

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.06.007

文章编号: 1005-8982 (2024) 06-0038-08

实验研究·论著

IL-35 下调 CD36 表达减少巨噬细胞内脂质 积累缓解动脉粥样硬化的机制研究*

李晟¹, 茅光耀², 葛若木², 李凯园¹, 朱莉²

(1. 大连医科大学 研究生院, 辽宁 大连 116044; 2. 泰州市人民医院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 目的 分析冠状动脉粥样硬化性心脏病(CHD)患者血清白细胞介素-35(IL-35)水平与血脂四项的相关性, 探究IL-35抑制人髓系白血病单核细胞(THP-1)泡沫化机制。**方法** 选取2022年6月—2023年6月在泰州市人民医院就诊的疑似CHD患者154例, 分为对照组和CHD组, 空腹采血后用酶联免疫吸附试验检测两组血清IL-35水平, 分析与血脂四项的相关性。采用油红染色和胆固醇检测试剂盒对比IL-35刺激THP-1细胞前后细胞内胆固醇含量变化; Western blotting检测CD36、SR-A、Lox-1、p38、p-p38蛋白的表达; 实时荧光定量聚合酶链反应检测CD36、SR-A和Lox-1 mRNA的表达。**结果** CHD组血清IL-35水平低于对照组($P < 0.05$)。CHD患者血清IL-35水平与TC、LDL-C、TG呈负相关($r_s = -0.321$ 、 -0.218 和 -0.215 , $P = 0.003$ 、 0.044 和 0.047), 与HDL-C呈正相关($r_s = 0.322$, $P = 0.003$)。对照组与实验组THP-1细胞2、4、6、8和10 h的荧光强度(FI)比较, 结果: ①不同时间点FI比较, 差异有统计学意义($F = 726.726$, $P = 0.000$); ②实验组与对照组FI比较, 差异有统计学意义($F = 8.102$, $P = 0.012$), 实验组FI较低; ③两组FI变化趋势比较, 差异有统计学意义($F = 111.061$, $P = 0.000$)。oxLDL组和实验组CD36、SR-A、Lox-1蛋白和mRNA相对表达量均高于对照组和IL-35组($P < 0.05$), 实验组CD36蛋白和mRNA相对表达量低于oxLDL组($P < 0.05$)。oxLDL组和实验组p-p38/p38蛋白相对表达量均高于对照组和IL-35组($P < 0.05$), 实验组p-p38/p38蛋白相对表达量低于oxLDL组($P < 0.05$)。oxLDL组、实验组、P79350组CD36蛋白相对表达量均高于对照组($P < 0.05$), oxLDL组和P79350组CD36蛋白相对表达量均高于实验组($P < 0.05$)。**结论** CHD患者血清IL-35与血脂四项有相关性, IL-35可能通过抑制p38 MAPK信号通路介导巨噬细胞CD36表达下调, 减少细胞内脂质。

关键词: 冠状动脉粥样硬化性心脏病; 白细胞介素-35; 脂质代谢; 泡沫细胞

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

IL-35 alleviates atherosclerosis by reducing intramacrophage lipid accumulation via CD36 downregulation*

Li Sheng¹, Mao Guang-yao², Ge Ruo-mu², Li Kai-yuan¹, Zhu Li²

(1. Graduate School, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China; 2. Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Abstract: Objective To analyze the correlations between the serum level of interleukin-35 (IL-35) and levels of blood lipids in patients with coronary heart disease (CHD), and to investigate the mechanism underlying the inhibition of transformation from THP-1-derived macrophages into foam cells via IL-35. **Methods** The 154 patients with suspected CHD in Taizhou People's Hospital from June 2022 to June 2023 were enrolled and divided into the control group and the CHD group. The serum level of IL-35 in each group was determined by enzyme-linked

收稿日期: 2023-10-13

* 基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(No: 2021-MS-063)

[通信作者] 朱莉, E-mail: tzheart@126.com; Tel: 15805263696

immunosorbent assay (ELISA) in the condition of fasting, and its correlations with blood lipid profiles were analyzed. The change of the cholesterol content in THP-1 cells before and after IL-35 stimulation was determined by oil red O staining and the cholesterol detection kit. The protein expressions of CD36, SR-A, Lox-1, p38 and p-p38 were measured by Western blotting, and mRNA expressions of CD36, SR-A and Lox-1 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results** Compared with the control group, the serum level of IL-35 in the CHD group was lower ($P < 0.05$). The serum level of IL-35 in CHD patients was negatively correlated with levels of total cholesterol ($r_s = -0.321, P = 0.003$), low-density lipoprotein cholesterol ($r_s = -0.218, P = 0.044$) and triglyceride ($r_s = -0.215, P = 0.047$), and positively correlated with the level of high-density lipoprotein cholesterol ($r_s = 0.322, P = 0.003$). The FI of THP-1 cells in the control group and the experimental group at 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, and 10 h was compared, and the results indicated that FI was different among the time points ($F = 726.726, P = 0.000$) and between the groups ($F = 8.102, P = 0.012$), where FI in the experimental group was lower than that in the control group. Besides, the change trends of FI were different between the two groups ($F = 111.061, P = 0.000$). The protein and mRNA expressions of CD36, SR-A and Lox-1 in the oxLDL group and the experimental group were higher than those in the control group and the IL-35 group ($P < 0.05$). The protein and mRNA expressions of CD36 in the experimental group were lower than those in the oxLDL group ($P < 0.05$). The relative protein expression of p-p38 to that of p38 (p-p38/p38) in the oxLDL group and the experimental group was higher than that in the control group and the IL-35 group ($P < 0.05$), while p-p38/p38 in the experimental group was lower than that in the oxLDL group ($P < 0.05$). The relative protein expression of CD36 in the oxLDL group, experimental group and P79350 group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and that in the oxLDL group and the P79350 group was higher than that in the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusions** Serum IL-35 is correlated with the blood lipid profiles in CHD patients. Besides, IL-35 may mediate the downregulation of CD36 on macrophages and the decrease in intramacrophage lipid accumulation by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway.

Keywords: coronary heart disease; IL-35; lipid metabolism; foam cell

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary heart disease, CHD) 是一种由脂质引起的慢性炎症、纤维增生性疾病^[1]。动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是 CHD 的发病基础, 主要特征是血管内脂质的异常积聚和炎症反应的形成^[2-3]。研究表明, 人类白细胞分化抗原 36 (cluster of differentiation 36, CD36)、A 类清道夫受体 (scavenger receptor class A, SR-A) 和凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1 (low-density lipoprotein receptor-1, Lox-1) 等清道夫受体介导巨噬细胞吞噬氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL) 功能异常, 会导致泡沫细胞异常积聚, 与 AS 病变密切相关^[4-6]。

白细胞介素 -35 (Interleukin-35, IL-35) 是由 CD4⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞分泌的异二聚体细胞因子, 由 EB 病毒诱导基因 3 和 p35 2 个亚单位组成^[7-8]。IL-35 具有抗 AS 活性, CHD 患者血清 IL-35 水平显著下降, 并与 Gensini 积分和冠状动脉病变血管数呈负相关^[9-11]。外源性 IL-35 可增加 ApoE^{-/-} 小鼠 Treg 细胞水平, 缩小 AS 斑块尺寸^[12]。然而, IL-35 对 CD36、SR-A 和 Lox-1 等清道夫受体表达的影响, 以及脂质代谢的调节作用机制仍需进一步研究。本

研究旨在分析 CHD 患者血清 IL-35 水平与血脂四项的相关性, 分析 IL-35 对人髓系白血病单核细胞 (human myeloid leukemia mononuclear cells, THP-1) 源性巨噬细胞脂代谢的影响及对 p38 MAPK 信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2022 年 6 月—2023 年 6 月在泰州人民医院心内科就诊的疑似 CHD 患者。随机选取 154 例, 根据冠状动脉造影结果分为 CHD 组 (86 例) 和对照组 (68 例), 收集性别、年龄、身高、吸烟史、血压、左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、肌酸激酶 (creatinine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatinine kinase MB, CK-MB)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、血糖 (Glucose, GLU)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 等指标。排除标准: ①存在心肌病和瓣膜性心脏病; ②患有急性或慢性传染病和自身免疫性疾病; ③甲

状腺功能亢进或减退;④肝肾功能不全,消化、血液系统疾病;⑤使用汀类药物治疗>1周;⑥近期有手术或外伤史;⑦病历资料不完整。本研究经医院医学伦理委员会批准(批准号:KY202311401),所有研究对象签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器

THP-1 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司),特异性抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司),胆固醇检测试剂盒、油红染色试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司),NBD-胆固醇、IL-35、佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)(美国 R & D 公司),IL-35 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。荧光 PCR 仪(美国罗氏公司),酶标仪(美国 BioTek 公司)、荧光显微镜(德国徕卡公司)。

1.3 血液标本采集及 IL-35 测定

使用 EDTA 2K 抗凝管采集所有研究对象空腹状态静脉血,1 200 r/min 离心 10 min,吸取上清液于-80℃冰箱备用。按照试剂盒说明书进行操作测定 IL-35 水平。设置空白孔、标准品孔和样品孔,在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(optical density, OD),用标准品浓度与 OD 值拟合直线方程,再将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度。

1.4 THP-1 细胞制备及 IL-35 最适浓度的确定

THP-1 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 抗生素的 RPMI 1640 培养基中培养 1 周(37℃、5% 二氧化碳 CO₂),100 nmol/L PMA 处理 THP-1 细胞 48 h,使其分化为巨噬细胞。取巨噬细胞分为 4 组:①对照组:5 μmol/L DMSO 培养细胞 7 d;②oxLDL 组:5 μmol/L DMSO 培养细胞 7 d 后,50 μg/mL oxLDL 继续培养 48 h;③低剂量组:20 ng/mL IL-35 培养 7 d 后,50 μg/mL oxLDL 继续培养 48 h;④高剂量组:40 ng/mL IL-35 培养 7 d 后,50 μg/mL oxLDL 继续培养 48 h。

按照试剂盒说明书步骤对各组细胞进行油红染色,测定各组细胞内 TC、游离胆固醇(free cholesterol, FC)和胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)水平。根据染色和测定结果确定 IL-35 最适实验浓度。

1.5 NBD-胆固醇评估细胞内胆固醇的摄取

实验组用 IL-35 进行预处理,以未加药组为对

照组,于培养箱培养 7 d,加入 5 μmol/L NBD-胆固醇后 2、4、6、8 和 10 h 在免疫荧光显微镜下进行拍摄,荧光显微镜下观察细胞内 NBD-胆固醇呈深绿色。使用 RIPA 裂解细胞并收集裂解液,在 469 和 537 nm 波长处测定荧光强度(fluorescence intensity, FI)定量评估两组 NBD-胆固醇的摄取情况。

1.6 Western blotting 检测 CD36、SR-A、Lox-1、p38、p-p38 蛋白的表达

IL-35 组用 IL-35 预处理 7 d;以未加药组为对照组;实验组用 IL-35 预处理 7 d 后加入 50 μg/mL oxLDL 共培养 48 h;oxLDL 组用 5 μmol/L DMSO 培养 THP-1 细胞 7 d 后,50 μg/mL oxLDL 继续培养 48 h;P79350 组加入 P79350 预处理 24 h 后按实验组步骤处理。提取细胞蛋白,加入 Loading Buffer,95℃金属浴变性 5 min。采用 SDS-PAGE 电泳将蛋白分离,转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶密封 2 h。4℃条件下一抗孵育过夜后与二抗在室温下孵育 2 h,用化学发光法检测目的蛋白。使用 Image J 软件分析蛋白相对表达量。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应检测 CD36、SR-A 和 Lox-1 mRNA 的表达

细胞分组同 1.6。提取 THP-1 细胞总 RNA,取 500 ng 逆转录为 cDNA,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)反应体系:2 μL cDNA,正反向引物各 1 μL(10 μm),SYBR green 10 μL, H₂O 6 μL;反应条件:95℃预变性 3 s,95℃变性 30 s,60℃退火 1 min,共计 40 个循环,记录 Ct 值。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 CD36、SR-A 和 Lox-1 mRNA 相对表达量。引物由湖南艾瑞生物工程技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/bp
CD36	正向: 5'-CTTTGGCTTAATGAGACTGGGAC-3'	134
	反向: 5'-GCAACAAACATCACCACACCA-3'	
SR-A	正向: 5'-GCACTGGGATCACITTCACAA-3'	85
	反向: 5'-AGCTGTCATTGAGCGAGCATC-3'	
Lox-1	正向: 5'-TTGCCTGGGATTAGTAGTGACC-3'	81
	反向: 5'-GCTTGCTCTTGCTTAGGAGGT-3'	
β-actin	正向: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	175
	反向: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	

1.8 统计学方法

数据分析采用SPSS 25.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验或单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用LSD- t 检验;计数资料以构成比或率(%)表示,比较用 χ^2 检验;相关性分析用Spearman法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与CHD组临床资料比较

对照组与CHD组的年龄、吸烟史、体质量指数(body mass index, BMI)、TG、HDL-C、CK、CK-MB、CRP水平比较,经 χ^2 或 t 检验,差异均有统计学意义($P<0.05$);CHD组年龄、TG、CK、CK-MB、CRP水平均高于对照($P<0.05$),而HDL-C水平和BMI均低于对照组($P<0.05$)。对照组与CHD组的性别构成、高血压、高脂血症、SBP、DBP、GLU、TC、LDL-C、LVEF比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 对照组与CHD组临床资料比较

组别	n	男/女/例	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	吸烟史例(%)	高血压例(%)	高脂血症例(%)	BMI/(kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	SBP/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	DBP/(mmHg, $\bar{x}\pm s$)	GLU/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)
对照组	68	43/25	59.76 \pm 12.79	17(25.0)	28(41.2)	34(50.0)	29.24 \pm 31.5	128.03 \pm 16.98	80.62 \pm 9.57	5.77 \pm 1.84
CHD组	86	58/28	65.69 \pm 11.73	44(51.2)	37(43.0)	47(54.6)	24.65 \pm 4.45	132.25 \pm 19.35	79.16 \pm 14.18	5.96 \pm 1.8
χ^2/t 值		0.298	2.980	10.866	0.053	1.329	-1.377	1.844	-0.019	-0.089
P 值		0.585	0.030	0.001	0.818	0.249	0.037	0.067	0.985	0.916

组别	TC/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	TG/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	HDL-C/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	LDL-C/(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)	CK/(u/L, $\bar{x}\pm s$)	CK-MB/(u/L, $\bar{x}\pm s$)	LVEF/(%, $\bar{x}\pm s$)	CRP/(mg/L, $\bar{x}\pm s$)
对照组	4.31 \pm 0.96	1.36 \pm 0.75	1.21 \pm 0.32	2.66 \pm 0.64	87.64 \pm 38.45	10.97 \pm 9.66	64.13 \pm 6.98	3.64 \pm 7.77
CHD组	4.33 \pm 1.31	1.58 \pm 0.78	1.04 \pm 0.23	2.75 \pm 1.01	379.97 \pm 952.33	29.96 \pm 54.74	63.25 \pm 9.76	10.88 \pm 23.09
χ^2/t 值	1.666	2.805	-3.135	1.029	2.470	2.787	-1.205	2.683
P 值	0.504	0.015	0.005	0.939	0.049	0.000	0.524	0.000

2.2 CHD组与对照组血清IL-35水平比较及与血脂四项的相关性

CHD组、对照组血清IL-35水平分别为(42.76 \pm 13.79)、(109.45 \pm 28.87)pg/mL,经 t 检验,差异有统计学意义($t=-17.805$, $P=0.000$);CHD组血清IL-35水平低于对照组。

Spearman相关性分析结果表明,CHD患者血清IL-35水平与TC、LDL-C、TG均呈负相关($r_s=-0.321$ 、 -0.218 和 -0.215 , $P=0.003$ 、 0.044 和 0.047),与

HDL-C呈正相关($r_s=0.322$, $P=0.003$)。

2.3 各组油红染色结果和细胞内胆固醇水平比较

油红染色结果显示对照组THP-1细胞内无红染,oxLDL组细胞内脂滴增多,红染加重。低剂量组与oxLDL组比较,细胞内红染面积无显著变化。高剂量组与oxLDL组和低剂量组比较,细胞内脂滴明显减少,红染减轻。见图1。

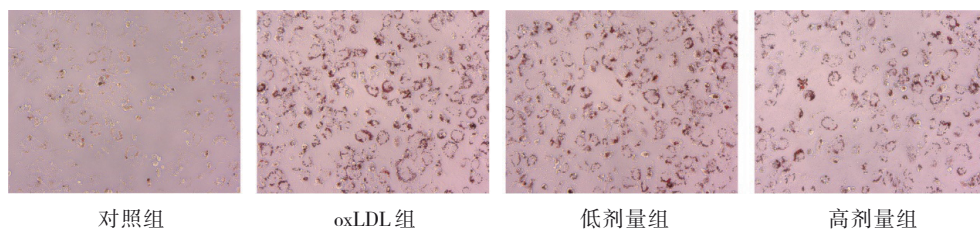


图1 各组THP-1细胞油红染色($\times 200$)

对照组、oxLDL 组、低剂量组、高剂量组 THP-1 细胞内 TC、FC、CE 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,oxLDL 组 TC、FC、CE 均升高($P < 0.05$);与低剂量组比较,高剂量组 TC、FC、CE 均降低($P < 0.05$)。40 ng/mL IL-35 能有效减少泡沫细胞的形成和脂质的积聚,故将此浓度作为后续实验使用浓度。见表 3。

2.4 对照组与实验组 THP-1 细胞对 NBD-胆固醇的摄取

实验组与对照组 THP-1 细胞内 NBD-胆固醇随着时间增加逐渐增加。在各时间点,实验组与对照组比较,细胞内 NBD-胆固醇含量均明显减少。见图 2。

对照组与实验组 THP-1 细胞 2、4、6、8 和 10 h 的 FI 比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点 FI 比较,差异有统计学意义($F = 726.726, P =$

表 3 各组 THP-1 细胞内 TC、FC、CE 水平比较
($\mu\text{mol/mgprot}, \bar{x} \pm s$)

组别	TC	FC	CE
对照组	5.42 ± 0.16	1.50 ± 0.16	3.92 ± 0.26
oxLDL 组	35.94 ± 2.5 ^①	8.84 ± 0.16 ^①	27.10 ± 2.64 ^①
低剂量组	32.00 ± 3.08 ^①	8.00 ± 1.03 ^①	24.00 ± 2.26 ^①
高剂量组	13.71 ± 0.61 ^{①②③}	4.68 ± 1.29 ^{①②③}	9.03 ± 0.7 ^{①②③}
F 值	158.100	13.670	161.000
P 值	0.000	0.002	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与 oxLDL 组比较, $P < 0.05$;③与低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

0.000);②实验组与对照组 FI 比较,差异有统计学意义($F = 8.102, P = 0.012$),实验组 FI 较低;③两组 FI 变化趋势比较,差异有统计学意义($F = 111.061, P = 0.000$)。见表 4。

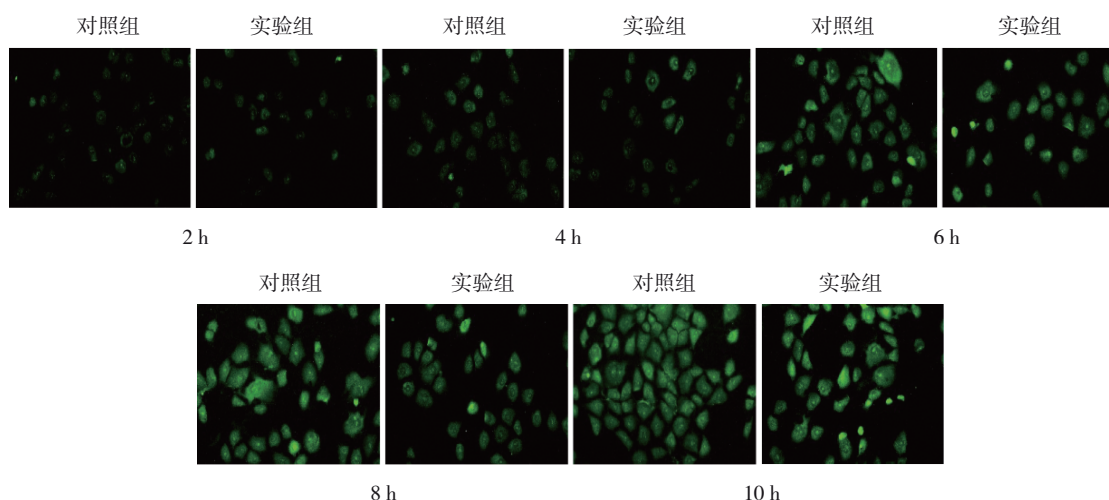


图 2 对照组与实验组 THP-1 细胞对 NBD-胆固醇的摄取 ($\times 200$)

表 4 对照组与实验组 THP-1 细胞不同时间点 FI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
对照组	1 536.7 ± 143.3	3 207.0 ± 149.3	4 665.0 ± 127.9	5 048.3 ± 310.2	5 092.7 ± 152.9
实验组	967.7 ± 83.0	2 035.0 ± 88.3	3 421.3 ± 100.1	3 791.0 ± 182.7	3 863.3 ± 232.7

2.5 各组 THP-1 细胞 CD36、SR-A 和 Lox-1 蛋白相对表达量比较

对照组、IL-35 组、oxLDL 组、实验组 THP-1 细胞 CD36、SR-A 和 Lox-1 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);oxLDL 组和实验组 CD36、SR-A、Lox-1 蛋白相对表达量均高于对照组和 IL-35 组($P < 0.05$),实验组 CD36 蛋白相对表

达量低于 oxLDL 组($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

2.6 各组 THP-1 细胞 CD36、SR-A 和 Lox-1 mRNA 相对表达量比较

对照组、IL-35 组、oxLDL 组、实验组 THP-1 细胞 CD36、SR-A 和 Lox-1 mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$);oxLDL 组和实验组 CD36、SR-A Lox-1 mRNA 相对表达量均高于

表 5 各组 THP-1 细胞 CD36、SR-A 和 Lox-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD36 蛋白	SR-A 蛋白	Lox-1 蛋白
对照组	0.63 ± 0.09	0.40 ± 0.02	0.65 ± 0.01
IL-35 组	0.40 ± 0.02 ^①	0.50 ± 0.03	0.76 ± 0.12
oxLDL 组	1.29 ± 0.14 ^{①②}	1.18 ± 0.13 ^{①②}	1.17 ± 0.19 ^{①②}
实验组	1.08 ± 0.09 ^{①②③}	0.99 ± 0.11 ^{①②}	1.01 ± 0.09 ^{①②}
F 值	113.800	56.840	11.270
P 值	0.000	0.000	0.003

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 IL-35 组比较, $P < 0.05$; ③与 oxLDL 组比较, $P < 0.05$ 。

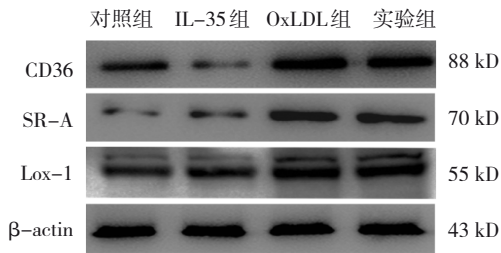


图 3 各组 THP-1 细胞 CD36、SR-A、Lox-1 蛋白的表达量

对照组和 IL-35 组 ($P < 0.05$), 实验组 CD36 mRNA 相对表达量低于 oxLDL 组 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组 THP-1 细胞 CD36、SR-A、Lox-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD36 mRNA	SR-A mRNA	Lox-1 mRNA
对照组	1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.39	1.00 ± 0.05
IL-35 组	0.81 ± 0.07 ^①	0.89 ± 0.35	0.93 ± 0.05
oxLDL 组	1.88 ± 0.09 ^{①②}	3.02 ± 0.65 ^{①②}	3.27 ± 0.21 ^{①②}
实验组	1.50 ± 0.05 ^{①②③}	2.66 ± 0.35 ^{①②}	3.19 ± 0.28 ^{①②}
F 值	161.200	17.270	159.800
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 IL-35 组比较, $P < 0.05$; ③与 oxLDL 组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 各组 THP-1 细胞 p-p38/p38 蛋白相对表达量比较

对照组、IL-35 组、oxLDL 组、实验组 THP-1 细胞 p-p38/p38 蛋白相对表达量分别为 (0.23 ± 0.06)、(0.23 ± 0.07)、(1.48 ± 0.2)、(0.91 ± 0.11), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 74.000, P = 0.000$); oxLDL 组和实验组 p-p38/p38 蛋白相对表达量均高于对照组和 IL-35 组 ($P < 0.05$), 实验组 p-p38/p38 蛋白相对表达量低于 oxLDL 组 ($P < 0.05$)。见图 4。

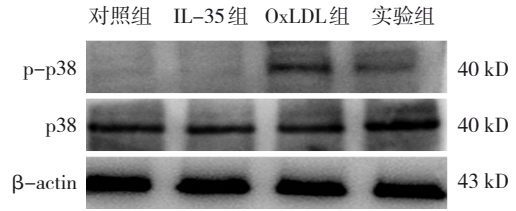


图 4 各 THP-1 细胞 p-p38/p38 蛋白的表达

2.8 各组 THP-1 细胞 CD36 蛋白相对表达量比较

对照组、oxLDL 组、实验组、P79350 组 THP-1 细胞 CD36 蛋白相对表达量分别为 (0.63 ± 0.09)、(1.29 ± 0.14)、(1.08 ± 0.09)、(1.17 ± 0.11), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 35.090, P = 0.000$); oxLDL 组、实验组、P79350 组 CD36 蛋白相对表达量均高于对照组 ($P < 0.05$), oxLDL 组和 P79350 组 CD36 蛋白相对表达量均高于实验组 ($P < 0.05$)。见图 5。

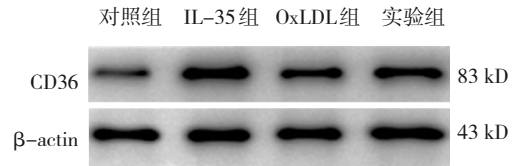


图 5 各组 THP-1 细胞 CD36 蛋白的表达

3 讨论

AS 是 CHD 患者最基本的病理变化, 主要特点是动脉壁脂质的积累和炎症的发展。AS 病变发展的早期阶段被称为“脂肪条纹”, 其特征是泡沫细胞在细胞内积聚脂质^[13-14], 研究表明, 白细胞介素-12 (Interleukin-12, IL-12) 家族因子与急性心肌梗死、主动脉夹层、心肌肥厚等多种心血管疾病密切相关^[15-17], 在 AS 的发生、发展过程和泡沫细胞的形成中发挥重要作用^[18], IL-35 为 IL-12 家族一员, 可作为抗炎因子参与自身免疫性炎症疾病, 如狼疮性肾炎、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮的发生、发展^[19-21]。最近研究显示, IL-35 高表达可以延缓动脉粥样硬化的发展, 调节脂代谢相关蛋白基因或非编码 RNA 的表达^[22-24]。本研究首先通过分析 CHD 患者血清 IL-35 水平与血脂四项的相关性, 发现 CHD 患者血清 IL-35 水平与 HDL-C 呈正相关, 与 TC、TG、LDL-C 均呈负相关。

本研究通过油红染色和 THP-1 内胆固醇检测明确 IL-35 对泡沫细胞的形成有抑制作用, 同时发现 40 ng/mL IL-35 能有效抑制 THP-1 细胞内脂质积

聚,故将 40 ng/mL 作为本实验的使用浓度。脂质的摄取是泡沫细胞形成的重要环节,THP-1 细胞对脂质的摄取主要由清道夫受体 CD36、SR-A 和 Lox-1 介导。本研究通过 NBD-胆固醇摄取实验来测定不同时间点实验组与对照组细胞 FI,结果显示在相同时间点,实验组细胞 FI 明显低于对照组。Western blotting 和 qRT-PCR 检测与脂质摄取相关的清道夫受体(CD36、SR-A 和 Lox-1)蛋白和 mRNA 的表达发现,IL-35 显著降低了 oxLDL 诱导的 CD36 蛋白和 mRNA 表达,而 SR-A 和 Lox-1 的表达无显著变化,提示 IL-35 可能是通过下调清道夫受体 CD36 的表达来抑制 THP-1 细胞对脂质的摄取。

p38 MAPK 信号传导在多种生物过程中起重要作用,例如炎症、细胞周期调节、细胞死亡、发育、分化和衰老^[25-27]。既往研究表明 p38 MAPK 通路 AS、心脏重构、心肌肥大和纤维化密切相关,是心血管疾病的 治疗靶点^[28-30]。本研究发现 oxLDL 处理 THP-1 细胞 48 h 后,细胞 p38 总蛋白无显著变化,而 p-p38/p38 表达上调,而经 IL-35 预处理 7 d 后 p-p38/p38 表达下调,提示 p38 磷酸化水平被 IL-35 抑制。添加 P79350 作为 p38 MPK 通路激动剂进行预处理后,P79350 逆转了 IL-35 对 oxLDL 诱导的细胞所表现出的作用,CD36 的表达显著升高。因此,推测 IL-35 可能使 p38 MAPK 信号通路失活,降低 p38 的磷酸化水平,从而抑制清道夫受体 CD36 的表达,最终抑制 THP-1 细胞对脂质的摄取和泡沫细胞的形成。

综上所述,本研究验证了 CHD 患者血清 IL-35 水平与血脂四项有相关性。体外实验验证 IL-35 通过下调清道夫受体 CD36 的表达从而减少 THP-1 细胞对脂质的积聚和泡沫细胞的形成,可能与 IL-35 下调 p38 MAPK 信号通路有关。本课题组仅在细胞水平验证 IL-35 对 THP-1 细胞的影响,IL-35 在动物模型上是否存在相同的机制,仍需进一步探索。

参 考 文 献 :

- [1] SHAYA G E, LEUCKER T M, JONES S R, et al. Coronary heart disease risk: low-density lipoprotein and beyond[J]. Trends Cardiovasc Med, 2022, 32(4): 181-194.
- [2] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 131.
- [3] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.
- [4] XIA X H, XU Q, LIU M K, et al. Deubiquitination of CD36 by UCHL1 promotes foam cell formation[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 636.
- [5] AKHMEDOV A, SAWAMURA T, CHEN C H, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (Lox-1): a crucial driver of atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Eur Heart J, 2021, 42(18): 1797-1807.
- [6] LIU X, GUO J W, LIN X C, et al. Macrophage NFATc3 prevents foam cell formation and atherosclerosis: evidence and mechanisms[J]. Eur Heart J, 2021, 42(47): 4847-4861.
- [7] YE C, YANO H, WORKMAN C J, et al. Interleukin-35: structure, function and its impact on Immune-Related diseases[J]. J Interferon Cytokine Res, 2021, 41(11): 391-406.
- [8] MIRLEKAR B, PYLAYEVA-GUPTA Y. IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(2): 167.
- [9] RASA F, NADERI N, EFTEKHAR E, et al. Vitamin D status in coronary artery disease: association with IL-35 and TGF- β 1 and disease severity[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2018, 18(5): 522-529.
- [10] 任家孚,阿荣,于丹丹,等.白介素-35、转化生长因子- β 1 与冠心病的相关性分析及诊断价值[J]. 2022, 41(8): 870-875.
- [11] 于丹丹,阿荣. CHD 发生发展中炎症因子 TGF- β 1、IL-35 作用的研究进展[J]. 2021, 61(7): 92-95.
- [12] SHAO Y, YANG W Y, SAAOUD F, et al. IL-35 promotes CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and inhibits atherosclerosis via maintaining CCR5-amplified Treg-suppressive mechanisms[J]. JCI insight, 2021, 6(19): e152511.
- [13] GUSEV E, SARAPULTSEV A. Atherosclerosis and inflammation: insights from the theory of general pathological processes[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7910.
- [14] LIU J, DONG S X, RU Y X. A review: pathological and molecular biological study on atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2022, 531: 217-222.
- [15] LIU S, WANG C Y, GUO J Z, et al. Serum cytokines predict the severity of coronary artery disease without acute myocardial infarction[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 896810.
- [16] YE J, WANG Y, WANG Z, et al. Roles and mechanisms of interleukin-12 family members in cardiovascular diseases: opportunities and challenges[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 129.
- [17] JIA D L, JIANG H, WENG X Y, et al. Interleukin-35 promotes macrophage survival and improves wound healing after myocardial infarction in mice[J]. Circ Res, 2019, 124(9): 1323-1336.
- [18] HAYBAR H, BANDAR B, TORFI E, et al. Cytokines and their role in cardiovascular diseases[J]. Cytokine, 2023, 169: 156261.
- [19] NASSIF M A. Urine and serum interleukin 35 as potential biomarkers of lupus nephritis[J]. Cent Eur J Immunol, 2021, 46(3): 351-359.
- [20] XIN P L, JIE L F, CHENG Q, et al. Pathogenesis and function of interleukin-35 in rheumatoid arthritis[J]. Front Pharmacol, 2021,

- 12: 655114.
- [21] XIONG H, TANG Z Q, XU Y, et al. CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ B cell and interleukin 35 as potential biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus patients[J]. *Adv Rheumatol*, 2022, 62(1): 48.
- [22] BHANSALI S, YADAV A K, BAKSHI C, et al. Interleukin-35 mitigates ox-LDL-induced proatherogenic effects via modulating miRNAs associated with coronary artery disease (CAD) [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023, 37(4): 667-682.
- [23] LI Y X, YAO L T, LU J. IL-35 inhibits adipogenesis via PPAR γ -Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting Axin2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122: 110615.
- [24] LI Y X, WANG X F, LU J. Interleukin-35 promote osteogenesis and inhibit adipogenesis: role of Wnt/ β -Catenin and PPAR γ signaling pathways[J]. *Inflammation*, 2023, 46(2): 522-533.
- [25] SANZ-EZQUERRO J J, CUENDA A. p38 signalling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1003.
- [26] TAN C, GINZBERG M B, WEBSTER R, et al. Cell size homeostasis is maintained by CDK4-dependent activation of p38 MAPK[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(12): 1756-1769.e7.
- [27] WHITAKER R H, COOK J G. Stress relief techniques: p38 MAPK determines the balance of cell cycle and apoptosis pathways[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1444.
- [28] ROMERO-BECERRA R, SANTAMANS A M, FOLGUEIRA C, et al. p38 MAPK pathway in the heart: new insights in health and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7412.
- [29] YIN H L, LI P C, HU F D, et al. [Retracted] IL-33 attenuates cardiac remodeling following myocardial infarction via inhibition of the p38 MAPK and NF- κ B pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(6): 352.
- [30] REUSTLE A, TORZEWSKI M. Role of p38 MAPK in atherosclerosis and aortic valve sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3761.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 李晟, 茅光耀, 葛若木, 等. IL-35 下调 CD36 表达减少巨噬细胞内脂质积累缓解动脉粥样硬化的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(6): 38-45.

Cite this article as: LI S, MAO G Y, GE R M, et al. IL-35 alleviates atherosclerosis by reducing intramacrophage lipid accumulation via CD36 downregulation[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(6): 38-45.