

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.23.001

文章编号: 1005-8982(2020)23-0001-05

基础研究·论著

真核起始因子4E对小鼠动脉粥样硬化发生、发展的炎症调节作用*

鲜雪梅¹, 毕颖超¹, 王珍珍², 门燕娟¹, 常佳佳¹,
陈全刚¹, 韩旭峰¹, 郑葵阳³, 陈仁金¹

(1. 徐州医科大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221000; 2. 徐州医科大学 肿瘤生物治疗研究所, 江苏 徐州 221006; 3. 徐州医科大学 基础医学院, 江苏 徐州 221000)

摘要: 目的 探讨真核起始因子4E(eIF4E)在小鼠动脉粥样硬化发生、发展过程中的炎症调节作用。**方法** 分别用200 ng/ μ l脂多糖(LPS)和20 ng/ μ l白细胞介素-4(IL-4)诱导RAW264.7细胞12 h后提取mRNA, 24 h后提取蛋白, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测eIF4E mRNA和蛋白在M1型和M2型巨噬细胞中的表达变化。复制ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠模型, 检测小鼠腹主动脉eIF4E mRNA和蛋白表达变化; 组织免疫荧光检测eIF4E在主动脉根部中分别与M1型和M2型巨噬细胞中的共表达。**结果** M1型巨噬细胞eIF4E mRNA和蛋白表达高于M2型巨噬细胞($P < 0.05$)。在ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型中, ApoE^{-/-}小鼠腹主动脉eIF4E mRNA和蛋白表达高于C57BL/6J小鼠($P < 0.05$); eIF4E与CD86的共定位表达高于eIF4E与CD206的共定位表达。**结论** eIF4E在动脉粥样硬化的发展过程中主要在M1型巨噬细胞中起作用, 进而对动脉粥样硬化产生影响。

关键词: 动脉粥样硬化; 真核起始因子4E; M1型巨噬细胞; M2型巨噬细胞

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

Inflammatory regulation of eukaryotic initiation factor 4E in the process of mice atherosclerosis*

Xue-mei Xian¹, Ying-chao Bi¹, Zhen-zhen Wang², Yan-juan Men¹, Jia-jia Chang¹,
Quan-gang Chen¹, Xu-feng Han¹, Kui-yang Zheng³, Ren-jin Chen¹

(1. College of Life Sciences, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China; 2. Institute of Cancer Biotherapy, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006, China; 3. College of Basic Medical Science, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: Objective To investigate the inflammatory regulation of eIF4E during the development of atherosclerosis in mice. **Methods** Cell experiments: RAW264.7 cells were induced by 200 ng/ μ l lipopolysaccharide (LPS) and 20 ng/ μ l interleukin 4 (IL-4) respectively. Relative mRNA was extracted 12 hours later and protein was extracted 24 hours later. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the expression levels of eIF4E mRNA and protein in M1 and M2 macrophages. Animal experiments: ApoE^{-/-} atherosclerosis mouse model was constructed. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the expression level of eIF4E mRNA and protein in abdominal aorta of mice. Tissue immunofluorescence was used to detect the expression of eIF4E in M1 and M2 macrophages in aortic

收稿日期: 2020-06-12

* 基金项目: 中国博士后基金(No: 2016M590506); 江苏省博士后基金(No: 1501010B); 徐州市社会发展项目(No: KC17090)
[通信作者] 陈仁金, E-mail: crj@xzhmu.edu.cn

sinus. **Results** The expressions of eIF4E mRNA and protein in M1 macrophages were higher than those in M2 macrophages ($P < 0.05$). The expressions of eIF4E mRNA and protein in the ApoE^{-/-} mice abdominal aorta were higher than those in the C57BL/6J control group ($P < 0.05$); the co-localization expressions of eIF4E and CD86 were higher than those of eIF4E and CD206. **Conclusion** eIF4E plays a major role in M1 macrophages and then affects the development of atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis; eukaryotic initiation factor-4e; M1 macrophages; M2 macrophages

动脉粥样硬化是一种对危害人类健康的慢性炎症性疾病,也是引起老年人死亡的最普遍的原因之一^[1]。其特征在于动脉斑块中胆固醇充盈巨噬细胞的持续存在^[2-6]。巨噬细胞是斑块中最丰富的炎症细胞类型。在病变中,巨噬细胞感知来自其微环境的信号(例如细胞因子或修饰的脂蛋白)发生表型极化^[7-9],这是一个随时间变化的动态过程,通过改变自身表型,根据环境信号产生促炎和抗炎作用^[10]。真核起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) 在蛋白正常合成的起始阶段起重要的调控作用^[11-13],在正常情况下低表达,而在多种癌症中发生变化^[14]。其对细胞的生长、发育、癌症及神经生物学有巨大影响^[15]。eIF4E 翻译效率的选择性变化直接导致巨噬细胞分化和活化^[16-17]。目前,eIF4E 的表达对动脉粥样硬化中的影响很少报道。本文采用分子生物学及免疫组织化学法检测 eIF4E 在动脉粥样硬化斑块中的表达,以探讨其在动脉粥样硬化过程中的炎症调节作用,为治疗动脉粥样硬化提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6 ~ 8 周遗传背景相同的雄性载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠 (购自南京模式动物中心) 和 C57BL/6J 小鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 各 18 只,饲养于徐州医科大学实验动物中心,饲养环境符合 SPF 要求。

1.2 试剂与仪器

RAW264.7 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,eIF4E 抗体 (小鼠源) 购自圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司,Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒和 TB Green[™] Premix Ex Taq[™] 购自大连 TaRaKa 公司,考马斯亮蓝试剂购自江苏凯基生物有限公司,CD206 (兔源)、CD86 (兔源) 购自 Proteintech 公司 (武汉),Alexa Fluor 488 (抗鼠)、Alexa Fluor 594 (抗兔) 购自徐州微科曼得生物工程有限公司。倒置荧光显微镜 IX73 购自日本奥林巴斯公司,

Leica 冷冻切片机构自德国徕卡公司,电泳仪和凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司, Centrifuge 5804R 超低温台式离心机购自德国 Eppendorf 公司, Light Cycler[®] 480 II 实时荧光定量 PCR 仪购自罗氏诊断产品 (上海) 有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及处理 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的无菌 DMEM 培养基置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养。根据细胞生长状态传代并更换新鲜 DMEM 完全培养基。调整细胞密度并按每孔约 1×10^6 个细胞铺于 12 孔板中,待贴壁后,其中 3 孔加入脂多糖 (LPS) (终浓度为 200 ng/ml),将细胞诱导成 M1 型巨噬细胞,为 LPS 诱导组;3 孔加入白细胞介素 -4 (IL-4) (终浓度为 20 ng/ml),将细胞诱导成 M2 型巨噬细胞,为 IL-4 诱导组;对照组不加药。诱导 12 h 后提取 RNA。按照同样的方法将细胞诱导 24 h 后提取蛋白,实验重复 3 次。

1.3.2 动物分组及处理 将 18 只 ApoE^{-/-} 小鼠和 18 只 C57BL/6J 小鼠分成 6 组,每组 3 只 ApoE^{-/-} 小鼠和 3 只 C57BL/6J 小鼠,其中 C57BL/6J 小鼠为对照组。均喂食高脂饲料 16 周后脱颈处死小鼠,心脏灌注 5 ml 生理盐水,将腹主动脉取出后,在体视显微镜下将腹主动脉外面的脂肪剥离干净。其中 3 组腹主动脉用于提取蛋白,另外 3 组腹主动脉用于提取 RNA,提取 RNA 时不需要灌注,以免 RNA 降解。同时取出 ApoE^{-/-} 小鼠心脏窦部,用 OCT 冷冻包埋剂包埋,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存,用于冷冻切片。

1.3.3 Western blotting 检测 eIF4E 蛋白相对表达量 分别检测各组细胞和小鼠腹主动脉中 eIF4E 蛋白的相对表达量。采用裂解液 (含 PMSF) 裂解细胞和组织 (组织需匀浆),吹打均匀置冰上裂解 30 min,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取蛋白上清液,考马斯亮蓝法检测蛋白浓度,剩余蛋白与上样缓冲液按比例混匀,沸水浴 5 min,置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。在十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中进行蛋白分离,冰浴条件下转至聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂奶粉封

闭 1 h 后,加入一抗,4℃摇床孵育过夜。PBST 洗涤 4 次,加入相应的二抗,孵育 1 h 后,PBST 洗 4 次,ECL 化学发光显色,成像系统拍照,用 Image J 软件进行图像分析。以目的条带(eIF4E)与内参(β -actin)条带吸光面积积分的比值分析目的蛋白表达。在细胞水平检测 eIF4E 蛋白在 M1 型、M2 型巨噬细胞和对照组中的表达;在动物组织水平上检测 eIF4E 蛋白在 ApoE^{-/-} 和对照组中的表达。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 eIF4E mRNA 相对表达量 分别检测各组细胞和各组动物腹主动脉中 eIF4E mRNA 的相对表达量。采用 Trizol 法提取各组细胞和小鼠腹主动脉的总 RNA (组织需匀浆),使用 Prime Script™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒逆转录成 cDNA,用 TB Green™ Premix Ex Taq™ 进行 qRT-PCR。eIF4E 引物:正向 5'-AGGACGGTGGCTGATCACA-3',反向 5'-TCTCTAGCCAGAAGCGATCGA-3';GAPDH 引物:正向 5'-CAACTTTGGCATTGTGGAAGG-3',反向 5'-ACACATTGGGGT AGGAACAC-3'。以 GAPDH 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 mRNA 相对表达量。所有实验重复 3 次,每次设 3 个生物学重复。在细胞水平检测 eIF4E mRNA 在 M1 型、M2 型巨噬细胞和对照组中的表达;在动物组织水平检测 eIF4E mRNA 在 ApoE^{-/-} 和对照组中的表达。

1.3.5 组织免疫荧光检测 eIF4E 与 M1 和 M2 型巨噬细胞共定位表达 将心脏窦部用冷冻切片机切 6 mm 厚,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBST 洗 5 min/次,洗 3 次;0.25% Triton X-100 破膜 5 min,5% 封闭液室温封闭 1 h;孵育兔源一抗 CD206/CD86(兔源,1:100)和 eIF4E(小鼠源,1:300)混合液,4℃过夜;第 2 天,先室温平衡 30 min,然后用 PBST 洗 5 min/次,洗 3 次;室温孵育荧光二抗 488(山羊抗鼠,1:100)和 594(山羊抗兔,1:100)混合液 1 h,PBST 洗 5 min/次,洗 3 次;孵育 DAPI 5 min,PBST 洗 5 min/次,洗 3 次;抗荧光

淬灭剂封片,倒置荧光显微镜观察拍照。在组织上检测 eIF4E 在 M1 型和 M2 型巨噬细胞中的共表达。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用独立样本 *t* 检验或方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 eIF4E mRNA 和蛋白在细胞中的表达

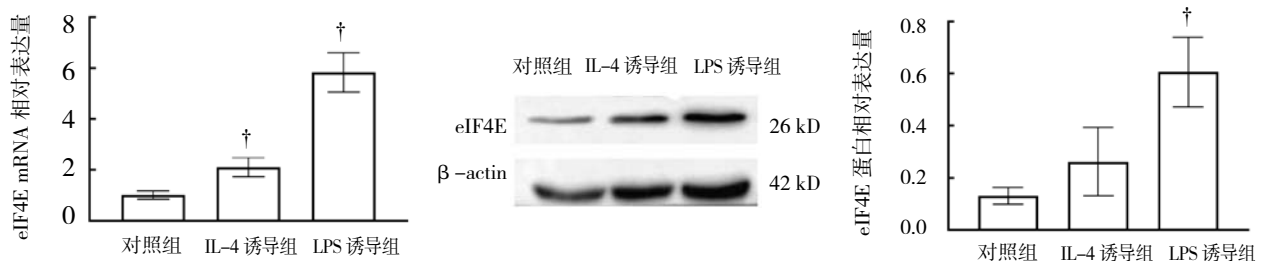
对照组、IL-4 诱导组和 LPS 诱导组细胞中 eIF4E mRNA 相对表达量分别为(1.010 \pm 0.157)、(2.102 \pm 0.375)和(5.832 \pm 0.774),经方差分析,差异有统计学意义($F = 23.329, P = 0.000$),进一步两两比较,LPS 诱导组 eIF4E mRNA 表达高于 IL-4 诱导组($P < 0.05$)。对照组、IL-4 诱导组和 LPS 诱导组 eIF4E 蛋白相对表达量分别为(0.130 \pm 0.032)、(0.261 \pm 0.131)和(0.606 \pm 0.134),经方差分析,差异有统计学意义($F = 12.834, P = 0.011$),进一步两两比较,LPS 诱导组 eIF4E 蛋白表达高于 IL-4 诱导组($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 eIF4E mRNA 和蛋白在组织中的表达

对照组和 ApoE^{-/-} 小鼠腹主动脉中 eIF4E mRNA 相对表达量分别为(0.927 \pm 0.146)和(6.414 \pm 0.297),经独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义($t = -33.174, P = 0.000$),ApoE^{-/-} 小鼠腹主动脉中 eIF4E mRNA 表达高于对照组;对照组和 ApoE^{-/-} 小鼠腹主动脉中 eIF4E 蛋白相对表达量为(0.225 \pm 0.078)和(2.342 \pm 0.594),经独立样本 *t* 检验,差异有统计学意义($t = -6.122, P = 0.004$),ApoE^{-/-} 小鼠腹主动脉中 eIF4E 蛋白表达高于对照组。见图 2。

2.3 eIF4E 与 M1 型和 M2 型巨噬细胞共表达

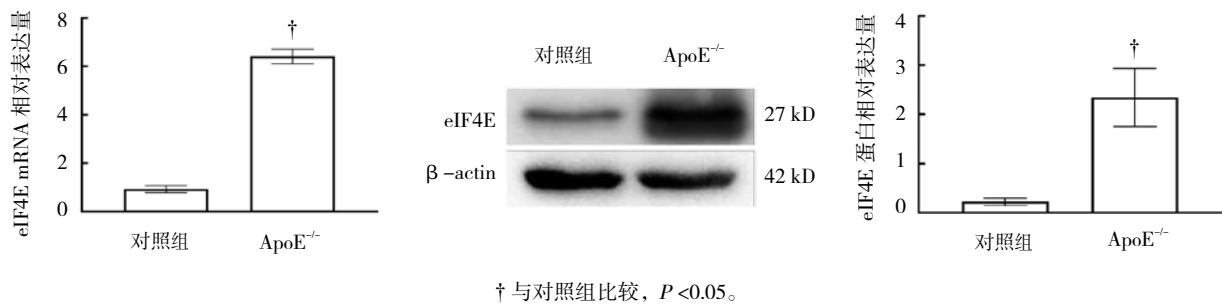
ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部切片免疫荧光结果显示



† 与 IL-4 诱导组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组细胞中 eIF4E mRNA 和蛋白的表达

eIF4E 与 CD86 的共定位比 eIF4E 与 CD206 的共定位表达多, eIF4E 在 M1 型巨噬细胞中的含量高于 M2 型巨噬细胞。见图 3。



† 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 各组小鼠腹主动脉中 eIF4E mRNA 和蛋白的表达

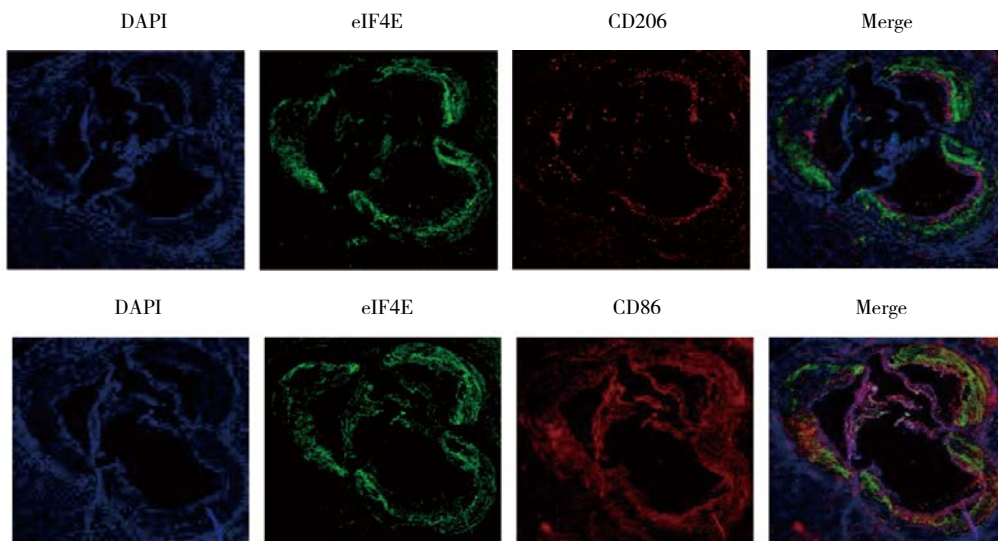


图 3 eIF4E 与 M1 型和 M2 型巨噬细胞共表达 (免疫荧光 $\times 100$)

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症, 炎症在动脉粥样硬化的各个阶段都发挥重要作用。在动脉粥样硬化发展和进展期间, 巨噬细胞暴露于许多环境信号^[18]。基于其在斑块内的定位和分布, 巨噬细胞展现不同的极化状态和功能表型^[19]。目前, 治疗动脉粥样硬化的药物主要是降脂及抗凝等, 但疗效不理想, 因此仍需从基因水平和细胞分子方面探索动脉粥样硬化新疗法。

真核生物基因表达调控的一种机制是控制翻译速率, 翻译调控在细胞生长、增殖和发育中起着关键作用。可以在翻译的起始、伸长和终止中的每一步控制翻译速率^[20]。在翻译起始时, 需要大量的真核翻译起始因子的协作才能完成。其中异源三聚体复合物 eIF4F 中的 eIF4E 与 mRNA 5'-端帽子结构的结合是该阶段的核心。已有研究表明, eIF4E 抑制性蛋白能够通过雷帕霉素复合物 1-eIF4E 结合蛋白 1/2 轴协调

转录, 从而编码限制巨噬细胞中抗炎反应的转录程序。而 eIF4E 通过与 eIF4E 抑制性蛋白的结合而破坏翻译的起始过程, 抑制 mRNA 翻译。翻译抑制已成为炎症反应的中枢调节机制^[21-22]。

本研究用分别 LPS 和 IL-4 诱导细胞分化成 M1 型和 M2 型巨噬细胞后检测 2 种细胞中 eIF4E 蛋白和 mRNA 的表达差异, 结果表明 eIF4E 蛋白和 mRNA 在 M1 型巨噬细胞中的表达均高于 M2 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞通过促炎细胞因子等加速免疫细胞内皮下招募和血管壁重塑, M2 型巨噬细胞通过抗炎细胞因子减缓动脉粥样硬化并使斑块稳定。初步说明 eIF4E 主要通过 M1 型巨噬细胞发挥促炎作用。在 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型中, eIF4E 与 CD86 的共定位表达比 eIF4E 与 CD206 的共定位表达多, 且 eIF4E 蛋白和 mRNA 在 ApoE^{-/-} 小鼠腹主动脉中表达也高于对照组。动物组织实验结果验证细胞实验结果, 进一步说

明 eIF4E 在动脉粥样硬化疾病中起促炎调节作用。

综上所述, eIF4E 通过调控巨噬细胞极化起到炎症调控作用, 其主要是通过调控 M1 型巨噬细胞极化起到促炎调节作用。本研究仅从 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型做初步研究, 后续会通过小鼠 eIF4E 和 ApoE 双基因敲除后, 进一步探讨其在动脉粥样硬化的发生、发展中的具体作用以及相关通路, 以期为临床治疗动脉粥样硬化提供一定的理论依据。

参 考 文 献:

- [1] MOORE K J, TABAS I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 341-355.
- [2] LIBBY P, AIKAWA M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1257-1262.
- [3] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410-1422.
- [4] WEBER C, ZERNECKE A, LIBBY P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(10): 802-815.
- [5] COLIN S, CHINETTI-GBAGUIDI G, STAELS B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis[J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1): 153-166.
- [6] KAPLAN M, SHUR A, TENDLER Y. M1 Macrophages but not M2 Macrophages Are Characterized by Upregulation of CRP Expression via Activation of NF-kappaB: a possible role for Ox-LDL in macrophage polarization[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1477-1487.
- [7] WEBER C, NOELS H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1410-1422.
- [8] WEBER C, ZERNECKE A, LIBBY P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(10): 802-815.
- [9] COLIN S, CHINETTI-GBAGUIDI G, STAELS B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis[J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1): 153-166.
- [10] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [11] GINGRAS A C, RAUGHT B, SONENBERG N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation[J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 913-963.
- [12] SONENBERG N, GINGRAS A C. The mRNA 5'-cap-binding protein eIF4E and control of cell growth[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 268-275.
- [13] RAUGHT B, GINGRAS A C. eIF4E activity is regulated at multiple levels[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(1): 43-57.
- [14] 夏良平. eIF4E 作用及调节机制 [J]. *国外医学 (分子生物学分册)*, 2001(5): 280-282.
- [15] WILLIAM M, LEROUX L P, CHAPARRO V, et al. eIF4E-binding proteins 1 and 2 limit macrophage anti-inflammatory responses through translational repression of IL-10 and cyclooxygenase-2[J]. *J Immunol*, 2018, 200(12): 4102-4116.
- [16] SU X D, YU Y P, ZHONG Y, et al. Interferon-gamma regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(8): 838-849.
- [17] KRISTENSEN A R, GSPONER J, FOSTER L J. Protein synthesis rate is the predominant regulator of protein expression during differentiation[J]. *Mol Syst Biol*, 2013, 9: 689.
- [18] ZHU Y H, XIAN X M, WANG Z Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, DOI: 10.3390/biom8030080.
- [19] KHAZEN W, M'BIKA J P, TOMKIEWICZ C, et al. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(25): 5631-5634.
- [20] DAVIS M R, DELALEAU M, BORDEN K. Nuclear eIF4E stimulates 3'-end cleavage of target RNAs[J]. *Cell Rep*, 2019, 27(5): 1397-1408.
- [21] SCHOTT J, REITTER S, PHILIPP J, et al. Translational regulation of specific mRNAs controls feedback inhibition and survival during macrophage activation[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(6): e1004368.
- [22] MAZUMDER B, LI X, BARIK S. Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response[J]. *J Immunol*, 2010, 184(7): 3311-3319.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 鲜雪梅, 毕颖超, 王珍珍, 等. 真核起始因子 4E 对小鼠动脉粥样硬化发生、发展的炎症调节作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(23): 1-5.