

# 阿司匹林调节 Caveolin-1/Caveolin-2 的表达对 ox-LDL 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化的影响

卢琼 韩伟 尹立 石哲宇 郭莞 (通讯作者)  
(湖南医药学院怀化 湖南 418000)

**摘要:** 目的: 探讨阿司匹林 (Aspirin) 对氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞小窝蛋白-1 (Caveolin-1, Cav-1)、小窝蛋白-2 (Caveolin-2, Cav-2) 表达及巨噬细胞泡沫化进程的影响及其机制。方法: 小鼠腹腔注射巯基乙醇酸盐培养基刺激其腹腔巨噬细胞产生增加, 提取小鼠腹腔灌洗中的原代巨噬细胞培养, 予以不同浓度的阿司匹林干预 ox-LDL 诱导巨噬细胞泡沫化进程。采用免疫蛋白印迹法 (western blot) 检测 Cav-1、Cav-2、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的表达。通过油红 O 染色检测腹腔巨噬细胞内脂滴生成情况。结果: 与模型组相比, 阿司匹林可明显上调 Cav-1、Cav-2 蛋白的表达, 抑制 TNF- $\alpha$  的表达, 且阿司匹林上调 Cav-1、Cav-2 表达后, 巨噬细胞内脂滴生成明显减少。结论: 阿司匹林可通过上调 Cav-1、Cav-2 的表达, 来抑制 ox-LDL 诱导腹腔巨噬细胞的泡沫化, 从而发挥其抗动脉粥样硬化作用, 该作用或与抑制 TNF- $\alpha$  等炎症因子释放与表达有关。  
**关键词:** 阿司匹林; Cav-1; Cav-2; 巨噬细胞; 炎症因子

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是累及体循环系统动脉内膜的疾病, 是临床上冠心病的主要原因。泡沫细胞 (foam cells) 是 As 斑块内的特征性病理细胞, 主要来源于血液中的单核巨噬细胞与血管中膜平滑肌细胞, 泡沫细胞的形成对 As 的发生、演变与转归有十分重要的影响。As 发病机制十分复杂, 多项研究表明其发病与脂质代谢障碍, 血管内皮细胞损伤、增殖、分化, 血管平滑肌细胞增殖迁移以及炎症因子干扰等多因素作用有密切联系, 其中由 Ross 提出的“炎症反应学说”目前接受度最为广泛<sup>[1]</sup>。该学说认为由于 As 发生发展过程中始终伴随有炎症反应, 慢性炎症侵袭导致血管损伤可能是引起 As 的重要原因。

小窝 (Caveolae) 是细胞膜上富含胆固醇的烧瓶状内陷结构, 直径约为 50-100nm, 具有细胞信号转导、胞吞、维持细胞膜完整性等多种功能<sup>[2]</sup>, 有研究表明其与 As、肿瘤、慢性梗阻性肺疾病等疾病的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。小窝蛋白 (Caveolin, Cav) 是细胞膜 Caveolae 的标志蛋白, 主要有 Cav-1、Cav-2 及小窝蛋白-3 (Caveolin-3, Cav-3) 三种亚型, 其中 Cav-1/Cav-2 常形成同源寡聚体共同表达于巨噬细胞、内皮细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞等多种细胞, 在细胞信号转导、膜运输、氧化应激调节、胆固醇稳态和脂质运输等过程发挥了重要作用<sup>[4]</sup>。

阿司匹林是常见的非甾体类抗炎药, 在预防血管疾病中发挥着重要作用。动物研究表明阿司匹林具有稳定动脉粥样斑块的作用<sup>[5]</sup>。但其调节 As 的具体机制尚未探明。本课题主要通过研究在 ox-LDL 刺激作用下, 阿司匹林对腹腔巨噬细胞 Cav-1、Cav-2 表达的调控, 分析其对巨噬细胞泡沫化进程的影响, 探讨其抗 As 的作用机制。

## 1 材料与与方法

1.1 材料 C57BL6 小鼠 (南京君科生物工程有限公司); 巯基乙醇酸盐培养基 (Solarbio), 阿司匹林 (Selleck), ox-LDL (广州奔源生物科技有限公司), RPMI 1640 培养基 (以色列 BI); 胎牛血清 (普诺赛); 细胞裂解液 (碧云天生物技术公司); 红细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术公司); Cav-2、TNF- $\alpha$  及  $\beta$ -actin 一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗 (武汉博士德生物工程公司); 油红染色液 (湖南医药学院第一附属医院病理科提供)。

## 1.2 小鼠原代腹腔巨噬细胞提取

实验前 3 天予以小鼠腹腔注射 3% 巯基乙醇酸盐培养基 2 ml/只, 促使小鼠腹腔巨噬细胞生成增加。小鼠吸入麻醉后断颈处死, 放入 75% 酒精浸泡 1-2 分钟, 移入超净台中, 固定于解剖台上, 用手术剪剪开皮肤, 暴露出腹膜, 用注射器吸 10ml 预冷无菌 PBS 液注入腹腔中, 用手指轻揉腹部, 使液体在腹腔内充分流动。用针头轻挑刺入腹腔, 吸取灌洗液。按 1:1 的比例加入红细胞裂解液,

1000r/min 4℃ 离心 10 分钟, 弃去上清液, 重复两次, 加入 10% 胎牛血清的 1640 培养基重悬。5% CO<sub>2</sub> 温箱孵育 2 h 后, 换液, 并用 RPMI1640 培养基洗 1-2 次, 弃去未粘附细胞, 贴壁细胞为单层的巨噬细胞。

## 1.3 细胞培养和分组

培养条件: 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 饱和适度培养箱中培养。为明确阿司匹林对 Cav-1、Cav-2 的影响, 分为四组: 对照组、模型组 (ox-LDL 50mg/L)、低浓度药物处理组 (阿司匹林 75  $\mu$ mol/L+ox-LDL 50mg/L 组)、高浓度药物处理组 (阿司匹林 150  $\mu$ mol/L+ox-LDL 50mg/L 组); 为明确阿司匹林对巨噬细胞荷脂的影响, 分为三组: 对照组、模型组 (ox-LDL 50mg/L)、药物处理组 (阿司匹林 150  $\mu$ mol/L+ox-LDL 50mg/L 组)。

## 1.4 Western blot 检测 Cav-2 及 TNF- $\alpha$ 蛋白表达

分组处理如 1.3 示。培养 48h 后收集细胞, 加细胞裂解液冰上裂解 30 min, 4℃, 12000 r/min 离心 30 min, 取上清, 与 5 $\times$  蛋白上样缓冲液混合后煮沸 10 min。将样品在 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺胶中进行电泳, 随后将蛋白转印至 PVDF 膜上用含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭处理 2h, 加一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗, 室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次, 显影。 $\beta$ -actin 为内参, Image J 软件分析条带的灰度值。

1.5 油红 O 染色检测腹腔巨噬细胞内脂滴生成情况 细胞正常培养 48h 后, PBS 洗 1-2 遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 弃去固定液后用 PBS 洗 2-3 遍, 加入油红染色液 37℃ 染色 30min, 弃去染色液后用 PBS 洗 3 遍, 显微镜下观察拍照。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 所有数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 所有实验均重复 3 次, 多组间数据比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 阿司匹林对 ox-LDL 诱导的腹腔巨噬细胞泡沫化过程中 Cav-2 及 TNF- $\alpha$  蛋白表达影响

阿司匹林与 ox-LDL 共同孵育腹腔巨噬细胞 48h, Western blot 结果显示 (图 1A), 与对照组相比, 模型组采用 ox-LDL 50mg/L 处理细胞 48h, Cav-1、Cav-2 的表达水平明显降低, TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显降低 (P < 0.01); 而采用 75、150  $\mu$ M 阿司匹林组预处理可上调被 ox-LDL 抑制的 Cav-1、Cav-2 的蛋白表达, 而呈现剂量依赖性抑制 TNF- $\alpha$  蛋白表达的作用。

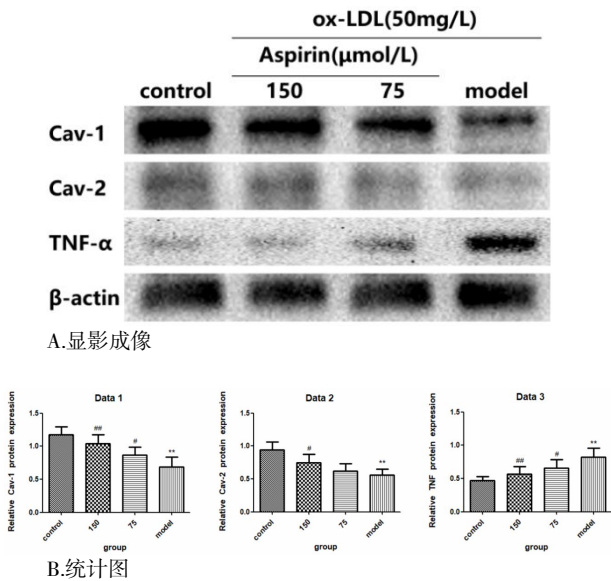


图1 Western blot检测不同浓度阿司匹林+ox-LDL处理组对腹腔巨噬细胞 Caveolin-1、Caveolin-2及TNF-α蛋白表达的影响。A. 显影成像,B.统计图。

(\*: P < 0.01, 与对照组比较; #: P < 0.05, #: P < 0.01, 与模型组比较)

2.2 ox-LDL 诱导的腹腔巨噬细胞泡沫化过程中,阿司匹林对细胞内脂滴生成的影响。油红O染色结果显示,50mg/L ox-LDL 孵育腹腔巨噬细胞48h组,细胞体积胀大,胞浆内大量脂滴存在;而150 μM阿司匹林预先处理再加ox-LDL孵育细胞48h组则细胞体积略有增大,但脂滴生成较之模型组明显减少(图2)。

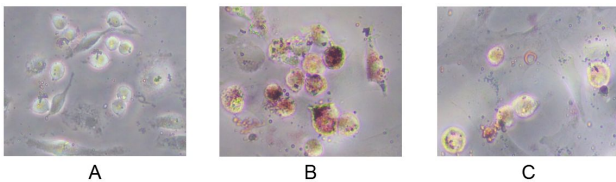


图2.ox-LDL和阿司匹林处理腹腔巨噬细胞后细胞内脂滴的变化。A. 对照组(ox-LDL处理0h),B. ox-LDL处理48h组,C. ox-LDL+阿司匹林处理48h组(x400)

3 讨论

As是多种心脑血管疾病的病理基础,是常见的严重危害人类健康的疾病。炎症反应是贯穿于As全过程的病理改变,在粥样斑块处存在大量巨噬细胞可以分泌各种炎症因子,如TNF-α、基质

金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等,炎症因子的表达增加进一步加剧了粥样斑块局部的炎症反应与斑块的不稳定性,导致急性心血管事件发生<sup>[6]</sup>。Cav-1是维持Caveolae结构的主要骨架蛋白,具有结合、运载胆固醇的功能并促进细胞内游离胆固醇的流出,对维持正常细胞胆固醇的稳态起着重要调节作用<sup>[7]</sup>,还有研究发现Cav-1能调节炎症细胞及内皮细胞中的信号传导,继而影响炎症反应过程<sup>[8]</sup>,而炎症又具有促进脂质沉积的作用,二者相辅相成共同推进了As的病理进程。Cav-2做为Cav-1的分子伴侣,有调节质膜附着的小窝的数量的作用<sup>[9]</sup>,有文献指出Cav-2在秀丽隐杆线虫肠道细胞表面发挥吸收脂质的作用参与脂质调节<sup>[10]</sup>,Cav-2发生点突变或位置改变,均可导致细胞胆固醇流出受阻,细胞内脂滴形成<sup>[11]</sup>。

本文以小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象,发现ox-LDL刺激作用下腹腔巨噬细胞的Cav-1/Cav-2表达水平均明显降低,采用阿司匹林干预后,随着阿司匹林浓度的增加,Cav-1/Cav-2的表达均呈不同程度的升高,因此,我们认为阿司匹林可呈剂量依赖性促进Cav-1/Cav-2的表达。研究还发现,阿司匹林同时呈剂量依赖性抑制了TNF-α的表达,提示阿司匹林通过上调Cav-1/Cav-2的表达,抑制ox-LDL诱导腹腔巨噬细胞中泡沫化的进程可能与其的抗炎作用密切相关,其他相关机制我们还需要进一步的研究。

综上所述,本课题组证实阿司匹林能够上调Cav-1/Cav-2的表达,抑制ox-LDL诱导腹腔巨噬细胞中泡沫化,且这一作用可能与其抑制炎症因子表达有关,通过药物上调Cav-1/Cav-2的表达也许是延缓As疾病的一个新的药物靶点。

参考文献:

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126
- [2] 王彩薇,王志宇,王胜奇等.小窝蛋白-1在肿瘤发生发展中的作用[J].医学综述,2020,26(24):4851-4856.
- [3] 宋兴隆,满万荣,吴德喜等.小窝及其介导内吞的心血管研究进展[J].心脏杂志(Chin Heart J),2022,34(4):476-478.
- [4] 冯祺论,唐晓鸿.小窝蛋白1在血管重塑中的研究进展[J].中华高血压杂志,2019,27(2):136-139.
- [5] 沈卫东.阿司匹林联合他汀类药物对脑梗死患者颈动脉粥样斑块的影响[J].中国社区医师,2017,33(28):34-36.

【基金项目】1. 湖南省教育厅科学研究项目(编号19C1329)  
2. 怀化市科技计划项目(编号2013-32)  
3. 湖南医药院校级科学研究项目(编号2013KY11)