

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)05-0425-04

小凹蛋白在清道夫受体 AI 介导的巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中的作用

王蓉蓉, 朱炳阳, 严鹏科, 廖端芳 (南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421001)

Role of caveolin-1 in SR-AI mediated formation of foam cells derived from macrophages

WANG Rong-Rong, ZHU Bing-Yang, YAN Peng-Ke, LIAO Duan-Fang

Institute of Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China

【Abstract】 AIM: To investigate the role of caveolin-1 in scavenger receptor ai (SR-AI) mediated formation of macrophage-derived foam cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **METHODS:** RAW 264.7 macrophages were treated with 75 mg/L ox-LDL for different hours. Next, macrophages were pre-treated with SB202190 and SR-AI antisense oligonucleotides before 75 mg/L ox-LDL treatment for 24 h. Western blot analysis was used to detect protein expression. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to determine the cellular cholesterol content. Oil red O staining was used to show the lipid droplets in foam cells. **RESULTS:** Western blot analysis showed that SR-AI expression increased with 75 mg/L ox-LDL treatment for 12, 24 and 48 h. 75 mg/L ox-LDL treatment for 6, 12, 24, 48 and 96 h decreased the expression of caveolin-1. When ox-LDL treatment was over 24 h, descended expression of caveolin-1 in macrophages was observed and lasted for 96 h. Pre-treatment of SB202190 and SR-AI antisense oligonucleotides decreased the expression of SR-AI and increased the expression of caveolin-1. Meanwhile, the cellular cholesterol content was also decreased ($P < 0.01$ vs ox-LDL treatment groups). Oil red O staining showed that the SB202190 pre-treatment group and SR-AI antisense oligonucleotides group formed less lipid droplets than ox-LDL treatment group did. **CONCLUSION:** There appears a negative relationship between caveolin-1 and SR-AI during the accumulation of lipid-laden foam cells.

【Keywords】 Caveolae; caveolin-1; Scavenger receptor AI; Ath-

收稿日期 2006-04-05; 接受日期 2006-10-31

基金项目 国家自然科学基金(39900061, 39970847), 湖南省教委资助(4-01-JY-01C186)

通讯作者 廖端芳. Tel (0734) 8281308 Email xfliao66@yahoo.com.cn
作者简介 王蓉蓉. 硕士, 讲师. Tel (0734) 8281408 Email wang2rcn@sohu.com

erosclerosis; Oxidized low-density lipoprotein; cholesterol; macrophage

【摘要】目的 研究小凹蛋白在清道夫受体 AI 介导的巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中的作用. 方法 用 75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)与巨噬细胞共同孵育不同时间. 清道夫受体 AI 反义寡核苷酸、P38 阻断剂 SB202190 预处理巨噬细胞, 然后给予 75 mg/L ox-LDL 处理 24 h. Western blot 法检测清道夫受体 AI 和小凹蛋白的表达. 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇的含量. 油红 O 染色观察细胞内脂滴的形成情况. 结果 经 75 mg/L ox-LDL 处理巨噬细胞不同时间, ox-LDL 呈时间依赖性促进清道夫受体 AI 的表达, 而呈时间依赖性抑制小凹蛋白的表达. 用清道夫受体 AI 反义寡核苷酸抑制清道夫受体 AI 的表达, 小凹蛋白的表达明显增加. 该组细胞内胆固醇含量为(119 ± 7) mg/g, 与 ox-LDL 处理组比较显著减少($P < 0.01$), 细胞内脂滴亦明显减少. P38MAPK 抑制剂 SB202190 能明显抑制清道夫受体 AI 的表达, 而增加小凹蛋白的表达. SB202190 处理组细胞内胆固醇含量为(173 ± 14) mg/g, 与 ox-LDL 处理组比较显著减少($P < 0.01$), 细胞内脂滴亦明显减少. 结论 小凹蛋白与清道夫受体 AI 协同参与了 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化的形成过程.

【关键词】 小凹蛋白; 清道夫受体 AI; 氧化性低密度脂蛋白; 巨噬细胞; 泡沫细胞

【中图分类号】 R774.1 **【文献标识码】** A

0 引言

泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化发生发展的核心环节. 巨噬细胞和平滑肌细胞表面的清道夫受体 AI (scavenger receptor AI, SR-AI) 能不断摄取修饰的脂蛋白, 致使胆固醇及胆固醇酯在细胞内聚集, 是泡沫细胞形成的重要机制之一^[1]. 同时, 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤细胞的胆固醇自平衡机制, 抑制胞内胆固醇流出, 是泡沫细胞形成的另一重要机制^[2]. 但细胞摄取胆固醇和胆固醇酯的同时, 为什么会致胆固醇流出障碍尚不清楚. 小凹(Caveolae)及小凹蛋白(caveolin-1)是存在于细胞膜上的特异性内陷结构, 在介导细胞内胆固醇的转运和流出、维持细胞内外胆固醇平衡过程中起着重要的作用^[3-4]. 本研究我们探讨了小凹蛋白在 SR-AI 介导的巨噬细胞

源性泡沫细胞形成过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 小凹蛋白 1 抗体 (sc2894, Sigma 公司, 美国), SR-AI(2F8) 抗体 (Serotec 公司, 英国); P38 阻断剂 SB202190 (Calbiochem 公司, 美国)。其他试剂均为国产分析纯。鼠源单核细胞源性巨噬细胞 RAW264.7 细胞 (中科院上海细胞生物所细胞中心); 蛋白电泳系统 (美国 Bio Rad 公司) 80P-7 型超速离心机 (日本 Hitachi 公司); 高效液相色谱仪 (美国惠普公司); 自动凝胶成像系统 (美国 UVP 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养及分组 用含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液调细胞密度至 $1 \times 10^7/L$ 24 h 后换入 1 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液, 处理前细胞静止 24 h。实验分为: 空白对照组、ox-LDL 处理组、SR-AI 正义寡核苷酸处理组、SR-AI 反义寡核苷酸处理组及 SB202190 处理组。

1.2.2 低密度脂蛋白的制备及修饰 正常人血浆低密度脂蛋白采用序列超速离心法制备^[5]。所得天然低密度脂蛋白置于 PBS 溶液中 4℃ 透析 36 h; 再放入含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 溶液 (pH 7.2) 37℃ 透析 20 h 进行氧化修饰。ox-LDL 置于 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中 4℃ 透析 24 h 终止氧化。

1.2.3 SR-AI 寡核苷酸的设计和合成 SR-AI 反义寡核苷酸 (SR-AI AS-ODN) 序列为: 5'-TACCTCGT-CACCCTAGTGA AAA-3'。为了排除 SR-AI AS-OND 可能的非特异性作用, 设立了 SR-AI 正义寡核苷酸 (SR-AI NS-OND) 对照序列。SR-AI NS-OND 的序列为 5'-ATGGAGCAGTGGGATCACTTT-3'。寡核苷酸均进行全硫代磷酸化修饰, 由上海生工生物工程公司合成。使用时 SR-AI AS-OND 和 SR-AI NS-OND 的终浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.4 Western blot 印迹法检测小凹蛋白及 SR-AI 蛋白表达 收集细胞, 4000 g 离心, BCA 试剂测定蛋白含量, 用 10 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 封闭; 按 1:1000 加入鼠抗人 caveolin-1 一抗或按 1:100 加入鼠抗人 SR-AI(2F8) 一抗 4℃ 过夜; 1:2000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗, 室温 1 h; 显影。用 Labworks 图像分析系统对 Western blot 结果进行吸光度扫描并分析。

1.2.5 油红 O 染色 将细胞培养于预先放有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 处理结束后用 PBS 冲洗盖玻片 3 次, 每次 5 min, 500 mL/L 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 1 min, 苏木

素染色 5 min, 分色和返蓝后, HPIAS-1000 型图像分析系统收集图像。

1.2.6 细胞内胆固醇的检测 待细胞处理结束后, PBS 洗 3 遍, 加入 1 $\mu\text{mol/L}$ NaOH 500 μL , 反复冻融 3 次裂解细胞, 蛋白定量后 7.2 g/L 三氯乙酸沉淀蛋白 800 g 离心 10 min, 留上清进行胆固醇检测。以豆甾醇为内标并作标准曲线, 取 100 μL 上清液, 加入 8.9 mol/L KOH 溶液 200 μL , 水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇样品。各样品分别与内标样混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100 μL 乙晴-异丙醇 (80:20) 溶解样品, 上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱, 柱温 4℃, 流速 1 mL/min, 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以细胞蛋白中的含量 mg/g 为单位。

统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由 SPSS 13.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 ox-LDL 不同作用时间对 SR-AI 及小凹蛋白表达的影响 随着 ox-LDL 75 mg/L 作用时间的延长, SR-AI 的表达呈时间依赖性递增, 其峰值在 24 h。而 ox-LDL 75 mg/L 抑制小凹蛋白的表达, 处理时间越长, 抑制作用越明显 (图 1)。

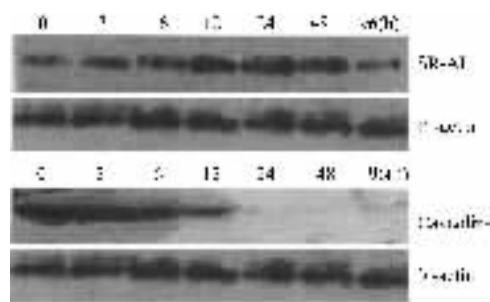


图 1 ox-LDL 作用不同时间对 SR-AI 及小凹蛋白表达的影响 ($n=3$)

2.2 SR-AI AS-ODN, P38 阻断剂 SB202190 对 SR-AI 及小凹蛋白表达的影响 SR-AI AS-ODN 处理组的 SR-AI 表达明显减少, 小凹蛋白的表达则显著增加, 与 ox-LDL 处理组比较有显著性的统计学差异 (图 2)。p38 阻断剂 SB202190 处理组 SR-AI 表达减少, 而 Caveolin-1 表达相应增加 (图 2)。

2.3 细胞内胆固醇含量的变化 巨噬细胞经 ox-LDL 75 mg/L 处理 24 h 后, 胞内胆固醇含量显著增加, 由 (66 ± 6) mg/g 上升至 (204 ± 5) mg/g。油红 O 染色可见细胞内大量脂滴形成。经 p38 阻断剂

SB202190 和 SR-AI 反义寡核苷酸预处理 24 h, 细胞内胆固醇含量分别为(173 ± 14) mg/g 和(119 ± 7) mg/g, 与 ox-LDL 处理组比较均显著减少, 细胞内脂滴明显减少(图 3)。而经 SR-AI 正义寡核苷酸预处理 24 h, 再给予相同量的 ox-LDL 处理后, 细胞内的胆固醇含量与 ox-LDL 处理组比较无统计学差异。

3 讨论

SR-AI 参与动脉粥样硬化的发生、发展等各个阶段的病理改变。高表达 SR-A 的家族易患正常胆固醇血症黄瘤病, 且家族成员体内的巨噬细胞易形成大的泡沫细胞^[6]。说明 SR-AI 在泡沫细胞形成和动脉粥样硬化发展中有重要的作用。ox-LDL 使巨噬细胞胆固醇含量明显增加, 巨噬细胞上 SR-AI 的表达递增, 最终形成典型的泡沫细胞。小凹是细胞膜上胆固醇储存和出入的重要部位。小凹蛋白是胆固醇流出的

重要调节蛋白。本实验结果显示 ox-LDL 促进 SR-AI 表达的同时明显抑制小凹蛋白的表达。如果抑制 SR-AI 的蛋白表达, 小凹蛋白的表达则增加。提示在泡沫细胞的形成过程中, SR-AI 和小凹蛋白均参与了巨噬细胞泡沫化的形成过程。

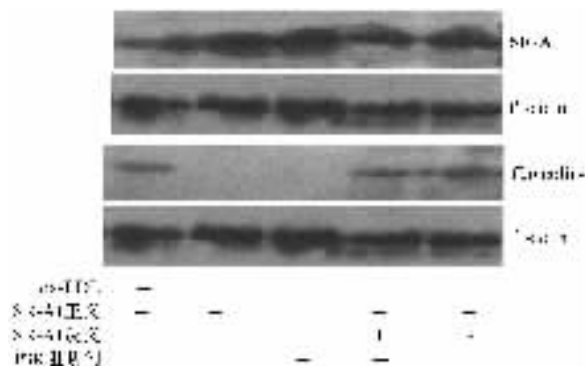
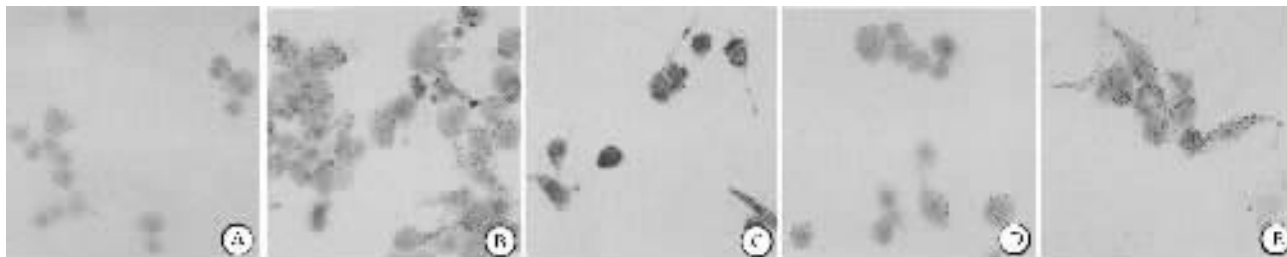


图 2 SR-AI 反义寡核苷酸、P38 阻断剂 SB202190 对 SR-AI 及小凹蛋白表达的影响 (n=3)



A: 空白对照组; B: ox-LDL 处理组; C: SR-AI 正义核苷酸处理组; D: SR-AI 反义核苷酸处理组; E: SB202190 处理组。

图 3 RAW264.7 细胞的油红 O 染色 ×200

小凹是细胞膜上对细胞外各种信号分子的识别、分隔、传导的一个中心区域。小凹蛋白对细胞内信号传导有负性调控作用。小凹蛋白的氨基酸序列有一段高度保守的骨架区域 (Scaffolding domain, 82~101 个氨基酸残基) 这一骨架区域使小凹蛋白像分子伴侣一样, 结合细胞内重要的信号分子并使他们处于失活状态。研究表明, ox-LDL 可通过细胞内 MAPK 信号通路途径调控 SR-AI 的表达^[7-8]。ox-LDL 激活酪氨酸蛋白激酶, 活化蛋白激酶 MAPK 信号通路中的 P38MAPK 和 JNK 两条通路, 刺激核内蛋白转录而促进 SR-AI mRNA 的表达。Kifor 等^[9]报道, 小凹蛋白是 MAPK 蛋白激酶活性及其信号通路的重要负性调节蛋白。因此, 小凹蛋白在一定程度上调控着 SR-AI 的正常表达。如果小凹蛋白被破坏, 其对 SR-AI 表达的负性调控作用就被取消。我室前期工作亦表明, 小凹蛋白在 SR-AI 转基因小鼠体内表达下调^[10]。因此, 在泡沫细胞的形成过程中, ox-LDL 不断的破坏小凹蛋白, 使其负性调控作用减弱或取消, 抑制 SR-AI 的

表达后, 由于细胞经由 SR-AI 摄取的 ox-LDL 大大减少, 则可见小凹蛋白的表达明显增加。P38 MAPK 阻断剂 SB202190 预处理后, 可见 SR-AI 的表达明显减少, 并伴随着小凹蛋白的表达明显上调。提示: P38 MAPK 途径参与了 SR-AI 吞噬的 ox-LDL 对小凹蛋白表达的抑制作用。

本研究结果表明, SR-AI 和小凹蛋白均参与了巨噬细胞泡沫化的形成过程, ox-LDL 不断地刺激巨噬细胞 SR-AI 的表达, 并伴随着小凹蛋白的表达下调, 使细胞胆固醇流出受阻并在细胞内聚集, 促进泡沫细胞的形成。提示小凹及小凹蛋白的病理改变在动脉粥样硬化的发生发展中也扮演着重要的作用。

【参考文献】

- [1] VanEck M, DeWinther MP, Herijgers N, et al. Effect of human Scavenger receptor Class A overexpression in bone marrow-derived cells on cholesterol levels and atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thrombos Vasc Biol*, 2000, 20(12): 2600-2606.
- [2] Herijgers N, DeWinther MP, VanEck M, et al. Effect of human

Scavenger receptor class A overexpression in bone marrow-derived cells on lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice [J]. J Lipid Res , 2000 , 41(9) : 1402 - 1409 .

- [3] Yancey PG , Jerome WG . Lysosomal cholesterol derived from mildly oxidized low density lipoprotein is resistant to efflux [J]. J Lipid Res , 2001 , 42(3) : 317 - 327 .
- [4] Dhaliwal BS , Steinbrecher UP . Cholesterol delivered to macrophages by oxidized low density lipoprotein is sequestered in lysosomes and fails to efflux normally [J]. J Lipid Res , 2000 , 41(10) : 1657 - 1665 .
- [5] 蔡海江 , 范乐明 , 杨绍混 等 . 人血清脂蛋白超速离心 [J]. 南京医学院学报 , 1983 , 3(1) : 42 - 44 .
- [6] Giry C , Giroux LM , Roy M , et al . Characterization of inherited scavenger receptor overexpression and abnormal macrophage phenotype in a normolipidemic subject with planar xanthomas [J]. J Lipid Res , 1996 , 37(7) : 1422 - 1435 .

- [7] Michele MS , Maya SG , Robert EP . Class A Scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein [J]. J Biol Chem , 2000 , 275(23) : 17661 - 17670 .
- [8] Mietus-Snyder M , Glass CK , Pitas RE . Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBP beta : Both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress [J]. Arterioscler Thrombosis Vasc Biol , 1998 , 18(9) : 1440 - 1449 .
- [9] Kifor O , Kifor I , MooreFD Jr , et al . Decreased expression of caveolin-1 and altered regulation of mitogen-activated protein kinase in cultured bovine parathyroid cells and human parathyroid adenomas [J]. J Clin Endocrinol Metab , 2003 , 88(9) : 4455 - 4464 .
- [10] 王蓉蓉 , 严鹏科 , 廖端芳 等 . 囊泡-囊泡素 1 在清道夫受体 AI 转基因小鼠动脉粥样硬化发生中的作用 [J]. 中国动脉粥样硬化杂志 , 2002 , 10(6) : 461 - 464 .

编辑 王 睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)05-0428-01

显微手术切除幕上胶质细胞瘤 80 例

张友三¹, 张剑宁², 范 磊¹ (¹ 澠池县人民医院神经外科, 河南 澠池 472400, ² 第四军医大学西京医院神经外科, 陕西 西安 710033)

【关键词】颅内肿瘤 胶质瘤 显微手术
【中图分类号】R739.4 【文献标识码】B

0 引言 颅内肿瘤以胶质瘤最为常见, 约占 35.26% ~ 60.96%^[1]。胶质瘤呈浸润性生长, 多数位于或邻近脑重要功能区。目前, 最有效的方法仍以手术切除为主, 如何彻底切除肿瘤, 尽量减轻手术损伤、保留脑功能, 是对神经外科医生的一个挑战。显微神经外科手术可明显提高切除率, 并为后续的综合治疗创造条件^[2-3]。2004-04/2006-05 我们共收治幕上胶质瘤 80 例, 效果良好, 报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 本组 80(男 54, 女 26) 例, 男女比为 2.07:1, 年龄 8 ~ 75(平均 41.5) 岁。其多见于 29 ~ 47 岁, 约占 51.5%。病程 9 d ~ 2.5 a, 平均 6 mo。头痛 68 例, 伴恶心、呕吐 52 例, 癫痫发作 26 例, 反应迟钝、生活懒散、记忆力减退等精神症状 18 例, 不完全偏瘫 13 例。CT 平扫显示低密度病灶 36 例, 等密度病灶 21 例, 混杂密度病灶 16 例, 高密度病灶 7 例; 有不同程度强化 56 例, 无强化 24 例。MRI 检查: T1 加权像肿瘤呈低信号或混杂信号, T2 加权像肿瘤呈高信号或混杂信号, 囊性变 20 例, 注射对比剂后肿瘤实质部分可见不均匀强化。肿瘤主要累及颞叶者 30 例, 颞叶 21 例, 顶叶 17 例, 枕叶 12 例, 有些瘤体较大, 常侵犯几个脑叶, 或越过中线侵犯对侧大脑半球。

1.2 方法 按肿瘤位置设计皮瓣开颅。在显微镜下沿瘤周水肿带分离, 尽可能全切除。非功能区的肿瘤可切除肿瘤及周边水肿脑组织, 功能区的肿瘤, 应严格在肿瘤边缘进行切除。较大的肿瘤, 先行瘤内切除, 再沿周边胶质增生带分块切除, 以减轻创伤。血供丰富的肿瘤, 宜先在瘤周水肿带分离, 将供血血管电凝切断后, 再整块切除肿瘤。

2 结果 全切 65 例(81.3%), 大部分切除 15 例(18.7%);

出院时恢复良好 72 例, 好转 8 例, 偏瘫 2 例, 无死亡。56 例患者随访 6 mo ~ 1 a 均生存, 6 例患者复发再次行手术治疗, 术后效果良好。39 例患者已恢复正常工作生活。病理诊断: 星形细胞瘤 35 例, 胶质母细胞瘤 19 例, 少枝胶质细胞瘤 8 例, 间变性星形细胞瘤 7 例, 室管膜瘤 11 例。

3 讨论 手术治疗的目的是安全切除肿瘤, 在安全和全切难以求全时, 首先要保留神经功能、保证患者的生活质量放在第一位。脑胶质瘤特别是低级别者, 全切肿瘤是取得较好治疗效果的关键^[4]。对于高级别肿瘤, 手术全切能延长患者的生存时间^[5-6]。

切除胶质瘤需注意: ①根据影像学资料, 明确肿瘤的位置、大小和边界, 精确设计手术入路。②避免损伤正常组织, 开颅前 30 min 使用 200 mL/L 甘露醇 250 mL 快速静脉滴注, 降低颅内压。打开硬膜后, 应开放脑池释放脑脊液, 以获得足够的手术操作空间。③明确重要功能区位置及其与肿瘤的关系, 必要时重要功能区边缘的肿瘤可不予切除, 术后辅以放疗和化疗, 非功能区的肿瘤则应彻底切除, 瘤床严密止血, 防止术后血肿发生。④术者应掌握熟练的显微外科操作技术, 同时具备良好的心理素质。

手术切除肿瘤后, 辅以放疗以减少残存的瘤细胞, 使其进入缓解期, 然后再行化疗进一步巩固疗效。还可尝试免疫治疗、基因治疗以及中医中药等^[7]。

【参考文献】

- [1] 王忠诚. 王忠诚神经外科学 [J]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005 : 512 .
- [2] 陈明振. 脑肿瘤显微手术的进展 [J]. 中华显微外科杂志 , 1999 , 22(2) : 85 - 86 .
- [3] 周良辅. 显微外科在神经外科的应用进展和展望 [J]. 中华显微外科杂志 , 1998 , 21(3) : 161 - 162 .
- [4] 王伟民, 施冲, 李天栋 等. 脑功能区胶质瘤的手术策略 [J]. 中华神经外科杂志 , 2004 , 20(3) : 147 - 150 .
- [5] Piepmeier J , Baehring JM . Surgical resection for patients with benign primary brain tumors and low grade gliomas [J]. J Neurooncol , 2004 , 69(1-3) : 55 - 65 .
- [6] Schneider JP , Trantakis C , Rubach M , et al . Intraoperative MRI to guide the resection of primary supratentorial glioblastoma multiforme - a quantitative radiological analysis [J]. Neuroradiology , 2005 , 47(7) : 489 - 500 .
- [7] Ferrari M , Cremonesi M , Bodei L , et al . Dosimetric model for locoregional treatments of brain tumors with 90Y-Conjugates : Clinical application with 90Y-DOTATOC [J]. J Nucl Med , 2006 , 47(1) : 105 - 112 .

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-01-08 ; 接受日期 2007-01-30

作者简介: 张友三, 学士, 住院医师. Tel: (0398)4801153 Email: zhsy2233871@163.com