

细胞质膜小凹/小凹蛋白 1 在实验性动脉粥样硬化小鼠血管壁中的表达变化

严鹏科¹, 廖端芳¹, 涂剑¹, 王蓉蓉¹, 唐朝克², 万载阳², 杨永宗²

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

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 平滑肌细胞; 细胞质膜小凹; 小凹蛋白

[摘要] 目的 研究细胞质膜小凹/小凹蛋白 1 在动脉粥样硬化病变中的表达变化, 探索动脉粥样硬化发生过程中细胞胆固醇逆转障碍的机制。方法 采用高脂饲料喂养动脉粥样硬化敏感 C57BL/6J 小鼠 24 周, 计算机图像分析系统计算动脉粥样硬化病灶面积和主动脉内膜和中膜厚度; 电镜观察小凹在主动脉病变区的血管平滑肌细胞表达, Western 印迹检测血管壁小凹蛋白 1 变化情况。结果 动脉粥样硬化模型小鼠主动脉病变区的血管平滑肌细胞膜上存在有小凹结构, 但排列稀疏, 与正常血管平滑肌细胞相比明显减少, 泡沫样改变的血管平滑肌细胞未见明显小凹结构的存在。通过 Western 印迹检测观察到, 高脂组血管壁的小凹蛋白 1 蛋白表达量明显减少, 与对照组比较具有显著差异。结论 维持细胞内胆固醇平衡的重要结构小凹/小凹蛋白 1 在动脉粥样硬化病变中明显受损, 可能是血管平滑肌细胞胆固醇逆转障碍重要原因之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Caveolae and Caveolin-1 in Aortic Wall of Experimental Atherosclerotic Mice

YAN Peng-Ke¹, LIAO Duarr Fang¹, TU Jian¹, WANG Rong-Rong¹, TANG Chao-Ke², WAN Zai-Yang², and YANG Yong-Zong²

(1. Department of Pharmacology, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Smooth Muscle Cell; Caveolae; Caveolin-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether caveolae/caveolin-1 participates in the progression of atherosclerosis.

Methods C57BL/6J mice were fed with normal chow plus 1.5% cholesterol and 15% lard for 24 weeks. The area of atherosclerotic plaque, thickness of intima and media of aorta were determined by graphic analysis computer system; Electron microscopy was used to investigate the expression of caveolae in vascular smooth muscle cell (VSMC); the expression of caveolin-1 in vascular wall was detected by western blot.

Results The serum levels of total cholesterol, triglyceride, and low density lipoprotein cholesterol in the atherosclerotic mice were elevated significantly by comparing with those in the normal mice. And the atherosclerotic lesion was widely distributed in the aorta of the atherosclerotic mice as shown by the lesion area of $3\,744 \pm 340 \mu\text{m}^2$ in the atherosclerotic mice. At the same time, the results of transmission electronic microscope showed that the caveolae in the VSMC from the atherosclerotic mice was fewer than that from normal mice. And no caveolae was observed in the foam cell derived from VSMC. Western blot demonstrated that expression of caveolin-1 decreased obviously in the aortic wall of the atherosclerotic mice.

Conclusions It indicates that caveolae vary negatively with formation of VSMC and decreased expression of caveolin-1 may be the cause of the blocking of caveolae formation in the atheromatous area.

细胞质膜小凹(caveolae)是细胞膜上的一种特殊的囊泡状凹陷结构,其已知的功能主要包括胞饮、胞吐、调节细胞内信号传导和维持细胞内胆固醇平衡四个方面^[1]。小凹蛋白 1(caveolin-1)是维持小凹结构的主要骨架蛋白,具有结合和运载胆固醇的功能,并促进细胞内游离胆固醇流出,对维持正常细胞

胆固醇的稳态起着重要调节作用。但小凹/小凹蛋白 1 在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展中的病理变化及其影响的文献报道甚少^[1,2]。本实验使用喂饲高脂饲料的 As 敏感的 C57BL/6J 小鼠复制 As 动物模型,观察 As 病变过程中小凹/小凹蛋白 1 的表达情况及其变化规律,为进一步的机制研究奠定基础。

[收稿日期] 2005-04-13

[修回日期] 2005-05-18

[基金项目] 湖南省自然科学基金(01JJY2145); 湖南省教育厅科研项目(4-02-JY-02C387)

[作者简介] 严鹏科, 博士, 博士后, 讲师, 联系电话 0734-8281408 或 13087249436, Email 为 yanpk@tom.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 DFLiao@hotmail.com。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 yzyanghy@163.com。

1 材料与方法

1.1 试剂

小凹蛋白 1 抗体(sc-894)、羊抗兔 IgG(Santa Cruz

公司); BCA 蛋白含量测定试剂、BlueRanger 预染蛋白分子量标准、Western blot 荧光检测试剂盒 (HyClone-Pierce 公司); 丽春红染色试剂 (Sigma 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物的饲养与分组

C57BL/6J 小鼠(中国医学科学院实验动物研究所提供) 30 只, 雄性, 10 周龄, 体重 22.7 ± 3.1 g。饲以普通饲料一周, 观察实验小鼠一般状况。小鼠适应环境后, 随机分为 2 组进行实验, 对照组喂普通饲料; 高脂组喂饲高脂饲料(普通饲料+ 15% 猪油+ 1.5% 胆固醇); 分笼喂养, 自由饮水。实验 24 周。

1.3 血脂测定

对照组和高脂组小鼠禁食 12 h 后, 从眼球采血, 室温静置 1 h 后, $500 \times g$ 离心, 取血清上样于全自动生物化学分析仪 (HITACHI 717, 日本), 检测血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 含量。

1.4 主动脉病变的形态学检查和评价方法

按万腊香等^[3]方法, 放血处死动物后, 取出鼠心脏和主动脉弓至髂动脉分支处全部主动脉, 冰预冷的 PBS (pH 7.2) 洗去残血, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续纵向切片, HE 染色。分别取对照组、高脂组的主动脉连续切片, 标记编号, 用 HPIAS-1000 型图像分析系统专用测量软件测量和计算心瓣膜及主动脉等部位所看到的每一个 As 病灶面积, 以每张切片上病变的平均面积 (用 μm^2 表示) 代表主动脉 As 病变面积, 同时检测主动脉内膜和中膜厚度。

1.5 电镜观察

取主动脉组织以 pH 7.3 的 PBS 快速洗净, 多点位精确取约 $1 mm^3$ 大小的组织块, 投入含 3.0% 多聚甲醛、0.25% 戊二醛 (PBS pH 7.3) 的固定液中, 于 $4^\circ C$ 固定一周 (在此期间对精取材后所剩余的相应组织块, 石蜡包埋, HE 染色, 显微镜下确定 As 病变区域), 然后选取相应的 As 病变区域的组织块, 用 PBS (pH 7.2~7.4) 反复冲洗 1 h (中间换一次液), 再以 1% 锇酸于室温下后固定 1.5 h。逐级缓慢有序脱水后, 用 Epon 812 浸透和包埋, 修整包埋块后进行超薄切片, 将切片置于制备了支持膜的铜网上。醋酸铀/铅常规染色, 电镜下观察 As 病变及周围组织细胞上小凹的结构及变化。

1.6 血管壁蛋白质的提取

参考文献[4]方法, 于 $4^\circ C$ 用 PBS 充分洗涤鼠主动脉血管, 加 5 倍体积用冰预冷的悬浮缓冲液, 迅速剪碎组织, 冰浴中匀浆, 尽快加入等体积的 $2 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液, 再将样品置于沸水浴中加热 10

min, 将上清液移于另一管中为待测样品。

1.7 Western 印迹检测小凹蛋白 1 蛋白表达

按文献[5]方法, 待测样品用 BCA 试剂测定蛋白含量后, $1 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液调蛋白浓度使各组一致 ($2.5 g/L$), 经 12.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 90 V 恒压电泳 3 h, 转移至 PDVF 膜上, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白分子质量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST ($20 mmol/L$ Tris base pH 7.6, $50 mmol/L$ NaCl, 0.1% Tween) 封闭 1 h, 按 1:200 加入兔抗人小凹蛋白 1 一抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗三次, 1:3 000 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 室温 1 h, TBST 洗三次后, 用 Western blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson1650photo 扫描仪收集图像, 用 Labworks 图像分析系统对 Western blot 结果进行吸光度扫描, 以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异性比较采用单因素方差分析, 由 SPSS 11.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化小鼠血脂的变化情况

高脂组小鼠血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇含量与喂养普通饲料的对照组比较有明显增高 (表 1, Table 1)。高密度脂蛋白胆固醇虽有增高, 但与对照组比较无统计学差异。

表 1. 动脉粥样硬化小鼠血脂检测结果 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1. The content of four factors of blood fat in C57BL/6J mice

分 组	n	TG	TC	HDL	LDL
对照组	15	0.63 ± 0.21	2.20 ± 0.34	0.59 ± 0.13	1.76 ± 0.05
高脂组	15	1.02 ± 0.48^a	3.85 ± 0.77^a	0.71 ± 0.30	2.89 ± 0.65^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 主动脉病变面积及内膜、中膜厚度的比较

对照组小鼠主动脉未见明显 As 病变。高脂组小鼠主动脉 As 病变明显: 病变血管内膜增厚明显, 增厚内膜存在大量泡沫细胞。病变血管中膜亦明显增厚, 每条主动脉切片的平均病变面积达 $3\ 744 \pm 340 \mu m^2$ (表 2, Table 2)。

2.3 透射电镜观察细胞膜上小凹结构

对照组小鼠主动脉 VSMC 细胞上有丰富的小凹结构, 分布于细胞膜上或膜内侧附近, 呈瓶颈或囊泡

状, 密集排列, 甚至呈簇状分布(图 1A, Figure 1A)。高脂组病变区域无明显泡沫化迹象的 VSMC 细胞膜上亦存在小凹结构, 但数目明显减少(图 1B, Figure 1B)。病变区域出现的泡沫样改变的平滑肌细胞膜上已观察不到明显的小凹结构(图 1C, Figure 1C)。

2.4 血管壁小凹蛋白 1 Western 印迹检测的变化
Western 印迹结果见图 2 (Figure 2)。可见对照组小鼠主动脉血管存在小凹蛋白 1 的高表达; 经高脂饲料喂养 24 周的小鼠主动脉小凹蛋白 1 表达明显减少, 与对照组比较下降 59.2%, 差异有显著性

($P < 0.05$)。

表 2. 主动脉病变面积及内膜、中膜厚度的比较
Table 2. The comparison of thickness of intima, media and area of plaque in aorta

分 组	n	内膜厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	平均病变面积 (μm^2)
对照组	15	4.5 \pm 0.8	25.3 \pm 3.5	0
高脂组	15	9.7 \pm 5.5 ^a	41.3 \pm 3.2 ^a	3 744 \pm 340

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

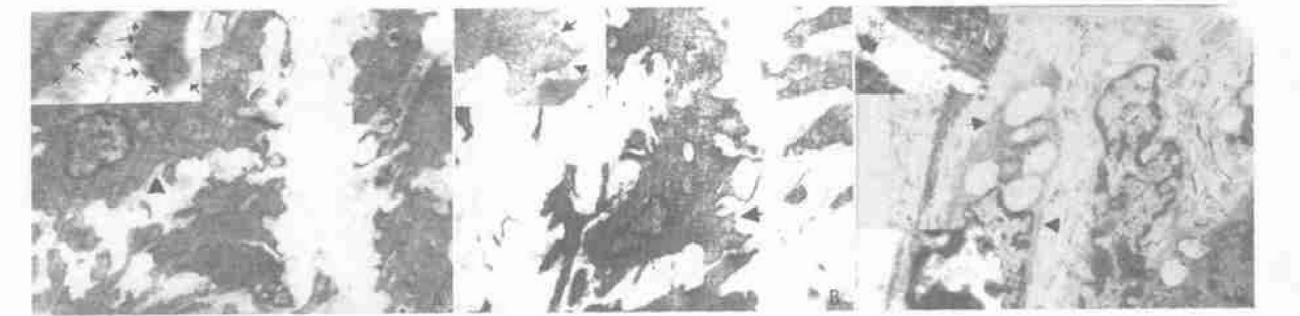


图 1. 小鼠主动脉血管平滑肌细胞超微结构 ($\times 5\,000$) A 为正常组小鼠, 细胞膜小凹表达丰富, 排列密集。左上角为局部区域(短箭头所指)的放大, 区域内箭头所指即小凹。B 为高脂组小鼠, 细胞膜小凹明显减少。左上角为局部区域(短箭头所指)的放大, 区域内箭头所指即小凹。C 为高脂组小鼠泡沫样病变区, 细胞膜上未见明显小凹结构, 左上、下角均为膜局部区域(短箭头所指)的放大。

Figure 1. Ultrastructure of VSMC in the mouse aorta

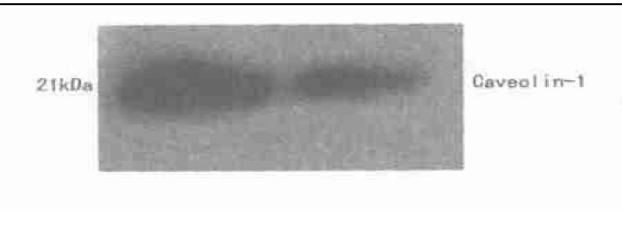


图 2. 主动脉血管壁小凹蛋白 1 蛋白的 Western 印迹检测
Figure 2. Western blot analyses for caveolin-1 in aorta of atherosclerotic mice

3 讨论

采用 C57BL/6J 小鼠, 高脂饲料喂养 24 周, 小鼠血中甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白大幅度升高, 与对照组比较有显著差异, 血中高密度脂蛋白亦有轻度升高。通过对小鼠血管 As 病变的显微镜下观察, 计算机定量分析以及透射电镜观察后发现, 模型小鼠出现明显的 As 病变, 平均病变面积达 $3\,744 \pm 340 \mu\text{m}^2$ (对照组未发现明显 As 病变); 病变部位主动脉内膜增厚, 管腔变窄, 增厚内膜中出现大量泡沫细胞。透射电镜下可见病变区平滑肌细胞内肌丝减少, 细胞器增多, 内膜出现大量泡沫样改变细胞。

说明 As 动物模型复制成功。

利用 As 小鼠, 我们首先在透射电镜下观察到: As 模型小鼠主动脉病变区的 VSMC 膜上存在有小凹结构, 但排列稀疏, 与正常 VSMC 细胞相比较明显减少。病变区域出现的泡沫样改变的平滑肌细胞膜上则没有发现小凹结构的存在。说明 As 模型小鼠病变区平滑肌细胞存在小凹减少, 且细胞受损程度越重, 减少愈明显。

小凹是细胞内胆固醇流出的主要部位。文献 [6] 报道, 将胆固醇氧化酶与活细胞共同孵育 10 min, 所有胆固醇氧化酶均定位细胞膜小凹区域, 说明只有位于小凹的游离胆固醇才能被游离胆固醇的特异识别酶所识别。提示小凹是细胞内外游离胆固醇交换的主要场所。小凹蛋白 1 是小凹形成特殊凹陷结构的必需结构蛋白, 抑制小凹蛋白 1 表达^[7, 8]或改变小凹蛋白 1 的细胞内定位^[9]均可导致细胞膜小凹结构的减少甚至消失。将重组的小凹蛋白 1 质粒转染入不表达小凹蛋白的细胞(如淋巴细胞系 L1210), 可以使细胞在膜上形成典型的小凹结构^[1, 10]。为证实 As 病变中存在小凹/小凹蛋白 1 的病理改变, 了解 As 病变 VSMC 细胞膜小凹减少的原

因,实验利用 Western 印迹检测对 As 小鼠病变血管小凹蛋白 1 表达进行了观察。结果显示,高脂组血管壁的小凹蛋白 1 蛋白表达量明显减少,与对照组比较,下降达 59.2%,差异有显著性。提示维持小凹结构和功能的关键蛋白小凹蛋白 1,在 As 病变部位表达下降,这种改变与细胞膜小凹结构减少有关。

本研究结果显示 As 病变区血管平滑肌细胞的小凹结构减少或消失,小凹蛋白 1 表达下降,且这种改变与平滑肌细胞的泡沫样改变相关,提示 As 的发生发展过程中存在小凹/小凹蛋白 1 的病理改变。

[参考文献]

- [1] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (11): 7 289-304
- [2] Cohen AW, Hnasko R, Schubert W. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*, 2004, **84** (4): 1 341-379
- [3] 万腊香, 杨永宗, Sookja.Chung, Stephen SM Chung, 曹德良, 陈修, 等. 转基因小鼠中清道夫受体 AI 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
- [4] 杨云波, 廖端芳. 普罗布考抑制血管成型术后再狭窄与调节血管重塑的关系及机制. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 443-444
- [5] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolins 1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 369-373
- [6] Ammon Schlegel, Lisanti MP. Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad. *J Cell Physiol*, 2001, **186**: 329-337
- [7] Arakawa R, Sumiko AD, Michiyo A, Ito JL, Yokoyama SJ. Involvement of caveolin-1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J Lipid Res*, 2000, **41**: 1 952-962
- [8] Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. The membrane spanning domains of caveolins 1 and 2 mediate the formation of caveolin heterooligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 18 721-726
- [9] Thyberg J. Differences in caveolae dynamics in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *Lab Invest*, 2000, **80** (6): 915-929
- [10] Gerrit van Meer. Caveolin, Cholesterol, and Lipid Droplets? *J Cell Biol*, 2001, **152** (5): F29-34

(此文编辑 胡必利,文玉珊)

•读者•作者•编者•

我刊对学术研究论文英文摘要的写作要求

国家标准 GB7713-87 规定:“为了国际交流,科学技术报告、学位论文和学术论文应附有外文(多用英文)摘要。”遵照这一规定,我刊从创刊号起,就十分注重英文摘要。1997 年第 5 卷第 1 期起将概括式英文摘要改为四项结构式英文摘要后,给作者带来了写作上的方便,作者们认真撰写出了一些质量较高的英文摘要。然而,我刊的英文摘要距参与国际交流的目的还有一定差距,主要体现在以下几个方面:第一、英文摘要的要素虽全,但繁简失当;部分摘要方法写得详细,而结果简单;第二、有的英文摘要整篇只有五六个句子,二三十个单词,信息量有限;第三、部分英文摘要出现文法错误;如此等等。

英文摘要存在上述问题,说明质量有待提高。而提高质量需要编辑和作者共同努力,其中作者是关键。最近,中国科协学会学术部下发了关于进一步提高期刊学术论文英文摘要写作质量的通知。遵照通知精神,结合我刊实际,现就英文摘要的写作提出以下几点要求,请广大作者参照执行。

1、英文摘要是应用符合英文语法的文字语言、以提供文献内容梗概为目的、不加评论和补充解释、简明扼要地论述文献重要内容的短文,写作时必须符合“拥有与论文等量的主要信息”的原则。我刊的英文摘要(ABSTRACT)应按照目的(Aim)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)四项要素来写,重点是结果(Results)和结论(Conclusions)。在有些情况下,英文摘要可包括研究工作的主要对象和范围,以及具有情报价值的其它信息。

2、英文摘要的句型力求简单,少用从句。写作时建议多用第三人称和被动语态,少用我(I)或我们(We)。描述结果时少用或不用显示(to display),多用被发现(be discovered)。一篇标准的英文摘要一般应有 10 个以上意义完整、语句通顺的句子。即目的(Aim)有 1~2 个句子,方法(Methods)有 2 个以上句子,结果(Results)有 6 个以上句子,结论(Conclusions)有 2 个以上句子。

3、英文摘要不应有引言中出现的内容,也不要对论文内容作诠释和评论,目的(Aim)不得简单重复题名中已有的信息;结果(Results)的叙述应详细,除了不能使用插图和表格外,论文结果中的所有信息都应得到表述,尤其是结果数据。应注意不用非公知公用的符号和术语,不用引文。对于缩写词、略语和代号,除了相邻专业的读者也能清楚理解(如 ATP、RNA、DNA 等)外,在首次出现时必须写出全文。还应采用国际标准计量单位,正确使用语言文字和标点符号。

4、英文摘要是写给非汉语人群看的,因此,写作时既要注意英文语法,又要符合英文的语言习惯;还要注意多义词在科技英语与文学中的用法差别。

5、英文摘要应尽量做到与汉文摘要一致,但要比汉文摘要详细,要写成小汉文摘要、大英文摘要的形式。

以上是我刊对研究论文的英文摘要的写作要求,供广大作者在撰写研究论文英文摘要时参考。