

高胆固醇上调 Caveolin-1 的表达*

冉胤威¹ 杜俊蓉^{1,△} 白波¹ 张蓉¹ 钱忠明²

¹(四川大学 华西药学院 药理教研室, 成都 610041)

²(香港理工大学 应用生物及化学科技学系, 中国香港)

摘要 为了研究高胆固醇血症对血管内皮细胞膜上 Caveolin-1 表达的影响, 用免疫组织化学的方法检测了高胆固醇血清刺激的培养人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 细胞以及高脂血症大鼠动脉内皮上 Caveolin-1 表达量的动态变化。发现高胆固醇可上调体内内外皮细胞膜上 Caveolin-1 的表达。在高血脂模型初期, Caveolin-1 的表达量与高血脂水平的维持时程成正相关; 在高胆固醇血症模型后期, 血管内皮细胞膜上 Caveolin-1 的表达略有下降。

关键词 胞膜窖 窖蛋白 高胆固醇血症 免疫组织化学

High Cholesterol Level Upregulate the Expression of Caveolin-1

Ran Yinwei¹ Du Junrong^{1,△} Bai Bo¹ Zhang Rong¹ Qian Zhongmin²

¹(Department of Pharmacology, West China School of Pharmacy of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

²(Department of Applied Biology and Chemical Technology of Hongkong Polytechnic University, Hongkong, China)

Abstract To study the influence of hypercholesterolemia with caveolin-1 on the plasmalemma of vascular endothelium, we used the methods of immunohistochemistry to detect the dynamic changes of caveolin-1 in cultured ECV-304 cells which were stimulated high cholesterol serum and the arterial endothelium of hypercholesterolemia rats. It is resulted that high cholesterol level can upregulate the expression of caveolin-1 both in vitro and in vivo. In the initial stage of hypercholesterolemia model, the expression of caveolin-1 increased as the time of high cholesterol level added, but in the later period it was decreased slightly.

Key words Caveolea Caveolin-1 Hypercholesterolemia Immunohistochemistry

1 引言

胞膜窖 (Caveolea) 是细胞膜上呈“烧瓶样”的内陷结构, 主要负责细胞膜表面信号转导的区分与整合, 与多种器官的生理和病理状况有着密切的关系。与信号传导有关的受体、激酶及联接蛋白质等都在 Caveolea 区域高度富集, 当配体与受体结合后, Caveolea 顶端融合, 配体-受体复合物被胞饮入胞浆内, 然后将信号传入细胞核。Caveolea 的主要结构蛋白是窖蛋白 (Caveolin), 作为 Caveolea 的标志性蛋白, Caveolin 与多种信号分子相结合形成复合体, 调节各信号分子的“激活”与“失活”状态, 进而控制细胞跨膜信号转导的发生。经研究发现 Caveolin 分为三种亚型: Caveolin-1、Caveolin-2 和 Caveolin-3, 其中 Caveolin-1 和 Caveolin-2 主要在脂肪细胞、内皮细胞和纤维原细胞表达, 而 Caveolin-3 则特异性

地在肌肉细胞表达^[1-3]。同时, 有研究显示高胆固醇可以上调培养的牛动脉血管细胞 Caveolin 的表达^[4], 而高胆固醇血症目前被确认为引起动脉粥样硬化的主要原因^[5], 血清胆固醇浓度的大幅升高会抑制血管内皮源性的舒张反应, 而这很有可能是 Caveolin-1 充当了内皮源性一氧化氮合酶基因 (eNOS) 抑制剂的原因。因此, 弄清楚 Caveolin-1 的表达、功能及生物学特性与血管性疾病的关系, 对于该类疾病的诊断及治疗将有非常积极的意义。本文报道了高胆固醇血症对大鼠血管内皮细胞及体外人脐静脉内皮细胞上 Caveolin-1 表达的影响。

2 材料和方法

2.1 试剂

Anti-caveolin-1 polyclonal IgG 购于美国 Santa 公司, RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶及小牛血清购于 Hyclone 公司, 胆固醇为上海伯奥生物科技有限公司生产, 丙基硫氧嘧啶片购于上海朝辉药业公司,

* 国家自然科学基金资助项目 (3700900)

△ 联系人, E-mail: dujr@mail1.hotmail.com

猪油为市售,血脂检测试剂盒购于四川迈克科技有限公司, Nikon & Spot 图像分析仪购于美国

2.2 动物和细胞

人脐静脉内皮细胞株 (ECV-304 细胞株) 由中科院上海细胞所提供。SD 大鼠 36 只, 雌性, 150~250 g 购于华西医大基础动物房。雄性日本大耳白兔, 2~2.5 Kg, 成都输血所动物中心。

2.3 高脂饲料的配制

按每只大鼠饲料 40 g/d 计算, 给予胆固醇猪油和丙基硫氧嘧啶分别占总食量的 3%、10% 和 0.2%, 即将上述食料混合后每只大鼠每天灌胃一次同时喂饲普通饲料。

2.4 高血脂大鼠模型的建立

36 只大鼠分成 6 组, 每组 6 只。分别于喂饲高脂饲料的 0、7、10、14、18、21 d 时放血处死一组动物, 同时取出主动脉血管条, 10% 甲醛固定, 常规乙醇脱水, 石蜡包埋, 同时取血样, 常规分离血清测定低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及血清总胆固醇 (TC)。

2.5 高脂兔血清的制备

取健康日本大耳白雄性兔, 喂饲普通饲料一周后耳缘静脉取血, 分离血清测定血清总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)。从第二周起按 0.2 g 胆固醇 + 2 ml 猪油 / kg 体重 / d 灌胃, 同时喂饲普通饲料。喂饲高脂饲料 8 周后处死动物, 主动脉取血, 分离血清测定血清总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C), 血清于 -20°C 保存。

2.6 细胞培养

取对数生长期 ECV-304 细胞株, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化后用 1640 培养基混悬, 活细胞计数。接种 4×10^5 细胞到载玻片上, 置于 6 孔细胞培养板中, 加入 1640 培养基 (10% 小牛血清) 2 ml, 在 37°C 及 5% CO_2 的条件下培养。待细胞生长至 50% 融合时弃去含小牛血清的培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 再加入 1 ml 无血清 1640 培养基和 1 ml 高脂兔血清, 在 37°C 及 5% CO_2 的条件下培养。分别按 0、12、24、48、72 h 的时间点取细胞, 用 -20°C 丙酮固定 20 min 后 -20°C 保存。每个时间点做 3 个复孔。

2.7 免疫组织化学

2.7.1 细胞拔片 取用高胆固醇刺激的 ECV-304 细胞株, -20°C 丙酮固定 20 min, PBS 洗涤 2 次后用 0.1% Triton-X-100 加 0.1% 柠檬酸三钠在 4°C 处理 5 min, PBS 洗涤 2 次, 羊血清封闭 30 min, 加 1 抗 37°C 孵育 1 h, 后置 4°C 过夜, PBS 洗涤 2 次, 加 2

抗 (Anti-caveolin-1) 孵育 40 min, PBS 洗涤两次, 加入三抗 (SP) 于 37°C 孵育 30 min, PBS 洗涤两次, DAB 显色, 自来水冲洗 2 min, 苏木素复染 3 min, 梯度乙醇脱水, 透明封片。

2.7.2 石蜡切片 取喂饲高脂饲料的大鼠主动脉, 10% 甲醛固定后乙醇脱水, 石蜡包埋, 常规切片, 二甲苯脱蜡后按 2.7.1 方法操作。

2.8 统计分析

本文所有数据均用统计软件 SPSS 进行方差分析 (ANOVA), 比较各组均值的差异。

3 结果

3.1 高血脂兔血清的制备

取喂饲高脂饲料 8 周后的兔血, 分离血清, 用血脂检测试剂盒测定血清 TC 和 LDL-C。结果显示, 喂饲高脂饲料 8 周后家兔的 TC 由基础值 1.29 mmol/L 升到 15.88 mmol/L, 而 LDL-C 则由基础值 0.62 mmol/L 上升到 9.59 mmol/L, TC 和 LDL-C 均有显著升高 ($P < 0.01$)。将高脂兔血清存于 -20°C 备用。

3.2 高胆固醇对培养人脐静脉内皮细胞株 Caveolin-1 表达的影响

经免疫组织化学处理的细胞拔片用 DAB 显色后, 细胞膜被染成棕黄色为阳性细胞 (见图 2)。用美国 Nikon & Spot 图像分析仪采集图像并计算整个视野中阳性细胞的密度, 用阳性细胞的平均密度值表示 Caveolin-1 表达的多少, Caveolin-1 表达量与平均密度值成正比。通过比较各时间点 3 个复孔阳性细胞的平均值可看出, 高胆固醇作用 12~72 h 均可显著上调体外培养的内皮细胞 Caveolin-1 的表达量, 与常规培养条件下 Caveolin-1 表达量比较均有显著的提高; 而且, Caveolin-1 的表达量与高胆固醇作用时间成正相关, 高脂维持的时间越长 Caveolin-1 表达越多 (见图 1)。

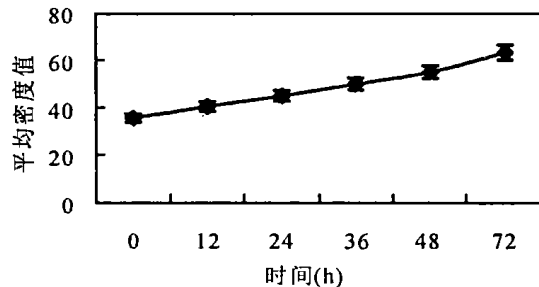


图 1 高胆固醇对 ECV-304 细胞上 Caveolin-1 表达的影响
Fig 1 The influence of high cholesterol level with caveolin-1 on ECV-304 cells. data are means \pm SD for 3 samples each group

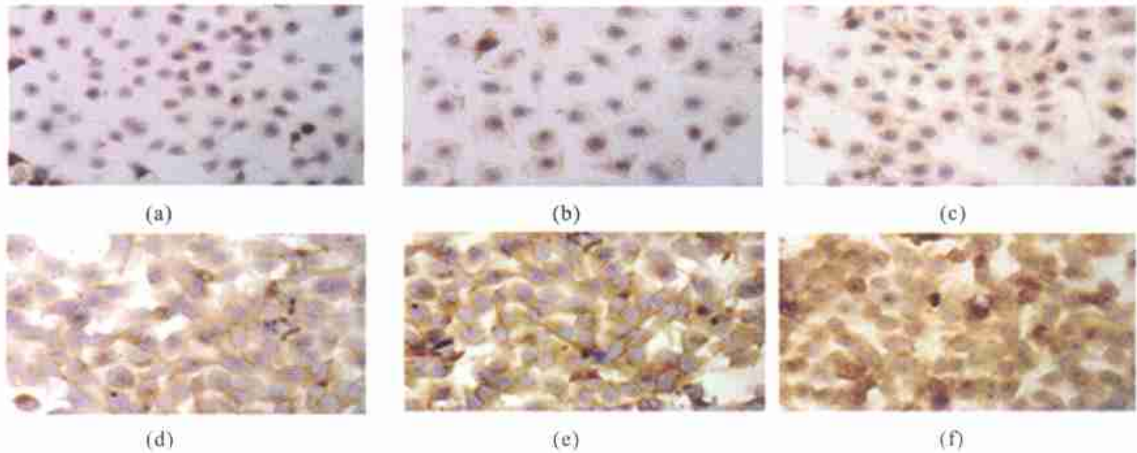


图 2 培养人脐静脉内皮细胞 Caveolin-1 免疫组化染色结果

(a) 常规培养的 ECV-304 细胞; (b) 高胆固醇刺激 12 h 的 ECV-304 细胞; (c) 高胆固醇刺激 24 h 的 ECV-304 细胞; (d) 高胆固醇刺激 36 h 的 ECV-304 细胞; (e) 高胆固醇刺激 48 h 的 ECV-304 细胞; (f) 高胆固醇刺激 72 h 的 ECV-304 细胞

Fig 2 Immunohistochemistry result of caveolin-1 in cultured human umbilical vein endothelium cells

(a) Normal cultured ECV-304 cells; (b) Stimulated ECV-304 cells with high cholesterol plasma for 12h; (c) Stimulated ECV-304 cells with high cholesterol plasma for 24h; (d) Stimulated ECV-304 cells with high cholesterol plasma for 36h; (e) Stimulated ECV-304 cells with high cholesterol plasma for 48h; (f) Stimulated ECV-304 cells with high cholesterol plasma for 72h

3.3 高胆固醇血症大鼠模型的建立^[7]

将喂饲高脂饲料的 SD 雌性大鼠于 0 7 10 14 18 21 d 时分别放血处死, 分离血清, 按照血脂检测试剂盒 (四川迈克科技有限公司) 测定 LDL-C 及 TC 的含量, 结果显示, 与正常大鼠比较, 喂饲高脂

饲料 7~21 d 的 SD 大鼠的 TC 与 LDL-C 都有显著升高 ($P < 0.01$), 达到了高血脂大鼠模型的水平; 同时, 在本实验条件下, 大鼠 7~21 d 的高血脂水平基本保持稳态, 没有明显变化, $P > 0.05$ (见表 1)。

表 1 喂饲高脂饲料后大鼠血清胆固醇及血管内皮 Caveolin-1 表达的变化

Table 1 The changes of serum cholesterol concentration and the expression of caveolin-1 on vascular endothelium

	0 d 组	7 d 组	10 d 组	14 d 组	18 d 组	21 d 组
TC (mmol/L)	1.19 ± 0.11	2.53 ± 0.15	2.66 ± 0.17	2.48 ± 0.14	2.55 ± 0.15	2.49 ± 0.13
LDL-C (mmol/L)	0.75 ± 0.06	1.39 ± 0.08	1.45 ± 0.07	1.36 ± 0.09	1.40 ± 0.07	1.44 ± 0.09
Caveolin-1 IOD	59.8 ± 6.2	85.2 ± 7.3	111.3 ± 4.8	124.9 ± 7.4	124.2 ± 4.7	118.5 ± 3.8

3.4 高胆固醇血症大鼠主动脉内皮细胞 Caveolin-1 表达的动态变化

经免疫组织化学处理的石蜡切片用 DAB 显色 (见图 4), 由美国 Nikon & Spot 图像分析仪分析结果, 数据处理同 3.3 (见表 1) 结果显示, 与正常大鼠比较, 喂饲高脂饲料 7 d 后, 大鼠主动脉内皮上 Caveolin-1 的表达明显升高, 第 10 d 又有明显增加, 两周后达到最高峰, 第 21 d 略有下降, 但仍明显高于正常大鼠 Caveolin-1 的表达量, $P < 0.01$ (见图 3)。

4 讨论

血管内皮细胞位于整个循环系统的内表面, 当

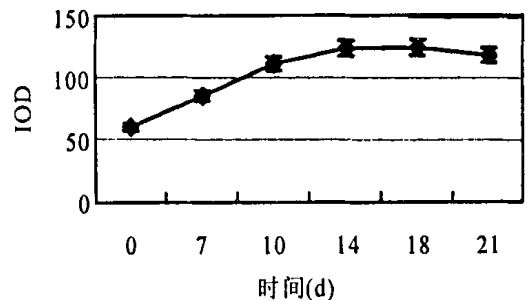


图 3 高胆固醇血症大鼠主动脉内皮细胞 Caveolin-1 表达的动态变化

Fig 3 The dynamic changes of caveolin-1 on aortic endothelium of hypercholesterolemia rats. data are means ± SD for 6 samples each group

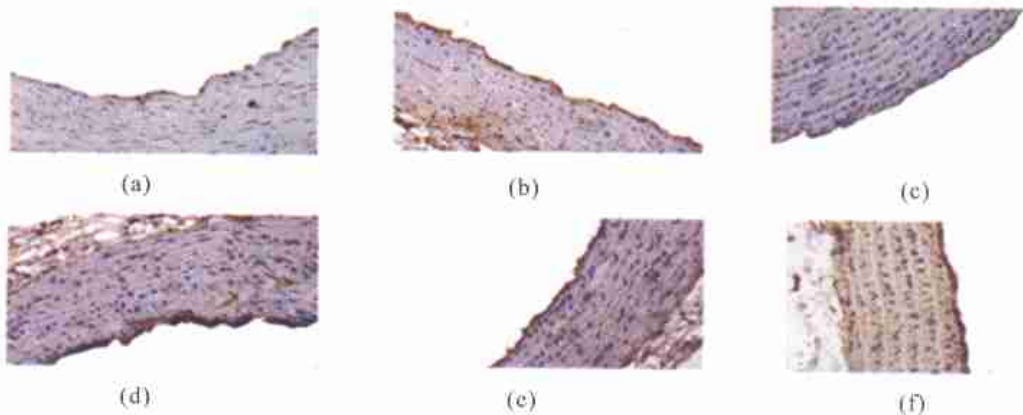


图 4 高胆固醇血症大鼠主动脉内皮细胞 Caveolin-1 的免疫组化染色结果

(a)正常喂养大鼠的主动脉条;(b)喂饲高脂饲料 7 d 的大鼠的主动脉条;(c)喂饲高脂饲料 10 d 的大鼠的主动脉条;(d)喂饲高脂饲料 14 d 的大鼠的主动脉条;(e)喂饲高脂饲料 18 d 的大鼠的主动脉条;(f)喂饲高脂饲料 21 d 的大鼠的主动脉条

Fig 4 Immunohistochemistry result of caveolin-1 on the aortic endothelium of hypercholesterolemia rats

(a) Aorta of normal fed rats; (b) Aorta of rats which had 7d Hyperlipid feed; (c) Aorta of rats which had 10d Hyperlipid feed; (d) Aorta of rats which had 14d Hyperlipid feed; (e) Aorta of rats which had 18d Hyperlipid feed; (f) Aorta of rats which had 21d Hyperlipid feed

血清胆固醇水平升高后将首先对内皮细胞产生影响。研究证实发现 Caveolin-1 担负着将细胞中的胆固醇转运出细胞的作用^[3]。当血清胆固醇升高时, LDL-C 也随之升高,在 LDL 受体的介导下进入细胞内。LDL 在溶酶体的作用下释放出游离胆固醇(FC),多余的 FC 与 Caveolin-1 结合被释放到 Caveolea 中,进而被排到胞外^[3]。同时有人报道在高胆固醇血症的情况下 Caveolin-1 与内皮源性一氧化氮合酶基因(eNOS)的相互作用增强,使 eNOS 处于失活状态,减少 NO 释放从而抑制了内皮源性的血管舒张作用^[4]。从本文的研究中可以看出,血清胆固醇的升高可以上调 Caveolin-1 的表达。在体外培养的 ECV-304 细胞上,高胆固醇维持的时间越长, Caveolin-1 的表达越多;而在高胆固醇血症大鼠模型上,血清胆固醇浓度的升高同样可以上调 Caveolin-1 的表达,当高胆固醇血症维持的时间在两周后 Caveolin-1 的表达达到最高,当血清高胆固醇维持的时间再延长 Caveolin-1 的表达不再升高反而略有下降。这可能是血管内皮在高血脂的作用下已经开始损伤,从而导致了 Caveolin 表达的下降。Caveolin-1 是 Karen 等^[6]在 1992 年鉴定的内皮细胞的膜蛋白,此后,相关的研究不断增加,但有关高胆固醇血症与内皮细胞上 Caveolin-1 表达的体内关系还未见报道。本文首次同步比较研究了 Caveolin-1 在体内和体外高胆固醇血症模型中表达的动态变化过

程,本实验结果对进一步研究以 Caveolin-1 为靶向的高胆固醇血症相关的血管疾病(如血管舒缩功能障碍及动脉粥样硬化)的诊断与治疗提供新的思路与依据

参 考 文 献

- 1 Kashi Okamoto, Amnon chlege, Philipp. E, *et al.* Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for rganizing " Preassembled Signaling Complexes" at the Plasma Membrane. *J Biol Chem*, 1998; 273(10): 5419
- 2 Philip WS, Richard G, Anderson W. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol*, 1998; 275(5): 843
- 3 Christopher JF, Phoebe EF. Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 49: 251
- 4 Ivier F, Chantal D, Stephane M, *et al.* Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 1999; 103(6): 897
- 5 Lee C, Mark G, Kenneth R. Caveolae and the caveolins in human disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 49: 325
- 6 Karen GR, John EH, Willam CD, *et al.* Caveolin, a protein component of caveolea membrane coats. *Cell*, 1992; 68: 673
- 7 Xu SY, Bian RL, Chen X. *The Experimental Method of Pharmacology* 3rd edition. Beijing, The peoples health publication, 2002: 1201-1203 [除叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法学 第三版. 北京, 人民卫生出版社, 2002: 1201-1203]

(收稿: 2003-01-16 修回: 2003-02-26)