PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2021,48(7):836~845
www.pibb.ac.cn

雷公藤红素通过激活LXRα/ABCA1通路和细胞自噬抑制巨噬细胞脂质蓄积*

汪瑜翔[1,2] 姜 爽[2,3] 石雅宁[1,2] 张婵娟[1,2] 刘乐平[4] 赵谭军[1,2]
龚勇珍[1,2] 廖端芳[1,2] 覃 丽[1,2]**

([1] 湖南中医药大学药学院，长沙 410208；[2] 湖南中医药大学干细胞中药调控与应用实验室，长沙 410208；
[3] 湖南中医药高等专科学校药学系，株洲 412012；[4] 湖南中医药大学科技创新中心，长沙 410208)

摘要 巨噬细胞源性泡沫细胞转化被认为是动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）形成与发展的早期变化，其细胞内蓄积的过量脂质可通过促进血管内膜生长与坏死核形成，继而诱发斑块破裂及血栓形成等严重后果. 近期研究发现，雷公藤红素可显著调节脂质代谢，对泡沫细胞转化进程具有潜在的治疗意义. 本研究表明，雷公藤红素（Celasrol，CeT）呈浓度依赖性减少巨噬细胞Raw264.7内的脂滴积蓄，并上调胆固醇转运关键分子ABCA1、LXRA蛋白质表达. 进一步研究显示，CeT可逆转ABCA1敲低介导的脂质蓄积与ABCA1表达下调. 此外，CeT处理Raw264.7细胞24 h时观察到自噬标志物LC3II/I增加、p62减少，且采用自噬抑制剂3MA可恢复细胞内脂质水平. 综上，CeT可能通过上调LXRα/ABCA1信号及激活荷脂细胞自噬，抑制巨噬细胞内脂质蓄积. 因此，深入探究CeT在巨噬细胞源性泡沫细胞转化及AS发生发展中的作用，是研究AS治疗新的着力点，并为药物干预提供新的靶点.

关键词 雷公藤红素，动脉粥样硬化，LXRα/ ABCA1信号通路，自噬
中图分类号 R966 **DOI**：10.16476/j.pibb.2020.0388

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）是一类主要累及大中动脉的慢性炎症性疾病，同时也是冠心病、脑血管疾病和血栓栓塞性疾病等缺血性心脑血管疾病的主要病理基础[1]. AS的主要病变特征为血管脂质沉积，伴血管平滑肌细胞和纤维基质增生，并逐渐发展为AS斑块[2]. 其中，巨噬细胞源性泡沫细胞衍生为AS斑块被认为是AS发展的标志和关键步骤[3]. AS病变部位处巨噬细胞往往表现出胆固醇紊乱，以及通过细胞膜上清道夫受体介导的对氧化低密度脂蛋白（oxidized low-density lipoprotein，ox-LDL）吞噬作用，进而导致巨噬细胞中胆固醇酯（CE）积聚及泡沫细胞转化进程发生[4]. 因此，改善脂质紊乱，减少巨噬细胞脂质蓄积对于动脉粥样防治具有重要作用.

自噬是普遍存在于真核生物的一种保守的自我消化过程，参与降解损坏和衰老的细胞器、蛋白质等. 近期研究发现，肝细胞、脂肪细胞及脂肪驻留巨噬细胞同样可通过自噬进程代谢脂质[5]. 细胞内通过自噬降解脂质的过程称为脂自噬（lipophagy）. 研究发现巨噬细胞中调控泡沫细胞形成的脂质吞噬行为与失调性自噬密切相关[6]. 最新研究发现，AS斑块中存在巨噬细胞自噬现象，且自噬的激活有助于减少细胞内脂质蓄积并减轻AS病变，增强斑块稳定性[7]. 而雷公藤红素（Celasrol，CeT）、姜黄素等多种中药来源的单体成分已被证明不仅可作为天然自噬调节剂诱导细胞自噬[8-9]，更在脂质代谢调节中发挥重要作用[10]. 其中，《细胞》杂志（*Cell*）报道指出，CeT是一种强有力的抗肥胖剂，其通过增加瘦素敏感性，抑

* 国家自然科学基金（81973668，81774130，81670268），湖南省自然科学基金杰出青年基金（2018JJ1018），长沙市科技计划（kq2004060），湖南省研究生教育创新工程和专业能力提升工程（CX20200755）和湖南省药学一流学科资助项目.
** 通讯联系人.
Tel：0731-88458238，E-mail：Lqin@hnucm.edu.cn
收稿日期：2020-12-01，接受日期：2020-12-31

制食物摄入，从而减轻体重[11]. 此外，有研究证实CeT对小鼠高脂饮食引起的肥胖具有降脂作用，CeT处理显著减少模型小鼠体重、皮下和内脏脂肪含量以及肝脂滴的形成[12]. 因此我们提出，CeT可能通过激活巨噬细胞自噬降解脂质，以及减少细胞内脂质蓄积，从而减少泡沫细胞形成. 本研究主要探讨CeT抑制荷脂巨噬细胞脂质蓄积及对巨噬细胞自噬的诱导作用与潜在作用机制.

1　材料与方法

1.1　材料

CeT、DMSO购自Sigma公司；胎牛血清、DMEM培养基为Gibco产品；阿托伐他汀钙（ATL）购自中国食品药品检定研究院；ox-LDL及Dil-ox-LDL购自广州弈源生物有限公司；0.25%胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗购自Hyclone；磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂为康为世纪产品；CCK8试剂盒、RIPA裂解液购自碧云天生物科技有限公司；BCA蛋白质定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒及Loading buffer购自康为世纪；PVDF膜为Millipore产品；ECL化学发光试剂盒购自碧云天生物科技有限公司；ABCA1鼠抗、LXRα兔抗、Caveolin-1抗体均购自Abcam公司；鼠二抗、兔二抗为Proteintech产品；饱和油红O染液购自北京索莱宝科技有限公司；总胆固醇酶法测定试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司；mRFP-GFP-LC3腺病毒购自汉恒生物.

1.2　细胞培养与处理

鼠源RAW264.7巨噬细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5% CO_2的培养箱中培养. 待培养瓶中细胞覆盖瓶底约80%时，用0.25%胰酶将细胞消化，接种于6孔板中，细胞每24 h换液，以6孔板每孔2 ml培养基计. 细胞处理前需换无血清DMEM培养基同步化12 h.

1.3　细胞转染

从吉玛基因公司购得ABCA1干扰链和对照干扰链（表1）. 将细胞接种到6孔板上，待细胞融合至40%时，各孔加入2 ml培养基. 首先在50 μl培养基中加入5 μl Wnt5a干扰试剂，孵育5 min. 然后加入5 μl转染试剂Lipofectamine 2000，孵育15 min. 将上述液体混匀后加入至培养板各孔，转染效果采用蛋白质印迹（Western blot）鉴定.

Table 1　Interference chain sequences

Gene name	Forward Primer（5′→3′）	Reverse Primer（5′→3′）
siABCA1-01	GCUAGAACCCAUAGCAACAdTdT	UGUUGCUAUGGGUUCUAGCdTdT
siABCA1-02	CCAGCCAGCUUUGUCGUAUdTdT	AUACGACAAAGCUGGCUGGdTdT
siABCA1-03	GCCCUGGAUGUACAACGAAdTdT	UUCGUUGUACAUCCAGGGCdTdT

1.4　CCK8法检测细胞存活率

将对数生长期的Raw 264.7细胞消化后制成细胞悬液，在96孔板中每孔接种1.0×10^4个细胞，每孔100 μl，置于37℃、5% CO_2培养箱中培养24 h. 吸出每孔中旧培养液，5个实验组分别加入事先配置好的含100、200和400 mg/L CeT的DMEM完全培养液，溶剂对照组加入含0.3%乙醇（Et）的完全培养液，每孔100 μl，每组设置5个复孔，置于培养箱中继续培养24、48或72 h. 吸弃每孔中的细胞培养液，迅速加入CCK8溶液与DMEM培养液以1∶10比例新鲜配置的显色液，每孔100 μl，置于培养箱中孵育1 h后采用酶联免疫检测仪在波长为450 nm处检测其吸光度（*A*）值. 以每组的平均*A*值，计算每组细胞的存活率. 计算方法：存活率/%=（$A_{实验组}$ / $A_{对照组}$）×100%.

1.5　蛋白质印迹

采用Western blot检测细胞中脂质代谢相关蛋白ABCA1、LXRα、Caveolin-1以及细胞自噬相关蛋白LC3II/I和p62的表达. 细胞进行相应处理后，收集细胞，PBS洗涤3次，使用RIPA蛋白裂解液抽提总蛋白质，采用BCA蛋白质定量法测定蛋白质浓度. 进行6%~15% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，蛋白质分离后以恒定电流300 mA转膜至PVDF膜上；室温下5%脱脂奶粉封闭膜2 h，用相应的一抗4℃孵育膜过夜；洗涤后换二抗室温孵育2 h. 洗涤后采用化学发光辣根过氧化物酶底物显影；使用Image-Pro Plus软件分析蛋白质条带积分吸光度（integrated absorbance，*IA*）值，以靶蛋白*IA*值与β-actin *IA*值的比值反映靶蛋白相对表达水平.

1.6　油红O染色

将细胞培养于放有无菌盖玻片的6孔培养板内. 细胞经处理后，PBS润洗，4%多聚甲醛溶液固定，油红O染色液染色20 min，苏木素复染. Olympus显微镜观察，细胞内脂质呈红色，细胞核呈蓝色. 每张爬片随机选取5个区域，采用ImagePro Plus 6.0（Media Cybernetics）图像分析软件分析实验结果.

1.7　Dil ox−LDL染色

将细胞种于6孔板细胞爬片上，细胞生长到适当密度时分别加入待测样品处理后终止培养. PBS润洗3次后，每孔加入浓度为25 μmol/L的Dil染色液，37℃孵育细胞. DiI染色液孵育4 h后弃去染色液，PBS润洗，每孔加入DAPI染核试剂（1∶1 000 PBS稀释）染核10 min，PBS润洗后于倒置荧光显微镜下观察拍照.

1.8　胆固醇酶法

细胞进行相应处理后，收集细胞，PBS洗涤3次，裂解后离心，进行胆固醇含量测定. 根据标准曲线（采用已知浓度的胆固醇）计算得出巨噬细胞内总胆固醇（total cholesterol，TC）的含量. 同时检测细胞蛋白质含量（BCA法），用以标准化各样本的总胆固醇值.

1.9　统计学处理

数据用均数±标准差（mean±SD）表示，应用SPSS 13.0软件处理，组间比较采用t检验，P<0.05为差异有统计学意义，P<0.01时为组间具有非常显著差异，结果具有统计学意义.

2　结　　果

2.1　CeT对Raw 264.7细胞存活的影响

采用CCK8法检测CeT对Raw 264.7细胞的毒性作用以确定处理细胞的适宜剂量及时间（图1）. 不同浓度CeT（50、100、200、400、800 nmol/L）分别干预Raw264.7细胞12 h、24 h后，结果表明CeT浓度小于400 nmol/L处理组细胞均具有较高的存活率，当干预48 h时，仅在CeT浓度小于200 nmol/L处理时细胞具有较高存活率. 后续研究采用200 nmol/L CeT处理细胞24 h.

2.2　CeT对荷脂细胞内脂质含量的影响

ox-LDL是介AS发生发展的主要危险因素之一. 血管内膜中的ox-LDL沉积常导致内膜损伤，进而引起损伤部位巨噬细胞募集并通过吞噬ox-LDL形成泡沫细胞[13]. 为探究CeT对荷脂细胞内脂质含量的影响，采用80 mg/L ox-LDL处理巨噬细胞24 h以诱导荷脂模型[14]，随后CeT处理荷脂巨噬细胞. 油红O染色结果显示，与ox-LDL处理组相比，CeT能显著减少荷脂细胞内的脂滴积蓄，甚至略优于临床常用降脂药物阿托伐他汀的作用（图2a）. 此外，胆固醇酶法及Dil染色结果也进一步证明了CeT可减少巨噬细胞脂质累积（图2b，c）. 以上结果均表明，CeT能显著抑制巨噬细胞内脂质蓄积.

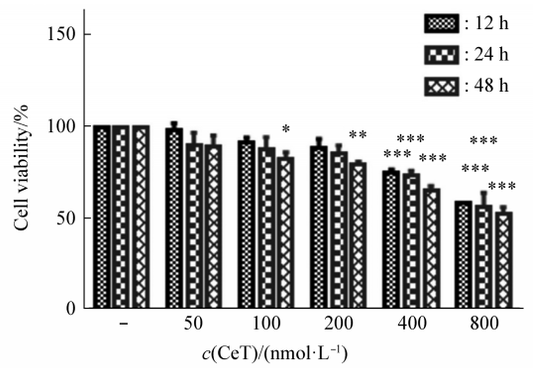


Fig. 1　Raw264.7 cells were treated with CeT（0，50，100，200，400 and 800 nmol/L）for different times（12，24 and 48 h）

Cell viability was examined by CCK8 assay at various concentrations and different times. mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to control group.

2.3　CeT对荷脂细胞中脂质相关蛋白质表达的影响

胆固醇蓄积是介导泡沫细胞形成乃至AS血管疾病最重要的危险因素之一，而胆固醇代谢与细胞内外蛋白质转运密切相关[15]. 其中，参与胆固醇转运的关键蛋白小窝蛋白1（caveolin-1）与介导细胞胆固醇流出的关键基因三磷酸腺苷结合盒转运体A1（ATP binding cassette transporter A1，ABCA1）可发挥协同作用促进胆固醇流出，而肝X受体α（liver X receptor α，LXRα）作为转录因子调控ABCA1表达[16]. 当采用50~200 nmol/L CeT干预24 h后，Western blot检测Raw 264.7细胞ABCA1、LXRα、caveolin-1表达. 结果表明，与对照组相比，CeT干预组ABCA1、LXRα、caveolin-1蛋白表达均显著上调，并在50~200 nmol/L范围内呈现剂量依赖性（图3）. 提示CeT可能通过激活巨噬细胞胆固醇流出相关蛋白LXRα、ABCA1及caveolin-1，抑制细胞内脂质积累.

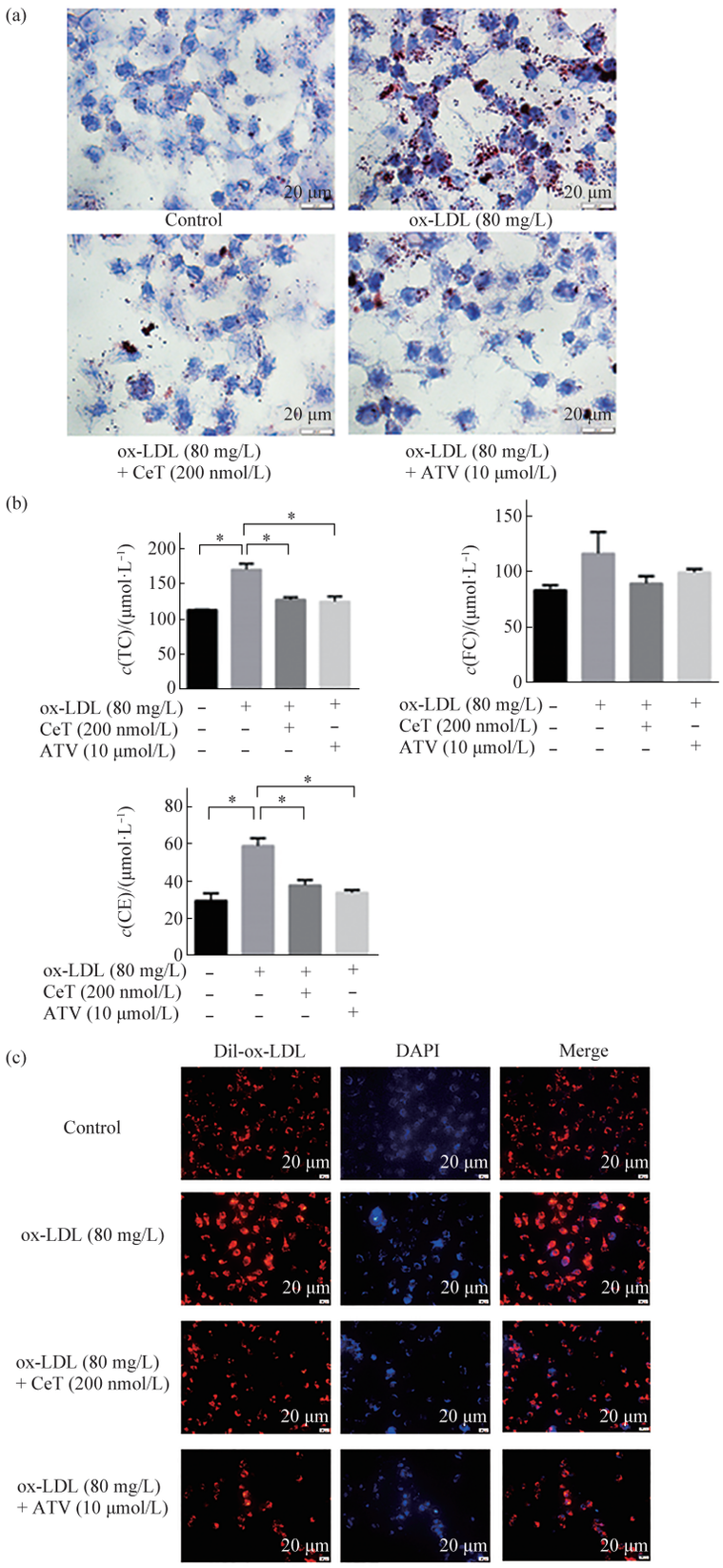


Fig. 2　The effect of CeT on lipid accumulation in lipid−loaded macrophage cell model induced by ox−LDL

(a) The intracellular lipid droplet was detected by Oil red O staining. (b) The levels of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester(CE) in Raw264.7 cells were examened by Cholesterol enzyme assay. mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. control. (c) Dil-ox-LDL staining in Raw264.7 cells was measured and quantification of the Dil fluorescence intensity was analyzed by Image pro plus.

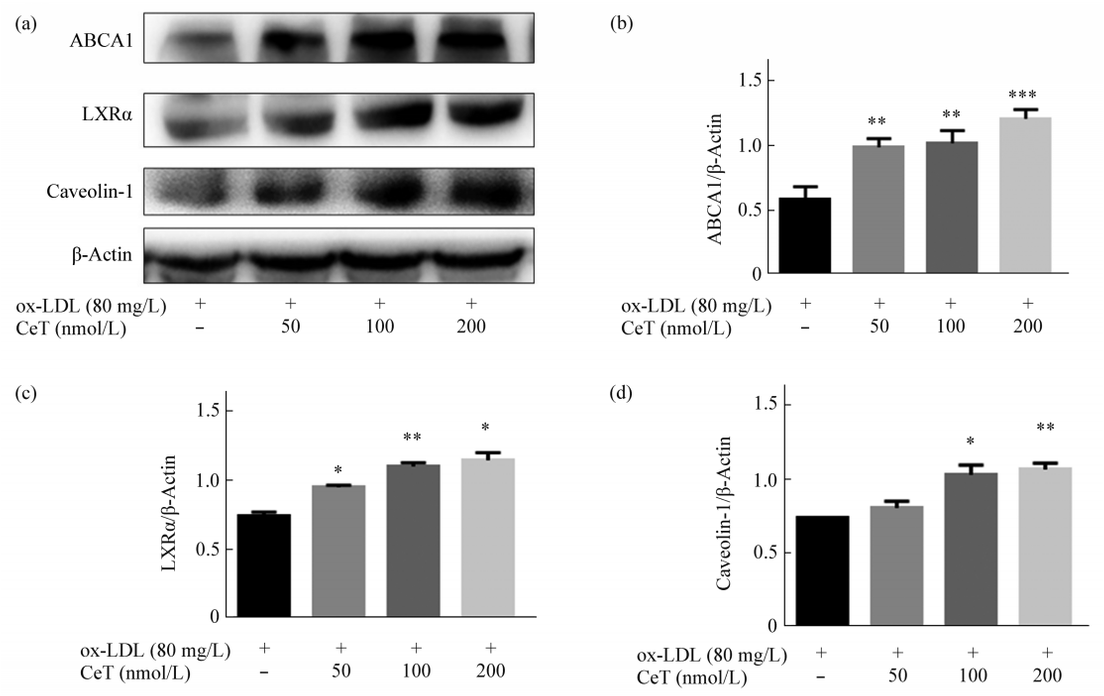


Fig. 3　The effect of CeT on the expression of lipid metabolism−related proteins

(a) The effect of CeT on the expressions of ABCA1, LXRα, caveolin-1 protein in Raw 264.7 cells. (b) The statistical figure of the relative ratio of optical density value of ABCA1. (c) The statistical figure of the relative ratio of optical density value of LXRα. (d) The statistical figure of the relative ratio of optical density value of caveolin-1. mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001compared to control group.

2.4　CeT通过激活LXRα/ABCA1信号抑制荷脂巨噬细胞内脂质蓄积

研究表明，LXR激动剂T0901317可上调ApoE$^{-/-}$小鼠动脉和肝脏中ABCA1的表达水平，并显著增加细胞内胆固醇流出[17]，提示LXRα/ABCA1信号可能参与介导巨噬细胞胆固醇流出，从而抑制细胞内脂质蓄积. 因此我们进一步采用ABCA1干扰链进行验证. 如图4a所示，siABCA1-02干扰效果最佳，故选用此干扰链进行后续实验. 油红O染色结果显示，与ox-LDL处理组相比，ABCA1敲低组细胞内脂滴明显增多，而CeT处理可显著减少ox-LDL诱导的Raw264.7细胞脂质蓄积，且敲低ABCA1可逆转CeT作用（图4b）. 此外，Western blot结果表明，CeT处理可逆转ABCA1敲低介导的ABCA1表达下调（图4c，d）. 进一步研究表明，与ox-LDL处理组比较，采用LXRα抑制剂GSK2033处理，能显著促进细胞内脂质蓄积，而CeT则可抑制该作用（图4e）. 上述结果提示，CeT通过激活LXRα/ ABCA1途径，减少细胞内脂质蓄积.

2.5　CeT通过激活细胞自噬影响巨噬细胞内脂质蓄积

研究表明，自噬与脂质代谢关系密切[18]. 细胞通过激活自噬降解脂滴，促进脂质代谢，从而抑制AS的发生发展[19-20]. 因此，本研究探讨了CeT在ox-LDL诱导的荷脂Raw264.7细胞自噬中的作用. 结果表明，在50~200 nmol/L浓度范围内，与ox-LDL处理组比较，CeT增加Raw 264.7细胞中LC3II/I的比值，并减少p62的表达，提示CeT可诱导荷脂Raw 264.7细胞发生自噬（图5a，b）. 油红O染色结果表明，CeT与自噬激活剂雷帕霉素（Rapamycin，Rap）均降低荷脂细胞内的脂质含量，且自噬抑制剂3MA处理可逆转CeT的降低荷脂的作用（图5c）. 因此，CeT可能通过介导细胞自噬减少脂质蓄积.

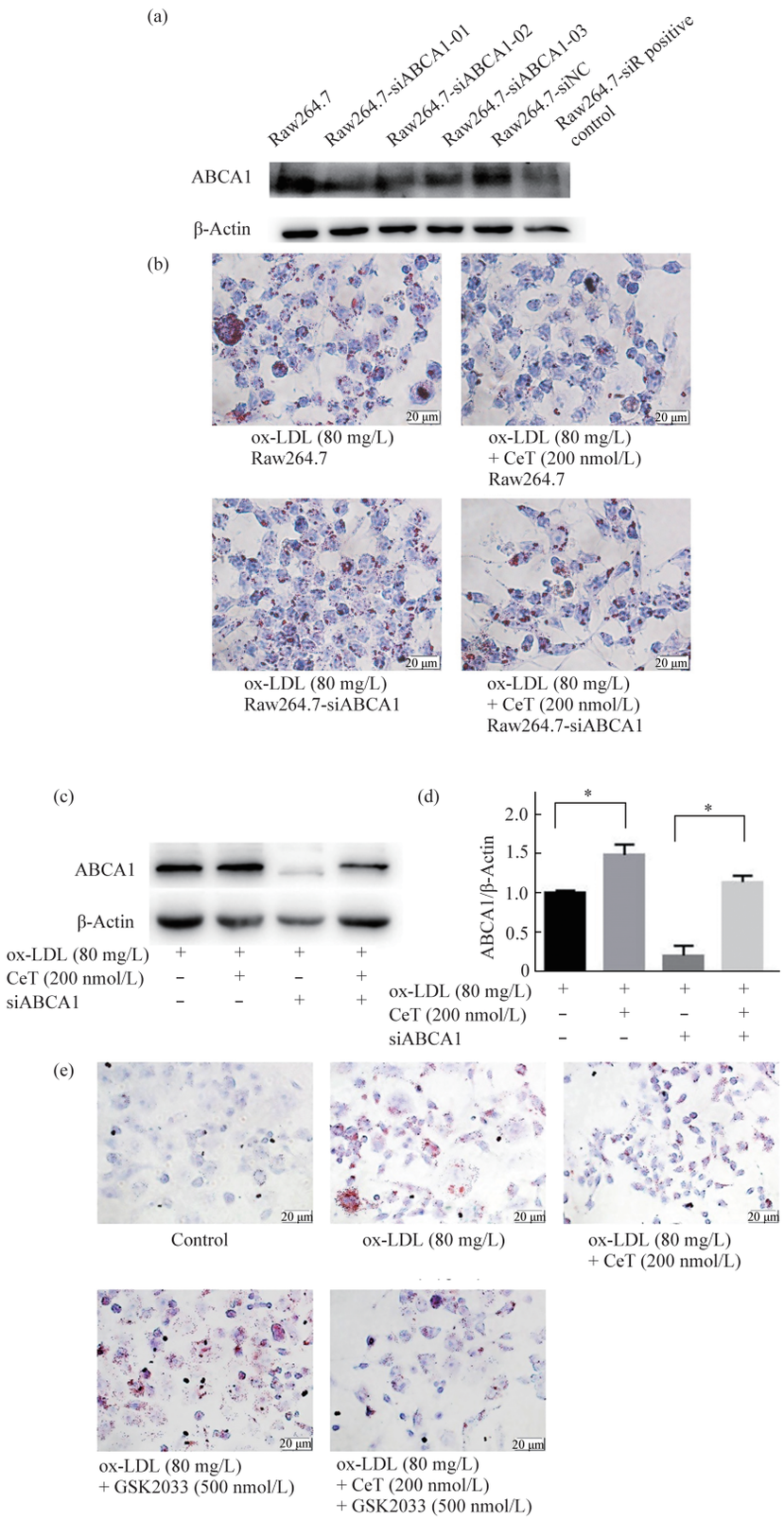


Fig. 4　CeT promotes cholesterol efflux by activating LXRα / ABCA1 pathway

(a) Raw264.7 cells were transiently transfected with siABCA1 or control siRNA (siNC), or not transfected (control). The efficiency of ABCA1 silencing in Raw264.7 cells was measured by Western blot. (b) The intracellular lipid droplet was detected by Oil red O staining. (c) The effect of CeT on the protein expression of ABCA1 in siABCA1-Raw 264.7 cells group. (d) The statistical analysis of the relative ratio of optical density value of ABCA1. mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001compared to control group. (e) The effects of CeT and GSK2033 on lipid accumulation of Raw 264.7 cell were measured by Oil Red O staining.

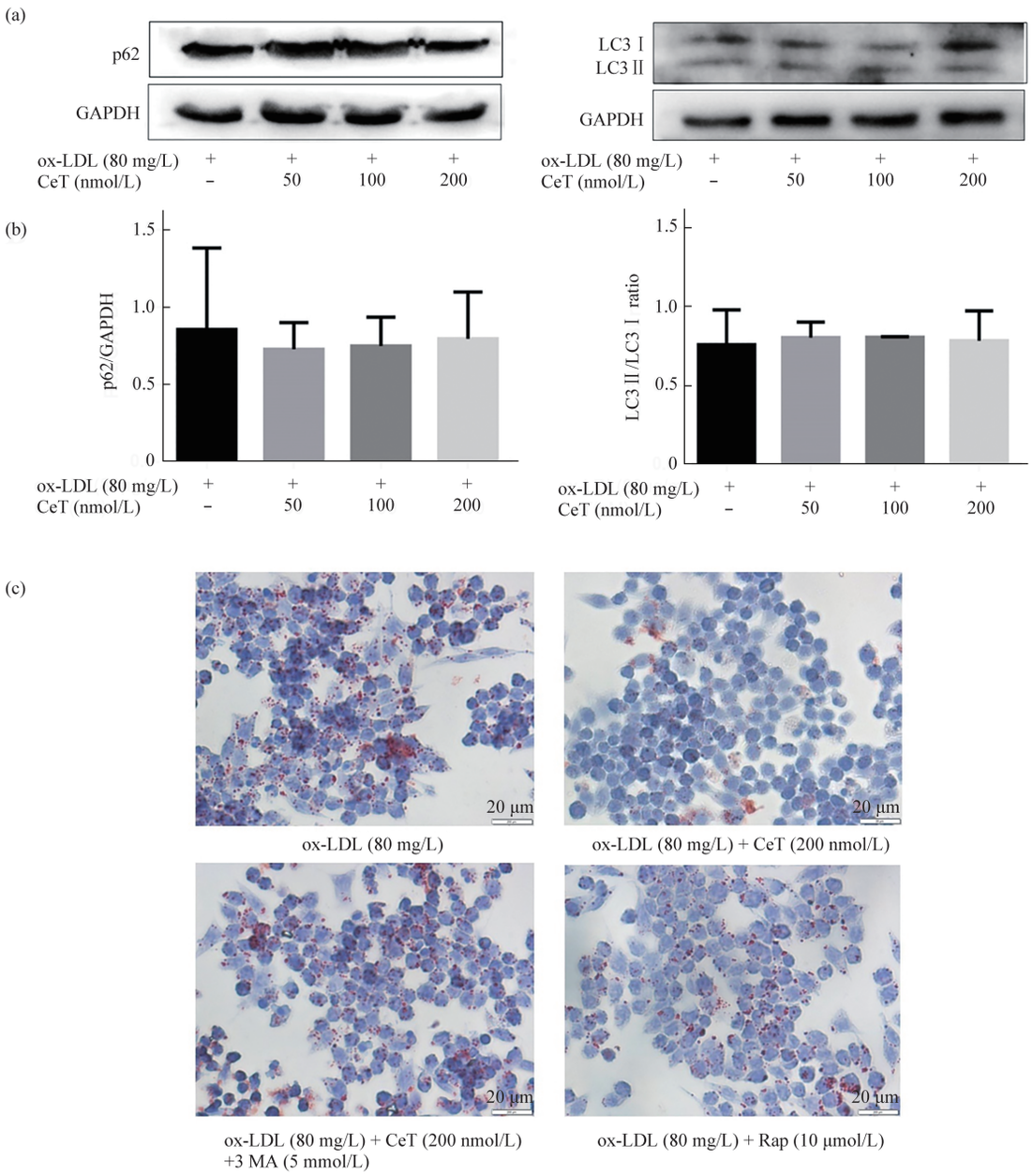


Fig. 5　CeT reduces lipid accumulation by activating autophagy of Raw 264.7 cells

(a) The effects of CeT on LC3Ⅱ/LC3I, p62 protein expression in Raw 264.7 cells. (b) The statistical analysis of the relative ratio of optical density values of p62 and LC3II/I. Mean±SD, n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared to control group. (c) The intracellular lipid droplet was measured by Oil red O staining.

3　讨　　论

AS易损血管部位的巨噬细胞募集是介导其进展的突出标志. 有研究指出，AS晚期患者常表现出纤维帽薄、脂质核大、巨噬细胞积聚丰富等特征的“易损斑块”[21]. 当巨噬细胞荷脂超过其代谢能力时，细胞内的游离胆固醇会转化为胆固醇酯，进而积聚在脂质小滴中，并促进其转化为泡沫细胞形态[21]. 此外，巨噬源性泡沫细胞内蓄积的过量脂质通过促进血管内膜生长与坏死核形成，介导斑块不稳定和血栓形成，并最终引发心肌梗死和脑梗塞. 因此，研发靶向减少巨噬细胞脂质蓄积的防治措施，对于控制AS进程具有重要意义. 而当前所公认的降脂药物——他汀类药物近期被报道可能是

介导冠状动脉钙化的诱因，并可能通过消耗辅酶Q10和血红素A发挥线粒体毒素的作用，从而损害心脏和血管的肌肉功能，反而增加AS和心力衰竭风险[22]。

值得一提的是，来自传统中药雷公藤的活性成分单体CeT，被《细胞》杂志（*Cell*）报道具有显著的降脂作用。本研究表明，CeT能够呈浓度依赖性减少荷脂细胞内的脂滴积蓄，并促进Raw 264.7中胆固醇转运关键分子ABCA1、LXRα蛋白质表达。进一步研究发现，敲低Raw264.7细胞ABCA1表达或采用LXRα抑制剂处理部分逆转CeT的抑制细胞荷脂作用。提示CeT可能影响LXRα/ABCA1信号介导Raw264.7细胞脂胆固醇流出，从而抑制巨噬细胞内脂质蓄积。

此外，*Cell Metabolism*报道诱导巨噬细胞自噬可通过促进胆固醇流出发挥斑块稳定性作用[23]。生理条件下，细胞内脂滴中的TG可通过自噬途径形成脂类自噬体，进而与溶酶体结合降解为脂肪酸，不仅参与调控脂质代谢，并在防止脂质过度沉积进程中发挥重要作用[24]。因此巨噬细胞自噬作为一种代偿机制，对于控制AS进程具有重要意义。其中，细胞内LC3的含量及LC3I向LC3II转化比值被认为是自噬发生的关键指标之一，p62蛋白则作为选择性自噬受体，在自噬过程中与泛素化蛋白结合，最终被清除。一旦自噬受到抑制，p62堆积，导致p62蛋白表达升高[25]。本研究发现，CeT处理可增加荷脂Raw264.7细胞中LC3II/I的比值，并减少p62的表达，而给予CeT处理组细胞自噬抑制剂3MA可逆转该作用，并恢复细胞内脂质蓄积。

综上所述，具有多靶点低毒性特点的活性单体CeT，可通过上调LXRα / ABCA1信号及激活荷脂细胞自噬，降低细胞内脂质沉积，呈现出较好的抗AS潜力，值得持续关注与深入研究。在今后的研究工作中，通过建立AS动物模型进一步在整体水平阐明CeT抑巨噬细胞脂质蓄积效应，探究CeT在巨噬细胞源性泡沫细胞转化及AS发生发展中的作用，将为AS的药物干预提供新的靶点及实验基础。

参 考 文 献

[1] Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. Circulation Research, 2018, **123**(10): 1118-1120

[2] Zhu Y, Xian X, Wang Z, *et al*. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation. Biomolecules, 2018, **8**(3): 80

[3] He J, Zhang G, Pang Q, *et al*. Sirt6 reduces macrophage foam cell formation by inducing autophagy and cholesterol efflux under ox-ldl condition. The FEBS Journal, 2017, **284**(9): 1324-1337

[4] Glass C K, Witztum J L. Atherosclerosis. the road ahead. Cell, 2001, **104**(4): 503-516

[5] Ward C, Martinez-Lopez N, Otten E G, *et al*. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, **1861**(4): 269-284

[6] Cao H, Jia Q, Yan L, *et al*. Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating mst1-mediated autophagy in Ox-LDL-induced RAW264.7 macrophage foam cells. International Journal of Molecular Sciences, 2019, **20**(23): 6093

[7] Vernon P J, Tang D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. Antioxidants & Redox Signaling, 2013, **18**(6): 677-691

[8] Deng S, Shanmugam M K, Kumar A P, *et al*. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. Cancer, 2019, **125**(8): 1228-1246

[9] Wang S F, Wu M Y, Cai C Z, *et al*. Autophagy modulators from traditional chinese medicine: mechanisms and therapeutic potentials for cancer and neurodegenerative diseases. Journal of Ethnopharmacology, 2016, **194**: 861-876

[10] Wang C, Shi C, Yang X, *et al*. Celastrol suppresses obesity process via increasing antioxidant capacity and improving lipid metabolism. European Journal of Pharmacology, 2014, **744**: 52-58

[11] Liu J, Lee J, Salazar Hernandez M A, *et al*. Treatment of obesity with celastrol. Cell, 2015, **161**(5): 999-1011

[12] Zhang Y, Geng C, Liu X, *et al*. Celastrol ameliorates liver metabolic damage caused by a high-fat diet through Sirt1. Molecular Metabolism, 2017, **6**(1): 138-147

[13] Kattoor A J, Kanuri S H, Mehta J L. Role of Ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis. Current Medicinal Chemistry, 2019, **26**(9): 1693-1700

[14] Gu L, Bai W, Li S, *et al*. Celastrol prevents atherosclerosis via inhibiting LOX-1 and oxidative stress. PLoS One, 2013, **8**(6): e65477

[15] Xavier B M, Jennings W J, Zein A A, *et al*. Structural snapshot of the cholesterol-transport ATP-binding cassette proteins. Biochemistry and Cell Biology, 2019, **97**(3): 224-233

[16] Wang F, Gu H M, Zhang D W. Caveolin-1 and ATP binding cassette transporter A1 and G1-mediated cholesterol efflux. Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets, 2014, **14**(2): 142-148

[17] He P, Smith A, Gelissen I C, *et al*. The effect of statins and the synthetic LXR agonist T0901317 on expression of ABCA1 transporter protein in human lung epithelial cell lines *in vitro*. Pharmacological Reports , 2019, **71**(6): 1219-1226

[18] Singh R, Kaushik S, Wang Y, *et al*. Autophagy regulates lipid metabolism. Nature, 2009, **458**(7242): 1131-1135

[19] Pi S, Mao L, Chen J, *et al*. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced

atherosclerosis. Autophagy, 2021, **17**(4): 980-1000

[20] Xiaolong L, Dongmin G, Liu M, *et al*. FGF21 induces autophagy-mediated cholesterol efflux to inhibit atherogenesis *via* RACK1 up-regulation. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, **24**(9): 4992-5006

[21] Tabas I, Bornfeldt K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. Circulation Research, 2016, **118**(4): 653-667

[22] Okuyama H, Langsjoen P H, Hamazaki T, *et al*. Statins stimulate atherosclerosis and heart failure: pharmacological mechanisms. Expert Review of Clinical Pharmacology, 2015, **8**(2): 189-199

[23] Ouimet M, Franklin V, Mak E, *et al*. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells *via* lysosomal acid lipase. Cell Metabolism, 2011, **13**(6): 655-667

[24] Wang L, Jiang Y, Song X, *et al*. Pdcd4 deficiency enhances macrophage lipoautophagy and attenuates foam cell formation and atherosclerosis in mice. Cell Death & Disease, 2016, **7**(1): e2055

[25] Zhang T, Liu C F, Zhang T N, *et al*. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α protects cardiomyocytes from lipopolysaccharide-induced mitochondrial damage and apoptosis. Inflammation, 2020, **43**(5): 1806-1820

Celastrol Inhibits Lipid Accumulation by Activating The LXRA/ABCA1 Pathway and Lipophagyin Macrophages*

WANG Yu-Xiang[1,2], JIANG Shuang[2,3], SHI Ya-Ning[1,2], ZHANG Chan-Juan[1,2], LIU Le-Ping[4], ZHAO Tan-Jun[1,2], GONG Yong-Zhen[1,2], LIAO Duan-Fang[1,2], QIN Li[1,2]**

([1]*School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208, China;
[2]*Division of Stem Cell Regulation and Application, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208, China;
[3]*Department of Pharmacy, Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou* 412012, China;
[4]*Institue of Innovation and Applied Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208, China)

Abstract Macrophage-derived foam cell transformation is considered to be an early change in the formation and development of atherosclerosis (AS). Excessive lipid accumulation in the macrophage-derived foam cell often promotes vascular intimal growth and necrosis, which leads to plaque instability and thrombosis. Recent evidence indicated that Celasrol (CeT) can significantly regulate lipid metabolism, which has potential therapeutic significance in the process of foam cell transformation. In this study, CeT treatment can reduce the accumulation of lipid droplets in lipid-loaded Raw264.7 cell in concentration-dependent manner, and up-regulate the protein expression of ABCA1 and LXRα, the key molecules of cholesterol transport in Raw264.7. In addition, the results showed that knockdown of ABCA1 promoted lipid storage, while CeT reduced intracellular lipid accumulation and up-regulated ABCA1 expression. Moreover, LC3II /I ratio was increased and p62 was decreased after treatment with CeT for 24 h. Besides, the intracellular lipid level was restored following exposure to autophagy inhibitor 3MA. In summary, CeT can reduce intracellular lipid accumulation by up-regulating LXRα / ABCA1 signal and activating autophagy of lipocytes. Therefore, further study about the role of CeT in the transformation of macrophage derived foam cells may be a promising strategy for AS therapy and underlying target for drug intervention.

Key words Celastrol, atherosclerosis, LXRα/ABCA1 signaling pathway, autophagy
DOI：10.16476/j.pibb.2020.0388

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (81973668, 81774130, 81670268), The Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Hunan Province (2018JJ1018), Science and Technology Project of Changsha City (kq2004060), Graduate Education Innovation and Professional Ability Improvement Project of Hunan Province (CX20200755) and Hunan The First-Class Discipline of Pharmaceutical Science.

** Corresponding author.
Tel：86-731-88458238，E-mail：Lqin@hnucm.edu.cn

Received：December 1，2020 Accepted：December 31，2020