

囊泡—囊泡素 1 在清道夫受体 A iv 转基因小鼠动脉粥样硬化发生中的作用

王蓉蓉¹, 严鹏科¹, 廖端芳¹, 万腊香², 严奉祥¹, 杨永宗²

(南华大学 1. 药物药理研究所; 2. 心血管研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 囊泡; 囊泡素 1; 受体, 清道夫; 动脉粥样硬化; 小鼠, 转基因

[摘要] 研究囊泡/囊泡素 1 与清道夫受体 A 的相互作用及在动脉粥样硬化发生发展中的作用。将 16 只正常小鼠随机分为正常对照组和高脂组, 16 只清道夫受体 A iv 转基因小鼠随机分为转基因组和高脂转基因组。正常对照组和转基因组用基础饲料喂养, 高脂组和高脂转基因组用高脂饲料喂养。24 周后用免疫组织化学法检测小鼠主动脉血管上囊泡素 1 的表达, 计算机图像分析观察主动脉斑块面积及内膜/中膜厚度, 电镜观察囊泡在主动脉内皮细胞膜上的表达。结果发现, 高脂组、转基因组、高脂转基因小鼠的内膜厚度和中膜厚度明显增加, 是正常对照组的 2~4 倍, 3 组均可见明显动脉粥样硬化斑块形成。正常小鼠主动脉血管表达高水平的囊泡及囊泡素 1, 而转基因鼠囊泡及囊泡素 1 表达明显减少。转基因鼠经高脂喂养后, 上述表现更加明显。以上结果提示转基因清道夫受体 A iv 小鼠动脉粥样硬化的发生可能与其动脉内皮细胞上囊泡/囊泡素 1 下调有关。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

The Role of Caveolae-Caveolin-1 on Atherosclerosis Formation in Scavenger Receptor A iv Transgenic Mice

WANG Rong-Rong¹, YAN Peng-Ke¹, LIAO Duar-Fang¹, WAN La-Xiang², YAN Feng-Xiang¹, and YANG Yong-Zong²

(1. The Institute of Pharmacy and Pharmacology; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[MeSH] Caveolae; Caveolin 1; Receptor, Scavenger; Atherosclerosis; Mice, Transgenic

[ABSTRACT] **Aim** To study the role of caveolae and caveolin 1 on atherosclerosis formation in scavenger receptor A iv (SR-A iv) transgenic mice. **Methods** Wild-type and SR-A iv transgenic mice were randomly divided into control, transgenic, wild-type plus high cholesterol diet, and transgenic plus high cholesterol diet groups, fed with normal or high cholesterol diet respectively. Animals were sacrificed after 24 weeks. The area of plaque was measured by electronic computer for image analysis. Immunohistochemical analysis and electron microscopy were used to investigate the expression of caveolae and caveolin 1.

Results The atherosclerotic plaque were observed in wild-type plus high cholesterol diet group, transgenic group, transgenic plus high cholesterol diet group. The thickness of intima and media were thinner in normal control group than in other three groups ($P < 0.05$). Immunohistochemical analysis showed the caveolin 1 expression in above three groups were lower than that in control group. Furthermore, electron microscopy showed the expression of caveolae were also decreased. **Conclusion** Decreased expression of caveolae and caveolin 1 is associated with the atherosclerosis formation in SR-A iv transgenic mice.

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, As)斑块中的巨噬细胞和平滑肌细胞通过其表面的清道夫受体(scavenger receptor, SR)能不断摄取修饰的脂蛋白,且不受细胞内游离胆固醇的反馈调节,致使胆固醇及胆固醇酯在巨噬细胞内聚集,形成泡沫细胞^[1]。清道夫受体 A(scavenger receptor A, SR-A)有 iv 型和 Ⅱ型两种异构体。文献[2]报道,胆固醇逆转运也参

与泡沫细胞的形成。囊泡(caveolae)是广泛存在于细胞膜上的特异性内陷结构。已有研究表明,囊泡参与细胞内胆固醇的调节,维持胆固醇进出平衡,是血管内皮细胞膜上参与胆固醇逆转运的重要结构^[3]。囊泡素 1(caveolin-1)是囊泡表面标志蛋白,富集于囊泡上,囊泡素 1 通过磷酸化—去磷酸化及在高尔基体—囊泡之间穿梭调节细胞内胆固醇平衡。而囊泡/囊泡素 1 与泡沫细胞形成及清道夫受体 A iv 之间的关系仍不清楚,因此我们采用将清道夫受体 A iv 转入血管内皮细胞的转基因小鼠,旨在研究囊泡/囊泡素 1 与清道夫受体 A 的相互作用及在动脉粥样硬化发生发展中的作用。

[收稿日期] 2002-07-24 [修回日期] 2002-11-05

[基金项目] 国家 973 项目(G2000056905)和国家自然科学基金(39900061, 39970847)资助。

[作者简介] 王蓉蓉,女,1975 年出生,湖南怀化市人,在读硕士研究生。廖端芳,男,1959 年出生,湖南沅江市人,博士,药理学教授,博士生导师,为本文通讯作者, E-mail: dfliao@hotmail.com。杨永宗,男,1937 年出生,福建仙游县人,病理生理学教授,博士生导师。

1 材料与方法

1.1 动物模型和分组

清道夫受体 A iv 转基因小鼠由万腊香博士在香港大学制备^[4]。实验分为 4 组: 正常对照组: 正常小鼠, 喂基础饲料; ④高脂组: 正常小鼠, 喂饲含 1.5% 胆固醇和 15% 猪油的高脂饲料; ④转基因组: 转基因小鼠, 喂基础饲料; 转基因高脂组: 转基因小鼠, 喂饲含 1.5% 胆固醇和 15% 猪油的高脂饲料。分笼喂养, 自由饮水。实验满 24 周, 取血并处死各组动物, 取主动脉标本作形态学检查。

1.2 血管斑块面积的检测

取小鼠主动脉, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, HE 染色。分别取正常对照组、高脂组、转基因组和转基因高脂组的主动脉的连续切片共 86 张, 输入计算机图像分析系统 (Olympus 公司制造), 观察斑块面积及内膜和中膜厚度。

1.3 免疫组织化学染色

取 4 组小鼠主动脉, 常规石蜡包埋切片, 脱蜡、水化, 组织抗原修复, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 单克隆 SR-A iv 一抗 (日本 T. Kodama 教授赠予) 稀释度为 1:100, 单克隆囊泡素 1 一抗 (Santa Cruz Biotechnology 公司出品) 稀释度为 1:100。每组中另用 PBS 取代一抗作为阴性对照。采用北京中山 HistostainTM-Plus Kits 免疫组织化学染色试剂盒。

1.4 电镜观察

取主动脉弓部组织, 分别按常规方法制备透射电镜标本, 观察血管内皮细胞上囊泡的表达。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析。

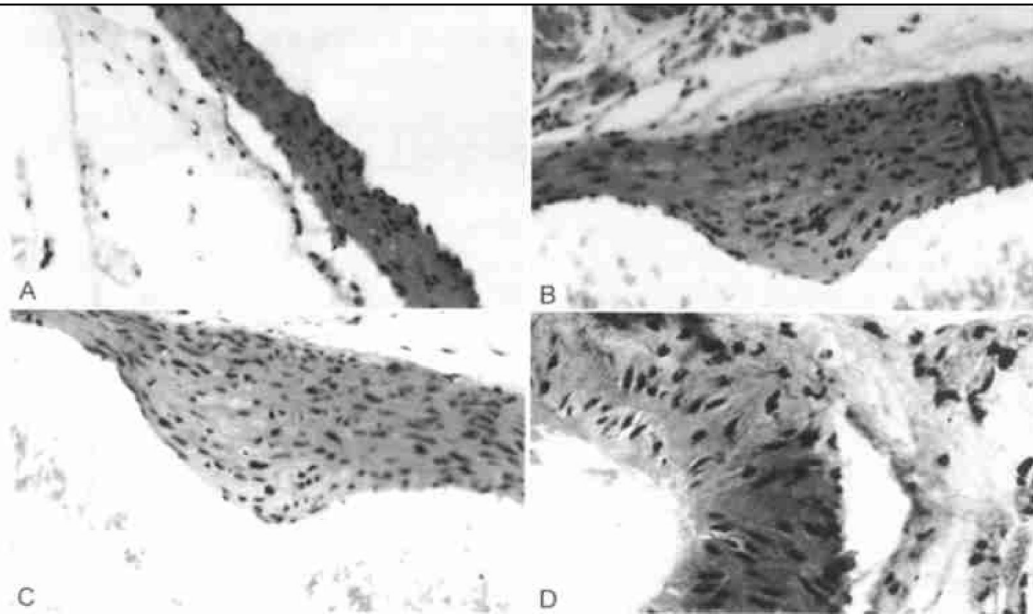


图 1. 小鼠主动脉粥样硬化斑块 (HE 染色). Figure 2. The atherosclerotic plaques of aorta in mice ($\times 200$). A: control group; B: transgenic group; C: wild-type plus high cholesterol diet group; D: transgenic plus high cholesterol diet group.

2 结果

2.1 主动脉斑块病变及内膜、中膜厚度的比较

除正常对照组外, 其余 3 组动脉病变性质和分布情况大致相同, 但有程度和范围的差别。斑块主要分布在主动脉根、弓部, 多呈乳黄色环状隆起, 常围绕冠状动脉开口。同时也可见乳黄色条纹状隆起斑块, 其长轴与主动脉纵轴平行。高脂组、转基因组、转基因高脂组均有数量不等、程度不同的血管病变发生 (表 1, Table 1); 可见程度不同的内膜增厚、管腔狭窄, 也可见中膜增生的平滑肌细胞向斑块表面垂直生长等病变发生 (图 1, Figure 1)。

表 1. 小鼠内膜、中膜厚度的比较及主动脉斑块面积。

Table 1. The comparison of thickness of intima, media and area of plaque in four groups.

Groups	Thickness of intima (μm)	Thickness of media (μm)	Area of plaque (mm^2)
Control	4.2 ± 0.8	21.3 ± 3.2	—
HC	10.2 ± 2.1^a	29.4 ± 1.2^a	1319 ± 158
Transgenic	8.2 ± 1.7^a	25.3 ± 3.5^a	941 ± 124
THC	19.7 ± 5.5^a	50.8 ± 4.9^a	3144 ± 160

a: $P < 0.05$, compared with control group. HC is abbreviation of high cholesterol and THC is abbreviation of transgenic high cholesterol.

2.2 主动脉血管壁上囊泡素 1 的变化

囊泡素 1 在各组均有表达。主要分布在主动脉血管内膜、中膜。血管内膜可见明显棕色颗粒或棕褐色弧线。阴性对照未见阳性颗粒。高脂组、转基

因组、转基因高脂组血管内膜阳性颗粒较正常对照组明显减少, 颜色较浅(图 2, Figure 2)。

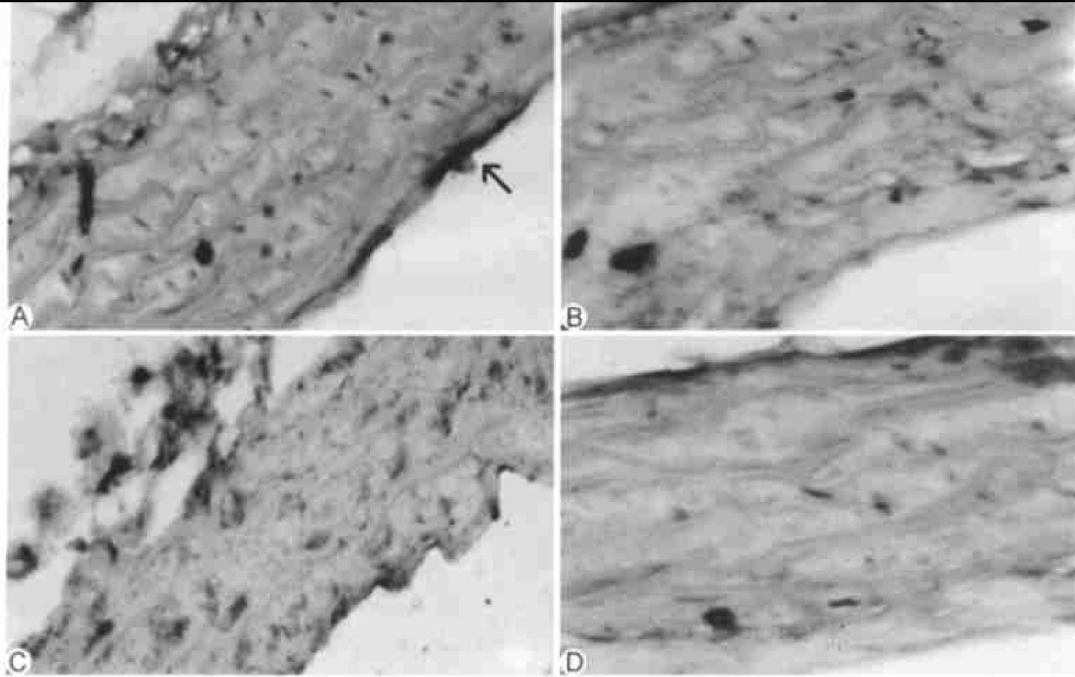


图 2. 免疫组织化学检测小鼠主动脉囊泡素 1 的表达.

Figure 2. The expression of caveolin 1 in aorta ($\times 400$). A: control group; B: transgenic group; C: wild-type plus high cholesterol diet group; D: transgenic plus high cholesterol diet group.

2.3 电镜观察囊泡在细胞膜上的表达

正常对照组可见囊泡在内皮细胞膜上表达丰富, 提示正常小鼠血管内皮细胞胆固醇逆转运旺盛。

转基因组、转基因高脂组囊泡在内皮细胞膜表达均明显减少(图 3, Figure 3)。

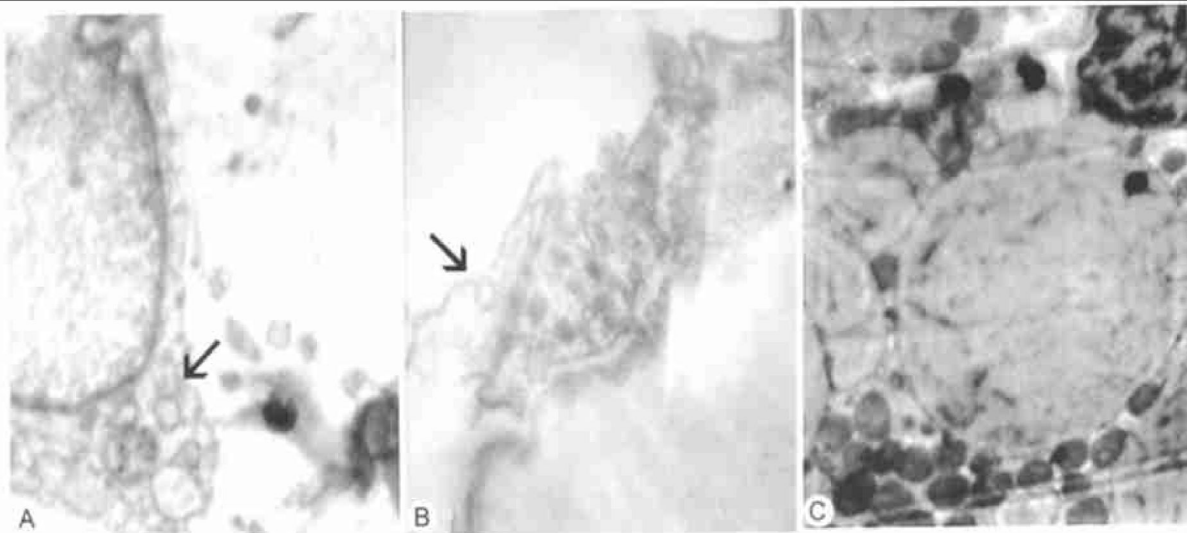


图 3. 透射电镜下细胞膜上囊泡的表达.

Figure 3. The expression of caveolae in cell membrane under transmission electron microscope ($\times 5000$). A: normal; B: transgenic group; C: foam cells, there are little caveolae in the membrane.

3 讨论

内皮细胞是血管壁与血液之间的屏障, 具有多

方面的功能。内皮细胞结构和功能的损伤是动脉粥样硬化发病过程中的重要环节。文献报道, 内皮细胞经氧化应激后有清道夫受体表达^[5,6]。提示血管

内皮细胞高表达清道夫受体后可能参与动脉粥样硬化的发生。因此,我们采用将清道夫受体 A iv 转入血管内皮细胞的转基因鼠喂饲基础饲料和高脂饲料,与正常小鼠喂饲基础饲料和高脂饲料后比较。结果发现转基因鼠均有血脂升高,动脉可见程度不同的内膜增厚、管腔狭窄,中膜平滑肌细胞增生并向斑块表面垂直生长。在高脂高胆固醇饮食下,转基因鼠动脉粥样硬化病理表现更加明显。说明在内皮细胞高表达清道夫受体 A iv 有利于动脉粥样硬化形成,与以前报道一致^[4]。提示清道夫受体 A iv 在动脉粥样硬化形成过程中起着重要作用。同时,将清道夫受体 A iv 转入血管内皮细胞后,内皮受损严重。内皮细胞受损后,脂质和单核细胞侵入内皮下,单核细胞在内皮下摄取脂质转化为泡沫细胞,并活化产生一些细胞因子和生长因子,刺激中膜平滑肌细胞迁移和增殖,从而促进动脉粥样硬化的形成。

囊泡是存在于细胞膜上的特异性内陷结构,在内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和肺泡等均有表达^[7-11]。囊泡素 1 是囊泡表面标志蛋白,是相对分子质量为 21~24 kDa 的完整膜蛋白。近年来研究发现,囊泡及囊泡素 1 在调节细胞胆固醇流出、一氧化氮合酶功能、细胞增殖、迁移和信号转导等方面均有一定作用^[12-15]。囊泡能介导细胞内胆固醇酯的转运,维持细胞内外胆固醇平衡。Matveev 等^[16]报道,在小鼠单核细胞上,囊泡素 1 与清道夫受体 B iv 共同存在于细胞边缘和点状小区。本研究将清道夫受体 A iv 在内皮细胞表达后,电镜下观察到囊泡在转清道夫受体 A iv 的内皮细胞上数量减少,免疫组织化学染色后可见囊泡素 1 在转清道夫受体 A iv 的内皮细胞上表达下调。从而使经过清道夫受体 A iv 介导吞噬的胆固醇酯、脂蛋白不能通过囊泡转运出细胞,进一步加重胆固醇脂、脂蛋白在细胞内的堆积,有利于斑块的形成,促进动脉粥样硬化的发生和发展。在转基因高脂组,该情形进一步加重。提示转基因清道夫受体 A iv 小鼠动脉粥样硬化的发生可能与主动脉内皮细胞上囊泡/囊泡素 1 表达下调有

关。至于囊泡/囊泡素 1 下调的机理以及在单核巨噬细胞是否存在类似现象尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Nicole H, Menno PJ, Miranda VE, 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 Lipid Res*, 2000, **41**: 1 402-409
- [2] Rodriguez WV, Mazany KD, Essenburg AD, et al. Large versus small unilamellar vesicles mediate reverse cholesterol transport in vivo into two distinct hepatic metabolic pools: implications for the treatment of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 2 132-139
- [3] Smart EJ, Ying YS, Donzell WC. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 29 427-435
- [4] 万腊香, 杨永宗, Chung SS, 等. 转基因小鼠中人清道夫受体 A iv 基因的稳定遗传和特异表达. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 5-12
- [5] Marsche G, Levak-Frank S, Quehenberger O, et al. Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J*, 2001, **15**: 1 095-097
- [6] Yan SD, Roher A, Schmidt AM, et al. Cellular cofactors for amyloid β -peptide-induced cell stress: moving from cell culture to in vivo. *Am J Pathol*, 1999, **155**: 1 403-411
- [7] Razani B, Engelman JA, Wang XB, et al. Caveolin-1 null mice are viable, but show evidence of hyper-proliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 38 121-138
- [8] Han Jh, Hajjar DP, Febbraio M, et al. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 21 654-659
- [9] Fra AM, Williamson E, Simons K, et al. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *PNAS*, 1995, **92**: 8 655-659
- [10] Thyberg J, Roy J, Tran PK, et al. Expression of caveolae on the surface of rat arterial smooth muscle cells is dependent on the phenotypic state of the cells. *Lab Invest*, 1997, **77**: 93-101
- [11] Gargalovic P and Dory L. Caveolin-1 and caveolin-2 expression in mouse macrophages. *J Biol Chem*, 2001, **276** (28): 26 164-170
- [12] Razani B and Lisanti MP. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function and human disease. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 1 553-561
- [13] Sowz G, Pypaert M, and Sessa WC. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs caveolae. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **24**: 14 072-077
- [14] Schubert W, Frank PG, Razani B, et al. Caveolin-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem*, 2001, **276** (52): 48 619-622
- [15] Shin JS, Gao I, Abraham SN. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*, 2000, **289**: 785-788
- [16] Matveev S, Westhuyzen DR, Smart EJ, et al. Co-expression of scavenger receptor-B iv and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 1 647-654

(此文编辑 曾学清)