartate-specific protease-1, Cleaved caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)、消皮素 D(gasdermin-D, GSDMD) 氮端片段(GSDMD-N)、白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-1 β 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司;GAPDH 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) 购于美国 Abcam 公司;NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 引物由通用生物(安徽)股份有限公司设计并合成;TRIzol RNA 提取试剂、RNA 逆转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒购自南京(诺唯赞)生物科技有限公司;倒置生物显微镜购于日本 Olympus 公司;多功能酶标仪购于美国 Thermo Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 THP-1 为悬浮细胞,将其置于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基的培养瓶中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中静置培养,待细胞密度为 $2 \times 10^8/\text{L} \sim 2 \times 10^9/\text{L}$ 时进行传代,传代至第 3 代后进行铺板,并进行后续药物干预实验。

1.2.2 THP-1 源性巨噬细胞的制备 取对数生长期的 THP-1 细胞加入含 160 nmol/L PMA、10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 诱导分化为 THP-1 源性巨噬细胞。

1.2.3 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型的构建 将获得的 THP-1 源性巨噬细胞更换新鲜的含有 160 nmol/L PMA、10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养液,加入终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ox-LDL,共同孵育 24 h,即可成功构建 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型用于后续实验。

1.2.4 药物干预和实验分组 将细胞密度调整为 $4 \times 10^6/\text{L}$ 铺于 6 孔板之后,使用 ox-LDL 或(和) DAPA 对 THP-1 源性巨噬细胞进行处理,并分为以下 3 组:① 空白对照(NC)组,正常 THP-1 细胞培养液培养 THP-1 源性巨噬细胞 24 h;② ox-LDL 组,采用终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ox-LDL 处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h;③ 药物干预(ox-LDL + DAPA)组,根据 1.2.6 项中 THP-1 源性巨噬细胞活性最好的 DAPA 浓度进行干预实验,用该浓度 DAPA 预处理 THP-1 源性巨噬细胞 2 h,再加入 ox-LDL(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)后培养细胞 24 h。

1.2.5 以油红 O 法检测 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化水平 泡沫细胞建模结束后,移除细胞培养基,用 PBS 洗 2 次,加油红 O 固定液固定 30 min;弃去固定液,用 PBS 洗 2 次;加入 60% 异丙醇浸洗 30 s;弃去 60% 异丙醇后加入新配制好的油红 O 染色液,浸染 20 min;弃去染色液,60% 异丙醇漂洗 30 s,PBS 洗 5 次;加入 Mayer 苏木精染色液,复染核 2 min;弃去染色液后 PBS 洗 5 次;加入油红 O 缓冲液 1 min 后,弃去油红 O 缓冲液;加入 PBS 液覆盖细胞并在显微镜下观察,细胞内脂质为红色,胞核为蓝色。

1.2.6 CCK-8 法检测 DAPA 对 THP-1 源性巨噬细胞活力的影响 将 DAPA 溶于 DMSO,THP-1 源性巨噬细胞调整浓度为细胞 4×10^5 个/ml 悬液,接种于 96 孔板中每孔 100 μl ,设 5 个复孔;分别加入 0.2% DMSO 和不同浓度的 DAPA(0、1、5、10、50、100、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 预处理 2 h,加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL 共孵育 24 h。每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl 培养 1~4 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测各组的吸光度(absorbance, A) 值,计算细胞活力 CV。CV = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。将浓度为 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ DAPA 组对应的 A 值设置为 100%,其余各组结果均以此为参考,用百分比表示,以未对细胞

产生明显毒性的最大浓度作为最佳浓度进行下一步的干预实验。

1.2.7 Hoechst 33342/PI 双染检测 THP-1 源性泡沫细胞焦亡 选择 6 孔板中生长密度为 80% ~ 90% THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型,使用 PBS 润洗后,依据 Hoechst 33342/PI 双染试剂盒说明书先后加入 1 ml 细胞染色缓冲液、5 μ l Hoechst 33342 染色液、5 μ l PI 染色液,混匀后冰上孵育 30 min,再用 PBS 洗涤 1 次,置于倒置荧光显微镜下检测荧光,Hoechst 33342 为蓝色,PI 为红色。

1.2.8 THP-1 源性泡沫细胞免疫荧光双染 DAPI (蓝色)和 Caspase-1 (绿色)双染用于评估 DAPA 对 THP-1 源性泡沫细胞焦亡中焦亡关键因子 Caspase-1 表达的影响。首先将 THP-1 细胞以 4×10^6 /L 密度铺于 6 孔板中,将其诱导为 THP-1 源性巨噬细胞,在焦亡诱导处理之后,用 PBS 轻轻润洗 3 次,每次 5 min;向每个孔中加入适量的 4% 多聚甲醛溶液,室温下固定 15 min;去掉固定液,加入 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;每个样本浸于 0.5% Triton X-100 破膜液中,室温孵育 15 min 进行通透处理;其次予 10% 山羊血清封闭 30 min 后,吸净封闭液后,每孔加入适量的 Caspase-1 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日滴加二抗,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 90 min,取出各组细胞爬片,然后用 DAPI 复染细胞核,避光室温孵育 10 min,最后封片和成像。

1.2.9 采用 LDH 释放实验检测 LDH 活性 LDH 活性能够有效地反映细胞膜的完整性与否,常用来评估细胞受损程度。根据 LDH 活性检测试剂盒的说明书制备细胞样本、标准品,并将制备的标本转移至 96 孔板中,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔 A 值并计算细胞中 LDH 的活性:LDH 活性 (%) = $(A_{\text{样品}} - A_{\text{对照孔}}) / (A_{\text{标准品}} - A_{\text{对照孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.10 Western blot 检测 NLRP3、Cleaved caspase-1、ASC、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 蛋白表达 收集培养的各組细胞,经 PBS 润洗后,加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,将裂解物转移至 1.5 ml EP 管,于 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 高速离心 10 min,取上清液,加入 4 倍体积的 5 \times Loading buffer,100 $^{\circ}$ C 条件下加热 10 min,后采用 BCA 法进行蛋白定量。取等量蛋白上样,经 SDS-PAGE 电泳分离,转膜至 PVDF 膜上后,采用 5% 脱脂牛奶室温下封闭目的条带 2 h,其次用 TBST 洗膜 3 次,10 min/次;然后分别加入 NLRP3、Cleaved caspase-1、ASC、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 单克隆抗体(1 : 1 000)或 GAPDH 一抗(1 : 10 000),4

$^{\circ}$ C 冰箱摇床孵育过夜,第 2 天用 TBST 洗膜 3 次,10 min/次,之后加入羊抗兔 IgG(1 : 10 000)室温摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,洗膜后 ECL 显影用凝胶图像处理器分析图像,GAPDH 作为内参照,目的蛋白与其灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.2.11 qRT-PCR 检测 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1 β mRNA 表达 用 TRIzol 试剂从细胞样本中提取总 RNA,并将其逆转录为 cDNA。使用 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒检测 qRT-PCR,检测前述焦亡功能因子和内参 GAPDH mRNA 的表达。以 GAPDH 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 mRNA 表达的相对倍数变化。每个样品的分析重复 3 次。本实验所用实时定量 PCR 目的基因引物序列如表 1 所示。

表 1 实时定量 PCR 目的基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
Caspase-1	F:AGAGGATTTCTTAACGGATGCA R:TCACAAGACCAGGCATATTCTT
NLRP3	F:GCCGTCTACGTCTTCTTCTTTCC R:CATCCGCAGCCAGTGAACAGAG
ASC	F:ACAATGACTGTGCTTAGAGACA R:CACAGCTCCAGACTCTTCTTTA
GSDMD	F:CTAGCTAAGGCTCTGGAGACAA R:GATTCCTTTTCATCCCAGCAGTC
IL-1 β	F:GATTCCTTTTCATCCCAGCAGTC R:TGTCGTTGCTTGGTTCTCTTGTAC
IL-18	F:AGACCTGGAATCAGACAACCTT R:TCAGTCATATCCTCGAACACAG
GAPDH	F:CACGATGGAGGGCCGGACTCATC R:CACGATGGAGGGCCGGACTCATC

1.3 统计学处理 应用 GraphPad Prism7 软件进行统计分析。实验结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。显著性水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1 巨噬细胞的诱导、分化 未经 PMA 诱导分化的 THP-1 单核细胞呈透亮圆形或类圆形状,悬浮状生长,细胞表面光滑,无伪足(图 1A)。加入 PMA 诱导分化 24 h 后则分化为人巨噬细胞,细胞由悬浮状态变为贴壁状态,细胞伸出伪足,呈不规则、贴壁状生长(图 1B)。

2.2 CCK-8 筛选 DAPA 的最佳干预浓度 THP-1 源性巨噬细胞经不同浓度的 DAPA 干预 24 h 后,结

果如图 2 所示,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,溶剂 DMSO (0.2% DMSO) 组细胞活性无显著变化;除 DAPA 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时 THP-1 源性巨噬细胞活性无显著性变化,其余组随着 DAPA 浓度升高,细胞活性出现下降趋势;其中,浓度为 50、100 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性减低 ($F = 31.67, P < 0.05$)。因此,10 $\mu\text{mol/L}$ DAPA 是不影响 THP-1 源性巨噬细胞活性的最大浓度,可作为 DAPA 的最佳干预浓度。

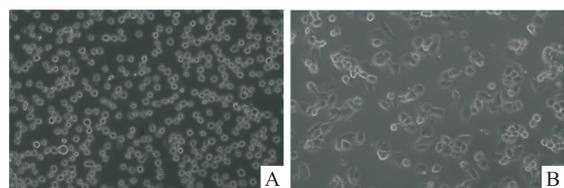


图 1 THP-1 分化为巨噬细胞 $\times 200$
A: THP-1 单核细胞; B: THP-1 源性巨噬细胞

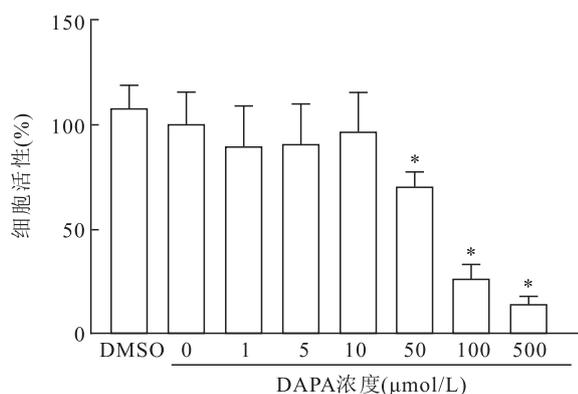


图 2 CCK-8 检测 DAPA 干预对 THP-1 源性巨噬细胞活性的影响
与 0 $\mu\text{mol/L}$ DAPA 组比较: * $P < 0.05$

2.3 油红 O 染色检测 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型的构建及 DAPA (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞泡沫化水平的影响 油红 O 染色结果显示,在 NC 组中,THP-1 源性巨噬细胞胞质内几乎没有或仅有少量脂质沉积,见图 3A;与 NC 组

比较,ox-LDL 组中 THP-1 源性巨噬细胞胞质内有显著增多、变大的亮红色脂滴呈典型泡沫细胞形态,说明 THP-1 源性泡沫细胞焦亡模型的构建成功,见图 3B;与 ox-LDL 组比较,ox-LDL + DAPA (10 $\mu\text{mol/L}$) 组中 THP-1 源性巨噬细胞胞质内红色脂滴显著减少、变小,提示泡沫细胞生成的数量明显减少,见图 3C。说明 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DAPA 可有效抑制由 ox-LDL 诱导的泡沫细胞的形成。

2.4 DAPA 对 ox-LDL 诱导形成的 THP-1 源性泡沫细胞焦亡的影响

2.4.1 qRT-PCR 检测 DAPA 对 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞焦亡相关蛋白 *NLRP3*、*Caspase-1*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18* 和 *IL-1 β* mRNA 的表达水平的影响 与 NC 组相比,ox-LDL 组 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞中焦亡相关蛋白 *NLRP3*、*Caspase-1*、*ASC*、*GSDMD*、*IL-18* 和 *IL-1 β* mRNA 的表达水平均升高 ($P < 0.05$),差异有统计学意义;与 ox-LDL 组相比,ox-LDL + DAPA 组 DAPA 处理后上述指标水平均降低 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 4。

2.4.2 Western blot 检测 DAPA 对 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞焦亡相关蛋白 *NLRP3*、Cleaved caspase-1、*ASC*、*GSDMD-N*、*IL-18* 和 *IL-1 β* 蛋白表达水平的影响 与 NC 组相比,ox-LDL 组 ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞中焦亡相关蛋白 *NLRP3*、Cleaved caspase-1、*ASC*、*GSDMD-N*、*IL-18* 和 *IL-1 β* 蛋白的表达水平均升高 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。与 ox-LDL 组相比,ox-LDL + DAPA 组 DAPA 处理后上述指标水平均降低 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 5。

2.4.3 Hoechst 33342/PI 双染和 LDH 释放试验评估 DAPA 对 THP-1 源性泡沫细胞焦亡的影响 Hoechst 33342/PI 双染结果及 LDH 释放试验显示,与 NC 组相比,ox-LDL 组中 THP-1 源性泡沫细胞 PI 阳性细胞比例升高且 LDH 活性升高 ($P < 0.05$);与

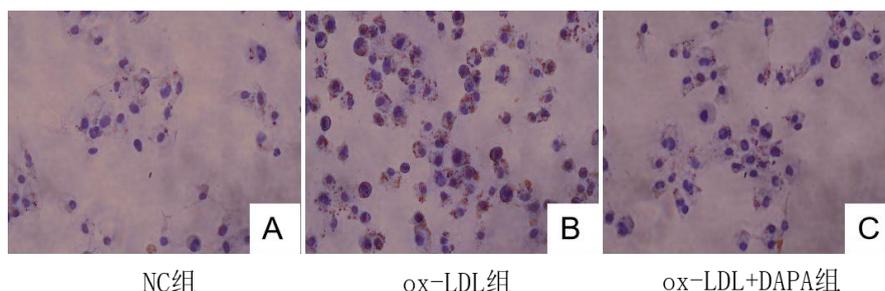


图 3 油红 O 染色检测泡沫细胞焦亡模型的构建及 DAPA 对泡沫细胞泡沫化水平的影响 $\times 400$

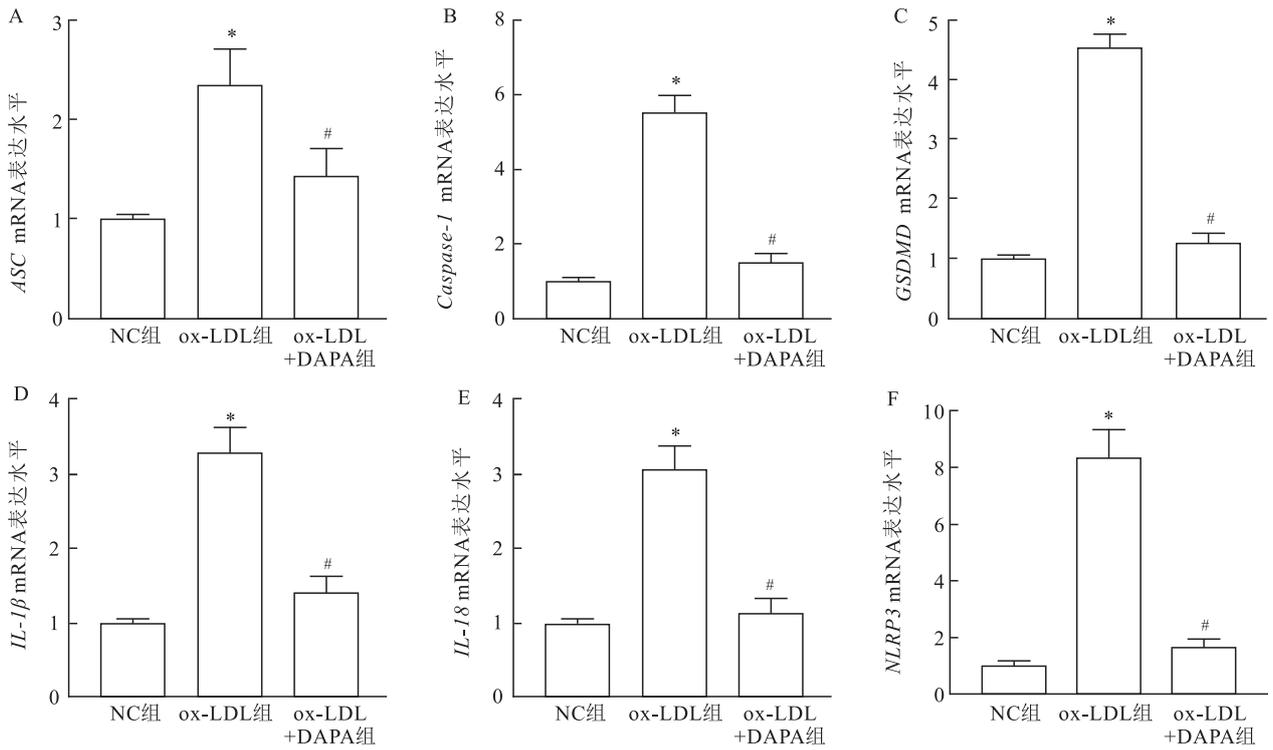


图4 DAPA 对各组中 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1β mRNA 表达水平的影响

A: ASC; B: Caspase-1; C: GSDMD; D: IL-1β; E: IL-18; F: NLRP3; 与 NC 组比较: * P < 0.05 (n = 3); 与 ox-LDL 组比较: # P < 0.05 (n = 3)

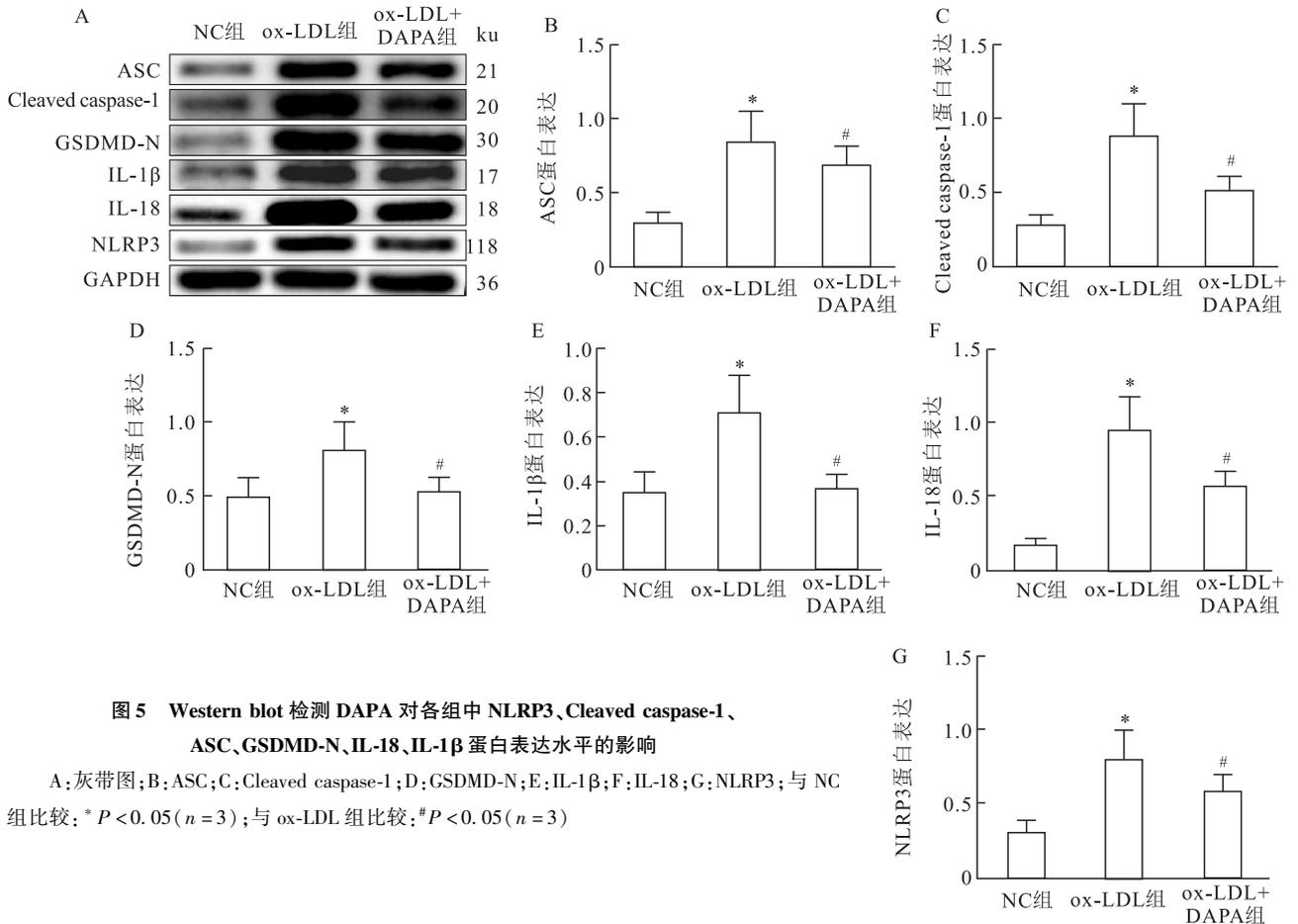


图5 Western blot 检测 DAPA 对各组中 NLRP3、Cleaved caspase-1、ASC、GSDMD-N、IL-18、IL-1β 蛋白表达水平的影响

A: 灰带图; B: ASC; C: Cleaved caspase-1; D: GSDMD-N; E: IL-1β; F: IL-18; G: NLRP3; 与 NC 组比较: * P < 0.05 (n = 3); 与 ox-LDL 组比较: # P < 0.05 (n = 3)

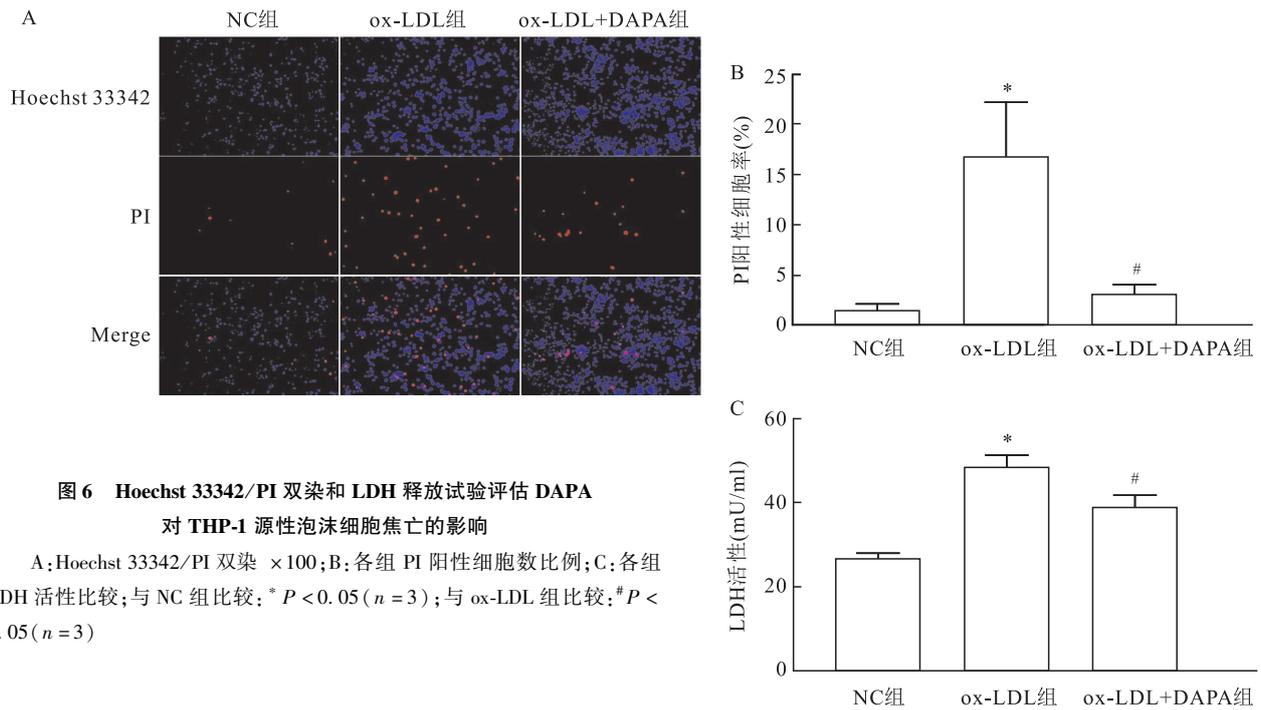


图6 Hoechst 33342/PI 双染和 LDH 释放试验评估 DAPA 对 THP-1 源性泡沫细胞焦亡的影响

A: Hoechst 33342/PI 双染 $\times 100$; B: 各组 PI 阳性细胞数比例; C: 各组 LDH 活性比较; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$ ($n = 3$); 与 ox-LDL 组比较: # $P < 0.05$ ($n = 3$)

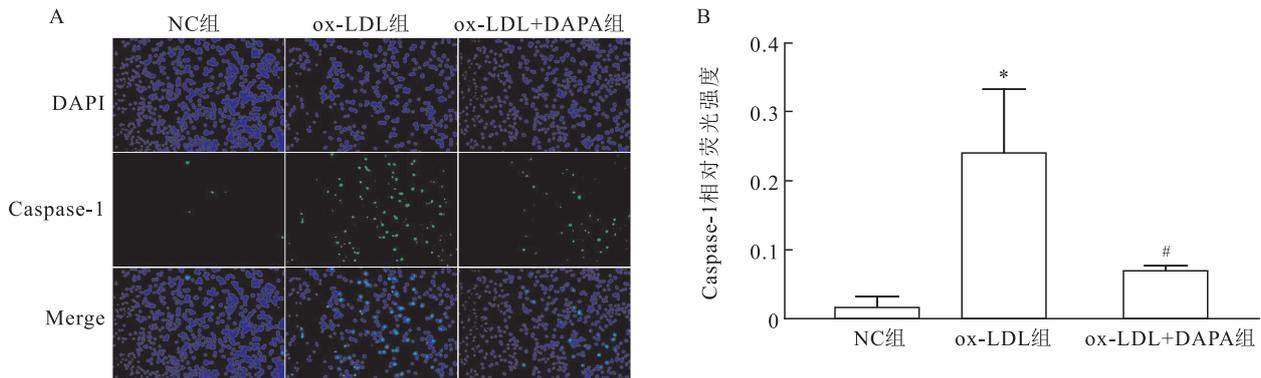


图7 细胞免疫荧光检测 DAPA 对泡沫细胞焦亡模型中 Caspase-1 表达的影响

A: Caspase-1 细胞免疫荧光双染 $\times 100$; B: 各组 Caspase-1 荧光强度; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$ ($n = 3$); 与 ox-LDL 组比较: # $P < 0.05$ ($n = 3$)

ox-LDL 组相比, ox-LDL + DAPA 组 THP-1 源性泡沫细胞 PI 阳性细胞比例降低 ($P < 0.05$) 且 LDH 活性降低。见图 6。

2.4.4 细胞免疫荧光检测 DAPA 对泡沫细胞焦亡模型中焦亡关键蛋白 Caspase-1 表达的影响 与 NC 组相比, ox-LDL 组 ox-LDL 诱导的泡沫细胞焦亡模型中 Caspase-1 荧光强度 (绿色) 明显增强 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, ox-LDL + DAPA 组 DAPA 处理后 Caspase-1 荧光强度减弱 ($P < 0.05$)。以上结果说明 DAPA 可抑制泡沫细胞焦亡模型中焦亡关键蛋白 Caspase-1 的表达。见图 7。

3 讨论

AS 是一种进行性病变, 是大多数心血管疾病的重要病理基础, 脂质代谢不平衡和不适宜的炎症反应共同参与了 AS 病变的进展, 其特征是大动脉中脂质和纤维成分的积聚。巨噬细胞浸润和脂质沉积是粥样斑块形成的关键步骤, 泡沫细胞的形成, 被广泛认为是 AS 的关键驱动因素^[3]。ox-LDL 是巨噬细胞泡沫化过程中胆固醇的主要来源, 血管内膜下的巨噬细胞吞噬大量 ox-LDL 转化为泡沫细胞, 促进 AS 斑块形成^[3]。在本研究中, THP-1 源性的巨噬细

胞用 ox-LDL 处理后,经油红 O 染色,结果如图 3B 所示,细胞胞质内有大量红色脂滴蓄积,细胞体积增大,符合泡沫细胞形态,表明 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型构建成功。

DAPA 是钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂(sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors, SGLT2i) 成员之一,其通过选择性地抑制 SGLT2 来减少肾小管对葡萄糖的重吸收和增加尿糖排出而降低血糖^[7]。有研究^[8]表明, SGLT2i 可通过降低血糖对内皮细胞的“毒性”而发挥抗炎症和抗氧化潜能进而延缓 AS。Terasaki et al^[9]发现 SGLT2i 可抑制巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,从而发挥抗 AS 的作用;在本研究中,以 DAPA 干预 ox-LDL 诱导的 THP-1 源性的巨噬细胞后得到了类似的结果:油红 O 染色结果显示,与 ox-LDL 组相比, DAPA 组巨噬细胞胞质内的红色脂滴明显减少,细胞体积减小。以上研究说明 DAPA 能够抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞形成。

巨噬细胞在 AS 病变中扮演着重要的角色,巨噬细胞中紊乱的脂质代谢是泡沫细胞产生的主要原因,这些脂质不能清除时,其可诱导巨噬细胞焦亡。细胞焦亡的主要特征之一为由 Caspase-1 下游的 GSDMD 家族蛋白介导细胞膜膜孔形成,造成细胞膜的完整性丧失、细胞肿胀、细胞溶解、细胞内的内容物和促炎细胞因子如 LDH、IL-18 和 IL-1 β 释放到细胞外。因此,检测上清液中的 LDH 活性可反应细胞的活性情况,检测细胞 IL-18 和 IL-1 β 的蛋白表达情况可反应炎症情况。既往多项研究^[10-11]表明, ox-LDL 和胆固醇晶体均能诱导巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的形成并激活 Caspase-1,刺激 IL-1 β 和 IL-18 的表达。Xu et al^[12]研究表明,在晚期的 AS 斑块中,巨噬细胞焦亡促进坏死核心的形成和斑块的不稳定,进而诱发急性心血管事件发生。在冠状 AS 斑块中, NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 表达明显增高^[13]。NLRP3 抑制剂可抑制 AS 小鼠中巨噬细胞焦亡,下调 AS 小鼠中巨噬细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达^[14]。因此,通过抑制巨噬细胞焦亡可能延缓 AS 的发生和发展。DAPA 是国内第一个上市的 SGLT2i 降糖药,研究^[15]表明, DAPA 能抑制糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠中 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达。Liu et al^[6]研究中提到, SGLT2i 可通过抑制血管炎症、减轻氧化应激和减少泡沫细胞形成等机制改善 AS 的进

展。在本研究中,通过 ox-LDL 刺激巨噬细胞后显示, THP-1 源性泡沫细胞中 NLRP3、Cleaved caspase-1、ASC、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β mRNA 和蛋白表达水平均明显升高, PI 阳性细胞数及 LDH 活性明显增加,予以 DAPA 干预后,上述焦亡相关蛋白的 mRNA 和蛋白表达水平、PI 阳性细胞数及 LDH 活性均被明显抑制;细胞免疫荧光结果显示, ox-LDL 刺激巨噬细胞后, Caspase-1 的荧光强度明显增强,予以 DAPA 干预后,荧光强度明显减弱。这些结果说明了 DAPA 抑制了 THP-1 源性泡沫细胞焦亡。

综上所述, DAPA 能有效抑制 NLRP3、Caspase-1、ASC、GSDMD、IL-18、IL-1 β 的表达,进而抑制了 THP-1 源性泡沫细胞焦亡,并能抑制泡沫细胞的形成。该研究仅从细胞层面验证了 DAPA 抑制泡沫细胞焦亡的作用,下一步拟进行动物实验研究,为 DAPA 用于防治 AS 提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] Libby P, Buring J E, Badimon L, et al. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [2] Bartlett B, Ludewick H P, Misra A, et al. Macrophages and T cells in atherosclerosis: a translational perspective [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 317(2): H375-86.
- [3] Barrett T J. Macrophages in atherosclerosis regression [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(1): 20-33.
- [4] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular diseases [J]. Clin Chim Acta, 2020, 510: 62-72.
- [5] 李洁, 李海霞, 阎春生, 等. 细胞焦亡与动脉粥样硬化相关性研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(2): 207-12.
- [6] Liu Z, Ma X, Ilyas I, et al. Impact of sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors on atherosclerosis: from pharmacology to pre-clinical and clinical therapeutics [J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4502-15.
- [7] Cowie M R, Fisher M. SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control [J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(12): 761-72.
- [8] Rahadian A, Fukuda D, Salim H M, et al. Canagliflozin prevents diabetes-induced vascular dysfunction in ApoE-deficient mice [J]. J Atheroscler Thromb, 2020, 27(11): 1141-51.
- [9] Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, et al. Amelioration of hyperglycemia with asodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice [J]. PLoS One, 2015, 10: e0143396.
- [10] Guo M, Yan R, Yao H, et al. IFN regulatory factor 1 mediates mac-

- rophage pyroptosis induced by oxidized low-density lipoprotein in patients with acute coronary syndrome [J]. *Mediators Inflamm*, 2019,2019;2917128.
- [11] Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, et al. NLRP3 inflammasome; its regulation and involvement in atherosclerosis [J]. *J Cell Physiol*, 2018233(3):2116–32.
- [12] Xu Y J, Zheng L, Hu Y W, et al. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018,476:28–37.
- [13] Afrasyab A, Qu P, Zhao Y, et al. Correlation of NLRP3 with severity and prognosis of coronary atherosclerosis in acute coronary syndrome patients [J]. *Heart Vessels*, 2016,31(8):1218–29.
- [14] Zeng W, Wu D, Sun Y, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages [J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):19305.
- [15] Leng W, Ouyang X, Lei X, et al. The SGLT-2 inhibitor dapagliflozin has a therapeutic effect on atherosclerosis in diabetic ApoE^{-/-} mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2016,2016:6305735.

The role of dapagliflozin in ox-LDL-triggered pyroptosis of THP-1-derived foam cells

Gong Caiwei^{1,2}, Zhao Guangjian^{1,2}, Liu Danan^{1,2}, Ou Hangjun^{1,2}, Zhao Quanwei^{1,2}, Li Hui^{1,2}
 (¹Dept of Cardiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004;
²Institute of Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the role of dapagliflozin (DAPA) in ox-LDL-induced pyroptosis of human myeloid leukemia monocytes (THP-1) derived foam cells. **Methods** THP-1-derived foam cell pyroptosis model was constructed by ox-LDL-induced THP-1 derived macrophages. The experimental groups were set as follows: the blank control group (NC), the ox-LDL group (ox-LDL), and the drug intervention group (ox-LDL + DAPA). Oil Red O staining was used to detect the foam cell levels of macrophages. The cell proliferation and toxicity assay kit was used to detect the effect of DAPA on foam cell viability. Hoechst 33342/propidium iodide (PI) double staining was used to detect THP-1 derived foam cell pyroptosis. Cell immunofluorescence double staining was used to detect the effect of DAPA on the expression of pyroptosis key factor Caspase-1 in foam cells. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the cell culture medium was detected using a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. qRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of Nod-like receptor pyrin domain containing 3 (*NLRP3*), cystein-containing aspartate-specific protease-1 (*Caspase-1*), apoptosis-associated-speck-like protein containing CARD (*ASC*), gasdermin-D (*GSDMD*), interleukin (*IL*)-18 and *IL-1β*, respectively. **Results** The CCK-8 assay indicated that the optimal intervention concentration of DAPA was 10 μmol/L. Oil Red O staining confirmed the successful construction of the THP-1-derived foam cell pyroptosis model. Compared with the blank control group, the expression levels of *NLRP3*, *Caspase-1*, *ASC*, *GSDMD*, *IL-18*, *IL-1β* mRNA and protein significantly increased in ox-LDL group ($P < 0.05$), as well as the number of PI-positive cells and LDH activity ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of Caspase-1 and the number of red lipid droplets in the cytoplasm of the cells. However, these effects were significantly reversed after DAPA intervention in the ox-LDL + DAPA group ($P < 0.05$). **Conclusion** DAPA inhibits ox-LDL-induced pyroptosis in THP-1-derived foam cells. **Key words** dapagliflozin; human myeloid leukemia monocytes; foam cells; pyroptosis; oxidized low-density lipoprotein