

## ox-LDL 诱导泡沫细胞形成中 Annexin II 的表达改变及意义

温见炳<sup>1,2</sup>, 龙楚彦<sup>3</sup>, 沈小丹<sup>1,2</sup>, 刘青<sup>1,2</sup>, 李宙雪<sup>1,2</sup>, 刘丹<sup>1,2</sup>, 吴梦晴<sup>1,2</sup>, 黄起壬<sup>1,2</sup>

(1. 江西省基础药理学重点实验室, 江西省南昌市 330006; 2. 南昌大学药学院药理学教研室, 江西省南昌市 330006;

3. 南昌大学抚州医学院, 江西省抚州市 344000)

[关键词] 胆固醇; 氧化型低密度脂蛋白; Annexin II; 巨噬细胞; 泡沫细胞

[摘要] **目的** 观察 Annexin II 在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导泡沫细胞形成中表达的改变及其与细胞内胆固醇酯(CE)/总胆固醇(TC)比值(CE/TC)改变的相关性, 从而探讨 Annexin II 在 ox-LDL 诱导泡沫细胞形成中的意义。**方法** 常规培养 RAW264.7 单核细胞株, 待细胞长至 90% 汇合度时, 分别加入不同浓度的 ox-LDL (50、100、200 mg/L) 孵育 24 h, 以未经氧化修饰的天然低密度脂蛋白(n-LDL, 200 mg/L) 为阴性对照, 测定细胞内 TC 和 CE 含量, 油红 O 染色鉴定泡沫细胞; 比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)释出量和 MTT 法检测细胞存活率来观察 ox-LDL 对细胞的毒性作用; RT-PCR 和 Western blot 检测 Annexin II mRNA 和蛋白的表达水平。**结果** 不同浓度的 ox-LDL (50、100、200 mg/L) 孵育 24 h, 仅 200 mg/L ox-LDL 组细胞活力显著降低, LDH 释出量显著升高, 与 n-LDL (200 mg/L) 组比较差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ), 50 mg/L 和 100 mg/L ox-LDL 对细胞活力和 LDH 释出量无显著影响 ( $P > 0.05$ ); CE/TC 比值分别是  $55.0\% \pm 6.7\%$ 、 $61.8\% \pm 4.8\%$  和  $59.6\% \pm 5.2\%$ , 与 n-LDL (200 mg/L) 组比较差异均具有显著性 ( $P < 0.05$ ), 其中浓度为 100 mg/L 的 ox-LDL 作用最显著; ox-LDL 呈浓度依赖性抑制 Annexin II mRNA 和蛋白的表达, Annexin II mRNA 和蛋白的表达改变与 CE/TC 比值呈负相关 ( $r_1 = -0.9374, P < 0.05$ ;  $r_2 = -0.9548, P < 0.05$ )。**结论** ox-LDL 呈浓度依赖性抑制 Annexin II 表达, 提示其可能影响细胞内胆固醇自平衡从而诱导泡沫细胞形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Role of Annexin II in the Formation of Foam Cells Induced by Ox-LDL

WEN Jian-Bing<sup>1,2</sup>, LONG Chu-Yan<sup>3</sup>, SHEN Xiao-Dan<sup>1,2</sup>, LIU Qing<sup>1,2</sup>, LI Zhou-Xue<sup>1,2</sup>, LIU Dan<sup>1,2</sup>, WU Meng-Qing<sup>1,2</sup>, and HUANG Qi-Ren<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

[KEY WORDS] Cholesterol; Oxidized Low Density Lipoprotein; Annexin II; Macrophages; Foam Cells

[ABSTRACT] **Aim** The purpose of the study was to observe the expression change of Annexin II and the relationship between the expression levels of Annexin II and the ratio of intracellular total cholesterol (TC) to cholesterol ester (CE) and to explore the significance of Annexin II in the formation of foam cells induced by ox-LDL. **Methods** RAW264.7 monocyte cell lines with a 90% confluency were exposed to ox-LDL (50, 100 and 200 mg/L) and native LDL (n-LDL, 200 mg/L) for 24 h, respectively, and the following parameters such as TC, CE, the release of LDH, cell viability and expression levels of Annexin II were detected by colorimetry, Western blot and RT-PCR etc. **Results** Our data showed that the release of LDH and cell viability in exposure to ox-LDL (200 mg/L) for 24 h were increased and decreased significantly and there were statistically significant differences ( $P < 0.01$ ) compared with the n-LDL (200 mg/L) group. However, the release of LDH and cell viability in exposure to 50 mg/L and 100 mg/L of ox-LDL had no remarkable changes ( $P > 0.05$ ). Moreover, the ratio of CE/TC were  $55.0\% \pm 6.7\%$ ,  $61.8\% \pm 4.8\%$  and  $59.6\% \pm 5.2\%$ , respectively exposed to ox-LDL (50, 100 and 200 mg/L) and there were significant differences compared with n-LDL (200 mg/L) ( $P$

[收稿日期] 2015-07-25

[修回日期] 2015-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81360060 和 81070633); 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(20123BCB22005); 江西省自然科学基金资助项目(0640040); 南昌大学“国家大学生创新性实验计划”项目

[作者简介] 温见炳, 硕士研究生, 研究方向为内分泌和代谢性疾病药物药理学, E-mail 为 807450975@qq.com。通讯作者黄起壬, 博士, 博士研究生导师, 研究方向为内分泌和代谢性疾病药物药理学, E-mail 为 qrhuan@ncu.edu.cn。

<0.05), and peaked at the 100 mg/L of ox-LDL. In addition, further results showed that ox-LDL inhibited the expression of Annexin II mRNA and protein in a concentration-dependence manner and the expression levels of Annexin II mRNA and protein were negatively correlated with the ratio of CE/TC ( $r_1 = -0.9374$ ,  $P < 0.05$ ;  $r_2 = -0.9548$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ox-LDL inhibited the expression of Annexin II mRNA and protein in a concentration-dependent manner, which suggested that it may affect the intracellular cholesterol self balance and induce the formation of foam cells.

Annexin II (膜联蛋白 II) 是钙离子依赖的磷脂结合蛋白 Annexins 家族中的一员, 是纤溶酶原 (plasminogen, PLG) 和组织纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, t-PA) 的共同受体, 在内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞等中表达丰富<sup>[1-2]</sup>。Annexin II 基因位于 15 号染色体上, 表达产物为 36 kDa, 在结构中有一个影响磷脂结合能力的保守核心区, 一个决定特异性功能的多变的氨基酸残基尾区<sup>[3]</sup>。文献报道<sup>[3]</sup> Annexin II 主要具有两方面的生理功能, 即激活 PLG 而影响纤溶系统功能, 此外还参与钙依赖的物质转运<sup>[4]</sup>。Annexin II 表达和调控异常与许多疾病有关, 如原发性纤溶亢进综合征、急性早幼粒细胞性白血病及其他恶性肿瘤等<sup>[5]</sup>。

近来研究发现 Annexin II 也参与了动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生和发展<sup>[6]</sup>。有文献报道, 脂蛋白 (a) 可竞争性和 Annexin II 结合, 纤溶酶原激活减少, 纤溶作用降低, 导致纤维蛋白溶解障碍, 促使进行性 As 的发生<sup>[7]</sup>; 另有报道 Annexin II 可通过抑制磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 的活性, 从而抑制炎症介质的产生发挥抗 As 的作用<sup>[8]</sup>。近期研究也提示 Annexin II 可能参与与细胞胆固醇自平衡的调控有关<sup>[9]</sup>。但有关它在泡沫细胞 (foam cell, FC) 形成中表达的改变及其调控细胞内胆固醇自平衡机制目前尚不完全清楚。因此, 本研究拟以 RAW264.7 单核细胞株为研究对象, 通过不同浓度氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)<sup>[10]</sup> 诱导不同时间, 观察 Annexin II 在 ox-LDL 诱导 FC 形成中其表达的改变及其与细胞内胆固醇酯 (cholesterol ester, CE)/总胆固醇 (total cholesterol, TC) 比值的相关性, 从而探讨 Annexin II 在 ox-LDL 诱导泡沫细胞形成中的意义, 为更深入了解 As 的发病机制及寻找抗 As 药物的新靶点打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

DMEM 培养基购自 Gibco BRL 公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 山羊抗小

鼠、抗兔 IgG/HRP (辣根过氧化物酶) 购自北京中杉生物技术有限公司, Annexin II 抗体和  $\beta$ -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 天然低密度脂蛋白 (n-LDL) 购自 Sigma 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Beyotime Institute of biotechnology; 细胞内 TC、游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 和 CE 含量检测试剂盒购自北京中生公司。

### 1.2 ox-LDL 的制备及鉴定

ox-LDL 的制备: 将 n-LDL 置于 10  $\mu$ mol/L  $\text{CuSO}_4$  的 PBS 溶液 ( $\text{pH} = 7.2$ ),  $37^\circ\text{C}$  透析 20 h, 进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL 置于 100  $\mu$ mol/L EDTA 的 PBS 中,  $4^\circ\text{C}$  透析 24 h, 终止氧化。超滤除菌, BCA 法定量, 调蛋白浓度至相应浓度用于实验。ox-LDL 的鉴定: SDS-PAGE, 并通过测定丙二醇含量 (硫代巴比妥法, 参见试剂盒) 以鉴定氧化修饰程度。

### 1.3 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立

RAW264.7 单核细胞接种于平皿后, 先用 160 nmol/L 氟波酯孵育 24 h, 使其诱导分化成巨噬细胞; 24 h 后换入 0.1% 胎牛血清的培养基, 继续培养 48 h, 用含不同浓度 n-LDL 和 ox-LDL 的 10% 无脂蛋白血清培养基分别诱导不同时间。

### 1.4 细胞培养和分组

常规培养 RAW264.7 单核细胞株, 实验共分 4 组: n-LDL 组、50 mg/L ox-LDL 组、100 mg/L ox-LDL 组和 200 mg/L ox-LDL 组。量效关系分析: 将细胞均匀接在 6 孔培养板上, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中静置培养, 待细胞长至 90% 汇合度时, 分别加入不同浓度的 ox-LDL (50、100 和 200 mg/L) 孵育 24 h; 时效关系分析: 将细胞均匀接在 6 孔培养板上, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中静置培养, 待细胞长至 90% 汇合度时, 加入 100 mg/L ox-LDL 分别孵育细胞 12、24 及 48 h, 以选最佳作用时间。

### 1.5 细胞内 TC、FC 和 CE 含量检测

用橡皮刮刮下诱导的泡沫细胞, PBS 洗涤 3 次, 重悬于 0.5 mL 磷酸钠缓冲液 ( $\text{pH} > 7.4$ ) 中, 超声波裂解细胞 1 min, 按照 TC、FC 和 CE 检测试剂盒说明书方法测定 TC、FC 和 CE 含量。细胞内 TC、FC 和 CE 的含量分别用每克蛋白所含 TC、FC 和 CE 的量

来表示(1 mg/g pro)。

### 1.6 RT-PCR 检测 Annexin II mRNA 水平

按我们以前报道的方法<sup>[11]</sup>略加改进后进行。引物由上海生物工程有限公司合成。Annexin II sense: 5'-TCCACCATGTCTACTGTTACAG-3', antisense: 5'-CCCTTTGCCAGGGCA ACCATCA-3', 536 bp;  $\beta$ -actin sense: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3', antisense: 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3', 268 bp。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L, 其中 cDNA 为 5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1.0  $\mu$ L, 2 $\times$ Tag 酶为 12.5  $\mu$ L, 再用无菌三蒸水补至 25.0  $\mu$ L。PCR 循环参数为 30, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 扩增 Annexin II 为 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 扩增  $\beta$ -actin 为 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取扩增产物 6  $\mu$ L 上样, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 在透射紫外光分析仪下摄影, 并在电脑上用 Image Tool 图像处理软件进行处理。

### 1.7 Western blot 检测 Annexin II 蛋白水平

按我们以前报道的方法<sup>[12]</sup>略加改进后进行。收集处理后的细胞, 用预冷的 PBS 洗内皮细胞 3 遍。加预冷的裂解液, 4 $^{\circ}$ C 裂解 30 min 并转移至预冷的 Eppendorf 管中。离心后, 取上清, 收集蛋白, BCA 法测定浓度。取蛋白上样量为 30  $\mu$ g, 经 SDS-PAGE 凝胶, 电转致 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次。将膜放入抗 Annexin II 的一抗中 (1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 将膜放入相应的二抗 (1:2000) 中, 室温平摇 2 h 后, 漂洗 3 次, 每次 20 min, 用 ECL 化学发光法进行检测。将曝光条带进行 X 光胶片扫描后, 使用 Quantity One 图形分析软件分析条带的光密度值除以对应的内参蛋白条带  $\beta$ -actin 的光密度, 再以对照组所得光密度比值为参照 (定为 1), 其他各组的光密度比值除以对照组光密度比值后所得百分数作为蛋白表达水平。

### 1.8 油红 O 染色

按我们以前报道的方法<sup>[13]</sup>略加改进后进行。选择 90% 汇合且生长良好的诱导细胞, PBS 溶液轻轻洗两遍, 加入新鲜配制的 10% 多聚甲醛固定 30 min; 吸去固定液, 加入新鲜配置的 0.5% 油红 O 异丙醇溶液, 室温下染色 60 min; 吸净染色液, 用 PBS 洗两遍, 吸净液体, 可用滤纸吸干水分, 置于光学显微镜下观察油脂分布情况。

### 1.9 比色法测定 LDH 释出量

参照碧云天的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒性检测试剂盒说明书, 按照实验需要给

予适当药物处理 (如加入 0~10  $\mu$ L 左右特定的药物刺激, 设置不同浓度、不同处理时间, 对照孔中需加入适当的药物溶剂对照), 继续按常规培养。到预定的检测时间点前 1 h, 从细胞培养箱里取出细胞培养板, 在“样品最大酶活性对照孔”中加入试剂盒提供的 LDH 释放试剂, 加入量为原有培养液体积的 10%。加入 LDH 释放试剂后, 反复吹打数次混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育。到达预定时间后, 将细胞培养板用多孔板离心机 400 g 离心 5 min。分别取各孔的上清液 120  $\mu$ L, 加入 96 孔板相应孔中, 随即进行样品测定。

### 1.10 MTT 法检测细胞存活率

参照 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒, 具体方法如下: 收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 100  $\mu$ L, 铺板使待测细胞调密度 1 000~10 000 孔 (边缘孔用无菌 PBS 填充)。5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 孵育至细胞贴壁, 加入浓度梯度的药物, 原则上, 细胞贴壁后即可加药, 半天时间, 一般 5~7 个梯度, 每孔 100  $\mu$ L, 设 3~5 个复孔, 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h~72 h, 倒置显微镜下观察。每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液 (5 g/L, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h。若药物与 MTT 能够反应, 可先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲洗 2~3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液。终止培养, 小心吸去孔内培养液。每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷, 摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 酶联免疫检测仪在 570 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔即空白组 (培养基、MTT、二甲基亚砷)、对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。

### 1.11 统计学方法

各实验组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件进行方差齐性检验、单因素方差分析, 组间比较用 LSD 法; 两个变量间相关性分析采用 Pearson 分析, 取检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 ox-LDL 的鉴定

LDL 中脂质过氧化物 (LPO) 含量为每克胆固醇 3~5  $\mu$ mol TBARS 被定义为轻度修饰。n-LDL 经 10  $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 溶液处理 20 h 后, LPO 含量不断增加, 测得每克胆固醇的 TBARS 含量达到 19.3 $\pm$ 1.53  $\mu$ mol, 其颜色由淡黄变为乳白, 根据定义应不属于轻度修饰, 达到氧化程度。而未经氧化修



饰的 n-LDL 测得每克胆固醇的 TBARS 含量为  $2.1 \pm 0.34$ , 结果提示 n-LDL 被成功氧化修饰(图 1)。

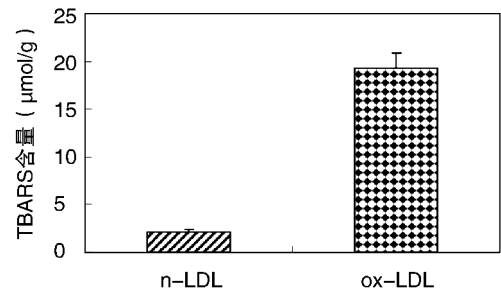


图 1. ox-LDL 的鉴定  
Figure 1. Identification of ox-LDL

2.2 不同浓度 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞存活率和 LDH 释出量的影响

仅 200 mg/L ox-LDL 组细胞活力显著降低, LDH 释出量显著升高 ( $P<0.01$ ; 表 1); 其他浓度的 ox-LDL 对细胞活力和 LDH 释出量无明显影响, 说明 ox-LDL (100 mg/L) 和 ox-LDL (50 mg/L) 对细胞的毒性较小, 可考虑用于后续实验。

表 1. 不同浓度 ox-LDL 对细胞活力和 LDH 释出量的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 1. Effect of different concentration of ox-LDL on cell viability and the release of LDH ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分 组	细胞活力	LDH (U/L)
n-LDL (200 mg/L)	100.00% $\pm$ 0.00%	456 $\pm$ 39
ox-LDL (50 mg/L)	89.36% $\pm$ 4.52%	478 $\pm$ 45
ox-LDL (100 mg/L)	85.31% $\pm$ 5.24%	493 $\pm$ 48
ox-LDL (200 mg/L)	74.87% $\pm$ 4.28% <sup>a</sup>	546 $\pm$ 32 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与 n-LDL (200 mg/L) 组比较。

2.3 不同浓度 ox-LDL 对细胞内 CE/TC 比值的影响

不同浓度的 ox-LDL (50、100、200 mg/L) 分别孵育细胞 24 h 后, 细胞内 CE/TC 分别为  $55.0\% \pm 6.7\%$ 、 $61.8\% \pm 4.8\%$  和  $59.6\% \pm 5.2\%$ , 与 n-LDL (200 mg/L) 的  $28.0\% \pm 3.5\%$  比较差异均有显著性 ( $P<0.05$ ), 其中 100 mg/L ox-LDL 作用最显著 (表 2)。

2.4 ox-LDL 不同孵育时间对细胞内 CE/TC 比值的影响

100 mg/L ox-LDL 分别孵育细胞 12 h、24 h 和 48 h, CE/TC 分别是  $51.4\% \pm 5.6\%$ 、 $61.1\% \pm 4.5\%$  和  $63.4\% \pm 5.8\%$ 。与 0 h 比较具有显著性或非常显著

性差异 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 其中 ox-LDL 孵育 24 h CE/TC 基本达到峰值(表 3)。

表 2. 不同浓度 ox-LDL 对细胞内 CE/TC 比值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2. Effect of different concentrations of ox-LDL on the intracellular CE/TC ratio ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分 组	TC (mg/g)	FC (mg/g)	CE (mg/g)	CE/TC
n-LDL (200 mg/L)	235.6 $\pm$ 18.7	169.5 $\pm$ 15.3	66.1 $\pm$ 8.9	28.0% $\pm$ 3.5%
ox-LDL (50 mg/L)	495.8 $\pm$ 39.5 <sup>a</sup>	223.1 $\pm$ 25.9 <sup>b</sup>	272.7 $\pm$ 24.3 <sup>a</sup>	55.0% $\pm$ 6.7% <sup>a</sup>
ox-LDL (100 mg/L)	567.3 $\pm$ 52.8 <sup>b</sup>	216.5 $\pm$ 20.4 <sup>a</sup>	350.8 $\pm$ 31.5 <sup>b</sup>	61.8% $\pm$ 4.8% <sup>b</sup>
ox-LDL (200 mg/L)	584.6 $\pm$ 61.3 <sup>b</sup>	236.2 $\pm$ 24.9 <sup>b</sup>	348.4 $\pm$ 34.1 <sup>b</sup>	59.6% $\pm$ 5.2% <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与 n-LDL 组比较。

表 3. ox-LDL 孵育不同时间对细胞内 CE/TC 比值的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 3. Effect of different time on the CE/TC ratio of cells incubated with ox-LDL ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分 组	TC (mg/g)	FC (mg/g)	CE (mg/g)	CE/TC
0 h	212.5 $\pm$ 19.8	185.5 $\pm$ 18.6	27.0 $\pm$ 3.5	28.0% $\pm$ 3.5%
12 h	483.7 $\pm$ 37.8 <sup>a</sup>	235.2 $\pm$ 24.8 <sup>a</sup>	248.5 $\pm$ 25.3 <sup>a</sup>	51.4% $\pm$ 5.6% <sup>a</sup>
24 h	586.4 $\pm$ 61.5 <sup>b</sup>	227.8 $\pm$ 24.5 <sup>a</sup>	358.6 $\pm$ 33.8 <sup>b</sup>	61.1% $\pm$ 4.5% <sup>b</sup>
48 h	579.8 $\pm$ 51.7 <sup>b</sup>	212.1 $\pm$ 23.0 <sup>b</sup>	367.4 $\pm$ 37.2 <sup>b</sup>	63.4% $\pm$ 5.8% <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与 0 h 组比较。

2.5 油红 O 染色结果

n-LDL 孵育 24 h, 细胞浆内只见少量脂粒; 而 100 mg/L ox-LDL 孵育 24 h 后, 细胞内红色颗粒明显增多, 提示 RAW264.7 已积聚了大量的 CE (图 2)。

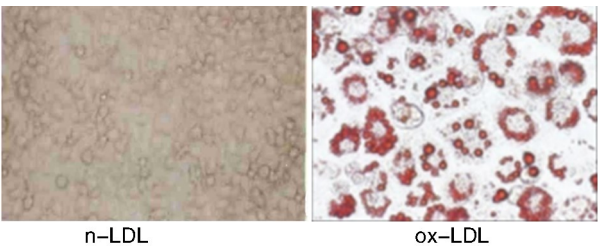


图 2. 泡沫细胞鉴定 (油红 O 染色, 100 $\times$ )  
Figure 2. Foam cell identification results (oil red O staining, 100 $\times$ )

2.6 不同浓度 ox-LDL 对泡沫细胞内 Annexin II 表达的影响

不同浓度 ox-LDL (50、100 和 200 mg/L) 孵育细胞 24 h 后, Annexin II mRNA 和蛋白的表达水平呈浓

度依赖性降低,说明 ox-LDL 呈浓度依赖性抑制 Annexin II 的表达(图 3)。

2.7 Annexin II mRNA 和蛋白的表达与 CE/TC 比值的相关性

不同浓度的 ox-LDL(50、100 和 200 mg/L)孵育

细胞 24 h 后,Annexin II mRNA 和蛋白的表达水平与 CE/TC 比值的改变呈负相关( $r_1 = -0.9374, P < 0.05; r_2 = -0.9548, P < 0.05$ ;图 4)。

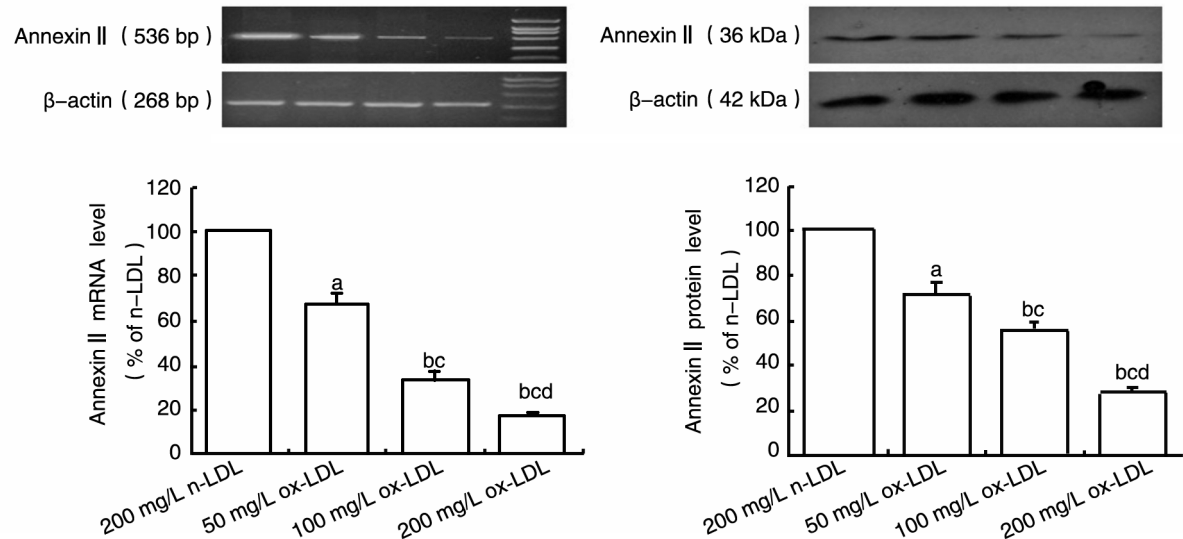


图 3. 不同浓度 ox-LDL 对泡沫细胞内 Annexin II 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ ) a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ ,与 n-LDL 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL (50 mg/L)组比较; d 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL (100 mg/L)组比较。

Figure 3. Effect of different concentration of ox-LDL on the expression of Annexin II in foam cells( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

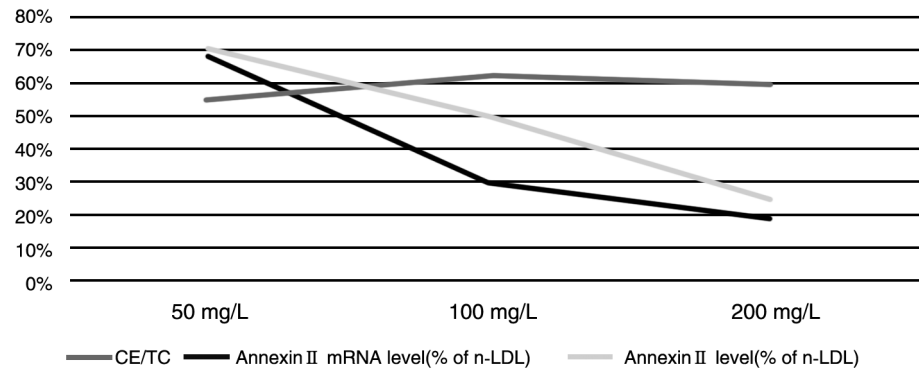


图 4. Annexin II mRNA 和蛋白的表达与 CE/TC 比值的相关性

Figure 4. The expression changes of annexin II mRNA and protein were negatively correlated with the CE/TC

3 讨论

本研究先对 n-LDL 进行氧化修饰,继而制备 ox-LDL,并在此基础上建立单核巨噬细胞源性泡沫细胞模型,最后观察 Annexin II 对 RAW264.7 单核巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响。结果显示:n-LDL 经过处理后 LPO 含量不断增加,测得每克胆固醇的 TBARS 含量明显增高,脂质发生过氧化,脂质

过氧化的过程中发生了 ROS 氧化生物膜的过程,即 ROS 与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应形成脂质过氧化产物,从而使细胞膜的流动性和通透性发生改变,最终导致细胞结构和功能的改变,本实验结果显示 LDL 被成功氧化修饰成 ox-LDL。

本研究结果得出随着 TC、CE 含量的升高以及

胞浆脂滴的形成,我们可以确定单核巨噬细胞源性泡沫细胞模型建立成功。

有文献报道 ox-LDL 能够显著以时间依赖的方式诱导细胞内 CE 和 TC 升高,具有细胞毒性可以引起泡沫细胞坏死,形成粥样斑块的脂质核心加速斑块的不稳定性,因此考虑到 ox-LDL 的细胞毒性,本研究采用了比色法测定 LDH 释出量和 MTT 法检测细胞存活率,结果显示仅 200 mg/L ox-LDL 组细胞活力显著降低,LDH 释出量显著升高,造成严重的细胞毒性,其他浓度的 ox-LDL 对细胞活力和 LDH 释出量无明显影响,这也说明随着 ox-LDL 的浓度越来越大,细胞活力呈下降趋势的,LDH 释出量也是逐步上升的,LDH 的释出量越大就说明细胞损伤越严重,细胞毒性也就越大。当 ox-LDL 浓度大到 200 mg/L 时造成的严重细胞毒性就会导致泡沫细胞坏死,不利于后续实验的进行和发展。

由 ox-LDL 的不同浓度对细胞 CE/TC 比值的影响结果可以看出 ox-LDL 组 TC、FC、CE 及 CE/TC 均较 n-LDL 组有显著增加,说明 ox-LDL 可以增加了泡沫细胞内胆固醇的聚集,促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL 而形成泡沫细胞<sup>[14]</sup>,并且得出 ox-LDL 对 CE/TC 的量效关系,即在一定范围内,ox-LDL 浓度越大,CE/TC 也越高,巨噬细胞越容易吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞从而引发 As 疾病。由时效关系可以得出 ox-LDL 孵育时间的延长,CE/TC 也越来越高,24 h 时,CE/TC 基本达到峰值。

通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 Annexin II mRNA 和蛋白的表达水平可以看出 Annexin II mRNA 和蛋白的表达水平呈浓度依赖性降低,说明 ox-LDL 呈浓度依赖性抑制 Annexin II 的表达,本结果提示 Annexin II 可能影响细胞内胆固醇自平衡从而诱导泡沫细胞形成,ox-LDL 正是通过抑制 Annexin II 表达从而阻碍细胞内胆固醇外排(胞吐、出胞),使得胆固醇负荷细胞的胆固醇过度聚集,TC、CE 含量不断升高,从而使 CE/TC 比值升高,促进最终地形成泡沫细胞<sup>[15]</sup>。而泡沫细胞又是 As 发生发展的关键环节,这为进一步探索预防和治疗 As 性心脑血管疾病提供了一个新的方向,可以通过一些途径和方法促进增加 Annexin II 的表达,而影响细胞内胆固醇自平衡,这为进一步阐明泡沫细胞形成的分子机制,更深入了解 As 的发病机制及寻找抗

As 药物的新靶点奠定基础。

综上所述,本研究认为 ox-LDL 增加了泡沫细胞内胆固醇的聚集,在一定范围内,ox-LDL 浓度越大,CE/TC 也越高,越容易促进巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞从而导致 As 发病;ox-LDL 呈浓度依赖性降低 Annexin II 表达,通过抑制 Annexin II 的表达而影响细胞内胆固醇自平衡而参与 ox-LDL 诱导泡沫细胞形成。这为更深入了解 As 的发病机制及寻找抗 As 药物的新靶点打下基础,为临床上 As 提供了新的治疗方向。

#### [参考文献]

- [1] 宋 魏,仇晓菲. Annexin II 与肿瘤的研究进展[J]. 医学综述,2008,14(6): 851-853.
- [2] 田 伟,栗超. 纤溶酶原激活物抑制物与动脉粥样硬化及急性冠脉事件的关系[J]. 中国医药导报,2014,22:165-168.
- [3] 张丽意,江森,李霞,等. 恶性血液病患者骨髓 Annexin II 基因的表达[J]. 中国实验血液学杂志,2009,17(3): 529-532.
- [4] 郭变琴,文阳安,陈婷梅. 特异性小干扰 RNA 沉默 Annexin II 基因表达对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭迁移力的影响[J]. 重庆医科大学学报,2009,34(8): 984-987.
- [5] 李瑞君,李道明,谷晓广,等. Annexin II、Caspase-3 蛋白在卵巢癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药,2009,49(39): 17-19.
- [6] 张晓晖. Annexin II 介导的纤维蛋白溶解调控机制研究[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册),2002,22(5): 503-505.
- [7] 刘宁飞. 基于心脑血管动脉硬化症的中医治未病研究[J]. 亚太传统医药,2013,08: 143-144.
- [8] 吴世陶. Lp-PLA2、Annexin A1、Bax 与人颈动脉粥样硬化斑块的关系研究[D]. 郑州大学,2013.
- [9] 于 飞,龙集智,刘晓玲,等. 一种新型 PPAR $\gamma$  激动剂对人肾癌细胞增殖抑制的实验研究[J]. 现代生物医学进展,2015,15: 2 851-854+2 862.
- [10] 杜丽根,邱健,陈恩平,等. 冠状动脉轻度狭窄患者动脉弹性与 ox-LDL 的相关性研究[J]. 河北医药,2015,(8): 1 186-188.
- [11] Li Q, Huang QR. et al. Involvement of anion exchanger-2 in apoptosis of endothelial cells induced by high glucose through an mPTP-ROS-Caspase-3 dependent pathway[J]. Apoptosis, 2010,15(6): 693-704.
- [12] Zhang Y, He M., Huang QR. Pharmacological activation of PPAR $\gamma$  ameliorates vascular endothelial insulin resistance via a non-canonical PPAR $\gamma$ -dependent nuclear factor-kappa B trans-repression pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 754: 41-51.
- [13] Zhong XJ, Shen XD, Huang QR. Osteopontin-induced brown adipogenesis from white preadipocytes through a PI3K-AKT dependent signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 459: 553-559.
- [14] 张 良,韩丹,赵诗萌,等. Ox-LDL 与单核巨噬细胞相互作用促进动脉粥样硬化形成[J]. 中国比较医学杂志,2013,04: 31-36.
- [15] 刘素珍,黄芩苕对 ox-LDL 导致动脉粥样硬化的干预作用[J]. 医学信息,2015,(11): 360-360.

(此文编辑 李小玲)