

# 整合素 $\beta 1$ 对泡沫细胞形成的影响及其机制

郝菲<sup>1,2</sup>, 陶建<sup>1</sup>, 刘雅<sup>1</sup>, 李晓辉<sup>1</sup>

(1. 第三军医大学药学院药剂教研室, 重庆市 400038; 2. 解放军 161 医院药械科, 湖北省武汉市 430014)

[关键词] 整合素  $\beta 1$ ; 泡沫细胞; CD36; 小凹

[摘要] **目的** 探讨整合素  $\beta 1$  对泡沫细胞形成的影响并初步阐明其作用机制。**方法** 针对整合素  $\beta 1$  基因设计并化学合成 siRNA。RAW264.7 细胞与含 0.1 g/L ox-LDL 的培养基培养, 分为空白对照组、转染 siRNA 阴性对照组 (siRNANC) 和 siRNA 组。应用油红 O 染色观察泡沫细胞形成, 胆固醇氧化酶终点法测定细胞内总胆固醇的含量, 原子力显微镜观察细胞膜上小凹结构的变化, Western blot 和实时荧光定量 PCR 检测清道夫受体 CD36 蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与空白对照组相比, siRNA 组油红 O 染色阳性细胞数明显减少, 细胞内总胆固醇/总蛋白显著降低 ( $P < 0.01$ )。原子力显微镜下, siRNA 干扰整合素  $\beta 1$  基因后细胞未见明显的小凹结构。Western blot 及荧光定量 PCR 结果显示 siRNA 组 CD36 蛋白和 mRNA 表达均显著减少 ( $P < 0.01$ )。**结论** 沉默整合素  $\beta 1$  基因能有效减少 RAW264.7 细胞对 ox-LDL 的摄取, 抑制泡沫细胞的形成, 其机制可能与降低清道夫受体 CD36 的表达和减少细胞膜表面的小凹相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Integrin $\beta 1$ on Formation of Foam Cells and Its Mechanisms

HAO Fei<sup>1,2</sup>, TAO Jian<sup>1</sup>, LIU Ya<sup>1</sup>, and LI Xiao-Hui<sup>1</sup>

(1. Institute of Materia Medica and Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Medicament and Instrument, No. 161 Hospital of PLA, Wuhan, Hubei 430014, China)

[KEY WORDS] Foam Cells; Integrin  $\beta 1$ ; CD36; Caveolae

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of integrin  $\beta 1$  on foam cells formation by RNA interference (RNAi)-mediated silencing. **Methods** Short hairpin RNAs against mouse integrin  $\beta 1$  was constructed. The foam cell formation induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was analyzed in mouse RAW264.7 cells which were divided into three groups, including control group, siRNANC group (with transfection of siRNA negative) and siRNA group. Formation of foam cells and contents of total cholesterol were detected, atomic force microscope was used to observe the caveolae on cell membrane, expression of CD36 protein and mRNA were detected. **Results** Decreased integrin  $\beta 1$  expression led to reduce foam cell formation and contents of total cholesterol in cells. Meanwhile, there were no caveolae on cell membrane and expression of CD36 protein and mRNA were both decreased. **Conclusions** Silencing of integrin  $\beta 1$  reduces foam cells formation. Integrin  $\beta 1$  modulated the capacity of macrophages to take up ox-LDL possibly via CD36-dependent pathway.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 及其并发症严重威胁着人类的健康。在 As 的发展过程中, 单核细胞伴随着血脂水平的升高而活化成为巨噬细胞, 随之在一系列信号分子的介导下, 巨噬细胞吞噬大量氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipopro-

tein, ox-LDL) 形成泡沫细胞<sup>[1]</sup>。泡沫细胞的形成既是 As 早期病变的特征性标志, 也是 As 斑块损伤形成、发展和崩解的关键<sup>[2]</sup>。因此, 抑制泡沫细胞的形成是长期以来 As 防治研究的热点。我室前期研究表明, 在 As 形成过程中, 整合素家族成员  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、

[收稿日期] 2012-05-02

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81001663)

[作者简介] 郝菲, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及药物治疗, E-mail 为 69447463@qq.com。通讯作者李晓辉, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病发病机制及药物治疗。陶建, 博士研究生。刘雅, 讲师, 博士, 研究方向为动脉粥样硬化的机制及药物治疗。

$\alpha 6$  等均显著表达上调;干扰整合素  $\beta 1$  基因表达则可导致巨噬细胞摄取脂功能下降<sup>[3]</sup>。然而,整合素  $\beta 1$  对泡沫细胞的形成的影响及其机制均不明确。为此,本研究拟进一步观察整合素  $\beta 1$  对泡沫细胞形成的影响并初步探讨其作用机制,为 As 防治提供新的靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 购自中科院上海细胞库(ATCC: TIB271), DMEM/H 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清购自 TBD 公司, Trizol、OPTI-MEM 培养基购自 Invitrogen 公司, ReverTra Ace PCR RT 试剂盒和 QPK2201 染料法定量 PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司, ox-LDL 购自北京协生生物有限公司。一抗羊抗 CD36 多克隆抗体,二抗驴抗羊抗体均购自 Santa Cruz 公司(货号分别为 sc-7641、sc-2020),总胆固醇测试盒购自南京建成生物工程研究所,油红原料药购自 Sigma 公司。

### 1.2 细胞培养、瞬时转染及细胞分组

设计并合成 3 条具有阳性转染率 siRNA 的靶基因均为整合素  $\beta 1$ ,并通过 Real-time PCR 筛选阳性转染率最高的 siRNA<sup>[4]</sup>。RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清(FCS)的 DMEM/H 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。转染前 24 h,细胞经胰酶消化后,按  $7 \times 10^4$ /孔接种 6 孔板培养至 2 天转染时的细胞融合度为 30% ~ 50%。转染前 1 h,换液为 OPTI-MEM 培养基培养。转染细胞与含 0.1 g/L ox-LDL 的培养基刺激培养 24 h 后,鉴定其功能。将细胞分为 3 组:空白对照组为未转染的 RAW264.7 细胞,阴性对照组为转染 siRNA 阴性对照的 RAW264.7 细胞(siRNANC 组),siRNA 组为转染 siRNA 的 RAW264.7 细胞。

### 1.3 细胞油红 O 染色

将转染的细胞培养液倒掉,用 PBS 漂洗三次,再用 10% 中性甲醛固定 30 min,用油红稀液染色 10 min 左右,再用 75% 酒精和 60% 异丙醇漂洗,除去多余的染料,最后用淡苏木染色,PBS 漂洗,甘油明胶封片后显微镜观察。

### 1.4 胆固醇氧化酶终点法测定细胞内总胆固醇的含量

将转染的细胞吹打下来,分装于两个 EP 管内。一个用于提取总蛋白,并测定蛋白浓度;另外一个含有细胞的 EP 管,1 kr/min 离心 10 min,弃去培养

液后,加入 1 mL 异丙醇,超声破碎 20 min,1.2 kr/min 离心 10 min。将离心后的上清分装转移倒 1.5 mL 的 EP 管中,真空抽干。加入胆固醇工作测试液,505 nm 处用分光光度计测定吸光度值。胆固醇含量计算:(样品吸光度值/校准品吸光度值) × 校准品浓度;各实验组细胞内总胆固醇含量的比较:用各组细胞的总胆固醇/各组细胞的总蛋白来判断细胞内胆固醇的含量。

### 1.5 原子力显微镜观察 RAW264.7 细胞膜上小凹结构的变化

转染 24 h 后,将盖玻片捞出,PBS 轻轻洗涤,4% 甲醛固定 30 min,ddH<sub>2</sub>O 冲洗。原子力显微镜下采用“轻敲模式”进行观察(观察条件:空气湿度 50%,温度 25℃)。把细胞爬片的盖玻片放于 AFM 载物台上,通过监测屏幕监视,将 AFM 的探针逐渐调至盖玻片 RAW264.7 细胞的表面,分别用 40  $\mu$ m 和 2  $\mu$ m 扫描器采用轻敲模式进行原位扫描。

### 1.6 实时荧光定量 PCR 检测 CD36 水平

引物均由上海生工生物工程公司合成、纯化。CD36 引物序列:上游 5'-GAT GAC GTG GCA AAG AAC AG-3',下游 5'-TCC TCG GGG TCC TGA GTT AT-3',扩增片段为 107 bp。以小鼠肌动蛋白  $\beta$ -actin 为内参照,引物序列为:上游 5'-CAG AAG GAG ATT ACT GCT CTG GCT-3',下游 5'-GGA GCC ACC GAT CCA CAC A-3',扩增片段为 93 bp。实时荧光定量 PCR 操作遵守试剂盒说明书的规程,按如下反应条件进行:95℃,15 s;40 个 PCR 循环(95℃,10 s;退火温度 15 s;72℃,20 s;83℃(收集荧光),5 s)。为了建立 PCR 产物的溶解曲线,扩增反应结束后继续从 72℃ 缓慢加热到 95℃(每 5 s 升高 1℃)。其中  $\beta$ -actin、CD36 退火温度分别为 59.5℃ 和 63℃。

### 1.7 免疫印迹法检测 CD36 的表达水平

应用常规蛋白提纯方法提取组织总蛋白。各组样品分别取总蛋白 50  $\mu$ g,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,分离蛋白质,然后通过电转印将蛋白质转移到硝酸纤维素滤膜上,转膜时间为 250 mA,30 min,5% 脱脂奶粉 37℃ 封闭 2 h,TBST 洗膜 3 次;加入稀释度为 1:1 000 的羊抗小鼠多克隆抗体过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗羊 IgG 抗体(稀释度为 1:2 000),室温孵育 1 h。洗涤后,新鲜配置的 ECL 化学发光法显影,用成像系统进行光密度扫描。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,各项观察指标以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 油红 O 染色观察泡沫细胞

空白对照组细胞由于大量摄取 ox-LDL 导致胞内脂质堆积,油红 O 染色阳性,脂滴较大,且细胞体

积增大,形态多呈圆形或不规形,符合泡沫细胞的特征。siRNANC 组与空白对照组相比油红 O 染色阳性细胞数量差异无显著性。siRNA 组油红 O 染色阳性细胞数明显减少(图 1)。

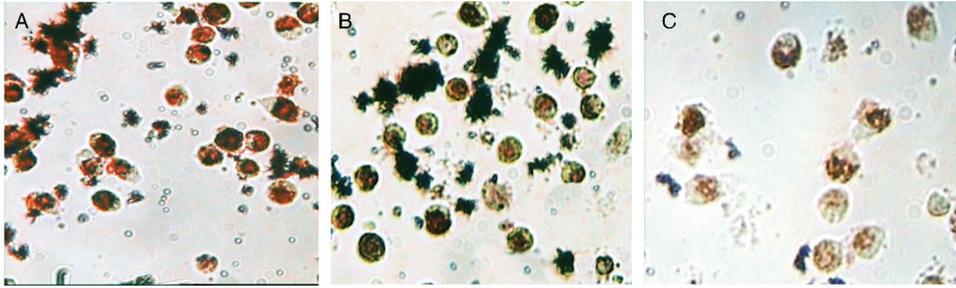


图 1. 油红 O 染色( $\times 100$ ) A 为空白对照组,B 为 siRNANC 组,C 为 siRNA 组。

Figure 1. Oil red O staining

### 2.2 整合素 $\beta 1$ 对 ox-LDL 诱导的细胞内总胆固醇含量的影响

经 ox-LDL 诱导后,RAW264.7 细胞内总胆固醇与总蛋白的比值高达 15.53,siRNANC 组总胆固醇与总蛋白的比值为 15.64,与空白对照组相比,差异无显著性;siRNA 干扰整合素  $\beta 1$  基因后细胞内总胆固醇与总蛋白的比值为 0.86,与空白对照组相比显著降低( $P < 0.01$ ;图 2)。

胞膜较平整,未见明显的小凹结构(图 3)。

### 2.3 整合素 $\beta 1$ 对 ox-LDL 诱导的细胞膜小凹结构的影响

原子力显微镜结果显示,ox-LDL 诱导后,RAW264.7 细胞变圆,伪足增多,细胞膜上有山脊样隆起、山谷样凹陷,能清晰可见直径为 50~100 nm 的窗孔样或虫蚀样小凹,siRNA 组细胞则为长梭形,细

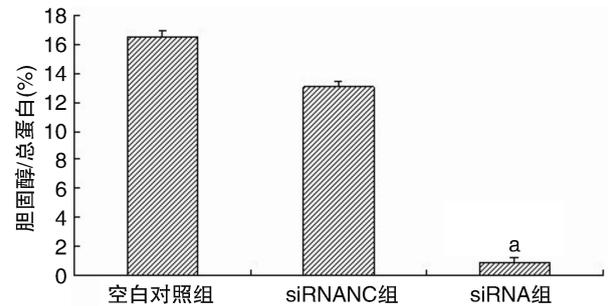


图 2. 整合素  $\beta 1$  对 RAW264.7 细胞内总胆固醇含量的影响 a 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较。

Figure 2. Effects of integrin  $\beta 1$  on total Cholesterol content in RAW264.7 cell induced by ox-LDL

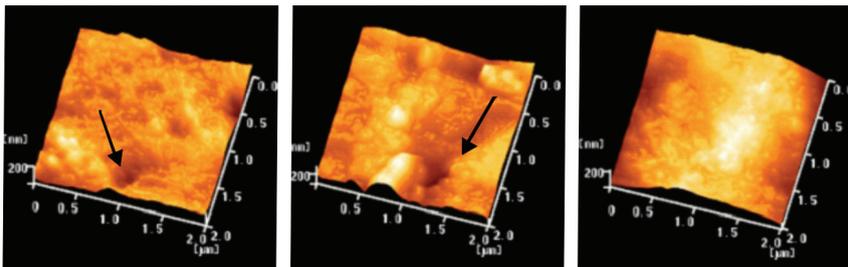


图 3. 原子力显微镜观察细胞膜上小凹结构 从左到右依次为空白对照组、siRNANC 组和 siRNA 组。

Figure 3. The change of caveolae on cell membrane by atomic force microscope

### 2.4 整合素 $\beta 1$ 对 RAW264.7 细胞膜上 CD36 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,siRNA 组 CD36 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),siRNANC 组 CD36 蛋白表达与空白对照组相比差异无显著性(图 4)。

### 2.5 整合素 $\beta 1$ 对 RAW264.7 细胞膜上 CD36 mRNA 表达的影响

与空白对照组相比,siRNA 组 CD36 mRNA 表达水平明显下降( $P < 0.05$ ),siRNANC 组 CD36 mRNA 表达水平与空白对照组相比差异无显著性

(图 5)。

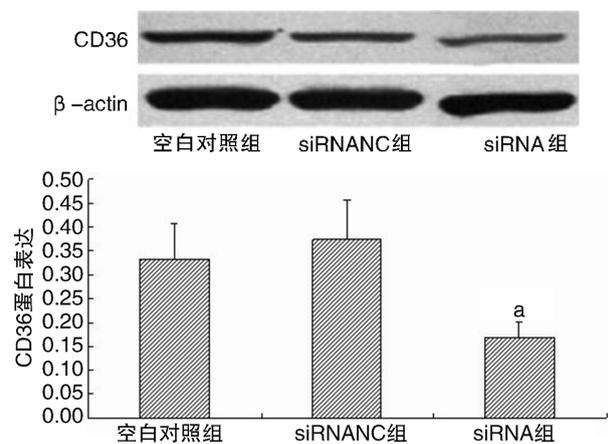


图 4. Western blot 检测 CD36 蛋白表达 a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 4. CD36 protein expression detected by Western blot

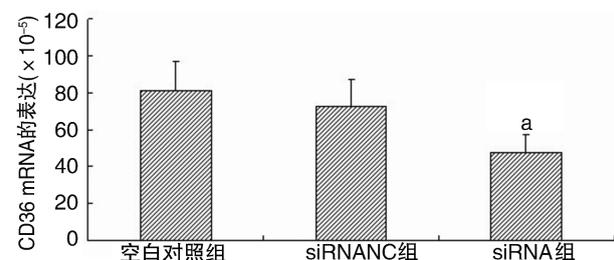


图 5. Real-time PCR 检测 CD36 mRNA 的表达 ( $\times 10^{-5}$ )

a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较。

Figure 5. The expression of CD36 mRNA detected by real-time PCR

### 3 讨论

整合素家族是一类由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基以非共价键结合的跨膜糖蛋白,是一个庞大的细胞表面受体家族,介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附及信号转导<sup>[5]</sup>。整合素通过介导血栓形成、炎症反应、血管平滑肌细胞迁移增殖等多种机制参与 As 的发生发展<sup>[6]</sup>。本研究发现,通过 RNA 干扰技术下调 RAW264.7 细胞整合素  $\beta 1$  基因表达,与 ox-LDL 共孵育后泡沫细胞形成明显减少,细胞内胆固醇含量显著降低,表明整合素  $\beta 1$  在巨噬细胞脂质摄取、泡沫细胞形成中可能发挥重要作用。

巨噬细胞通过其表面的清道夫受体 (scavenger receptors, SR),如 CD36、SR-A、凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (LOX-1) 等,大量摄取 ox-LDL,并不依赖于细胞内胆固醇水平的负反馈调节<sup>[7]</sup>,摄取的 ox-LDL 通过启动转录因子过氧化体增殖物激活型

受体  $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B 等,介导 SR 的进一步增加,从而形成胆固醇摄取的恶性循环,加速泡沫化进程。

CD36 是 SR-B 家族成员之一,CD36 缺失能显著降低巨噬细胞吞噬 ox-LDL 的能力以及动脉损伤程度。使用 CD36 特异性抗体 OKM5 封闭 CD36 结合位点可以使单核细胞 L 摄取 ox-LDL 的能力降低 50%<sup>[8]</sup>。CD36 识别 ox-LDL 后与小凹蛋白 1 (Caveolin-1) 结合而定位在小凹 (caveolae),促进 ox-LDL 的跨细胞膜转运<sup>[9]</sup>。小凹是细胞质膜表面特异性的内陷微区,亦称细胞质膜微囊,是转运 ox-LDL 不可或缺的运载工具,大多数与脂质摄取有关的受体包括 SR-B I、LOX-1 等都定位于小凹,其表达受 Caveolin-1 的调节。本研究利用原子力显微镜观察,与 ox-LDL 共孵育的 RAW264.7 细胞在整合素  $\beta 1$  基因表达下调后,质膜表面小凹结构明显减少。小凹结构的改变可能进而影响定位于其中的众多摄脂相关受体的表达。进一步研究发现,整合素  $\beta 1$  基因表达下调,CD36 mRNA 及蛋白表达均下调。因此 RNA 干扰整合素  $\beta 1$  抑制泡沫细胞形成与减少巨噬细胞表面小凹,下调定位于小凹的摄脂相关受体 CD36 的表达相关。

### [参考文献]

- [1] 徐佳杨,蔡辉. 氧化低密度脂蛋白与动脉粥样硬化的研究[J]. 安徽医药杂志, 2011, 15 (2): 228-230.
- [2] 严鹏科,汪江波,张慧,等. 巨噬细胞源性泡沫细胞适配子 PMI 的特异性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 405-408.
- [3] Zhang YG, Zhang HG, Zhang GY, et al. Panxoto ginseng saponins attenuate atherosclerosis in rats by regulating the blood lipid profile and an anti-inflammatory action [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35: 1 238-244.
- [4] 陶建,李晓辉,刘雅. 整合素  $\beta 1$  基因对 RAW264.7 细胞摄脂功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33 (2): 128-131.
- [5] 成晓龙,宋肖静,崔永萍. ECRG2 基因通过干扰 uPAR 与  $\beta 1$  整合素的相互作用抑制肿瘤细胞侵袭迁移[J]. 山西医科大学学报, 2008, 12: 56-61.
- [6] Baldwin G, Novitsaya V, Sadej R, et al. Tetraspanin CD151 regulates glycosylation of  $\alpha 3\beta 1$  integrin[J]. Biol chem, 2008, 283: 35 445-454.
- [7] Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26 (8): 1 702-711.
- [8] 靳文英. CD36 与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (7): 582-585.
- [9] 廖端芳,覃丽,唐朝克. 小凹及小凹蛋白 1 介导炎症应答与胆固醇跨膜转运之间的相互作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 233-235.

(此文编辑 李小玲)