

• 实验研究 Experimental research •

动脉粥样硬化细胞模型建立及细胞内铁代谢紊乱初步研究

徐 强, 周 瑜, 乔 彤

【摘要】 目的 建立动脉粥样硬化(AS)细胞模型,研究铁代谢与 AS 关系及 AS 斑块中巨噬细胞铁代谢紊乱的分子机制,为临床干预铁代谢及防治 AS 提供理论依据。**方法** 采用 RAW264.7 细胞,以氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导制备泡沫细胞,油红 O 染色并通过酶联免疫法检测胞内脂质(总胆固醇、游离胆固醇)验证 AS 泡沫细胞模型建立。免疫印迹法检测铁代谢相关铁蛋白(FT)、膜铁转运蛋白(FPN)1,免疫组化、免疫荧光法检测和定位巨噬细胞中 FPN1 表达。**结果** ox-LDL 诱导制备的细胞质内有大量红色脂质颗粒,较多脂质融合成大油滴状,符合泡沫细胞形态特征;泡沫细胞内有大量脂质堆积,胆固醇酯(CE)占比明显高于正常细胞($P<0.05$);与正常对照组相比,泡沫细胞内 FT 含量明显高于正常细胞,FPN1 含量增加且主要存在于细胞质内。**结论** 泡沫细胞中铁代谢紊乱,细胞内大量聚集。FPN1 非细胞膜定位阻止铁从巨噬细胞中有效排出并加重泡沫细胞中铁累积,可能加剧 AS 斑块形成和发展。

【关键词】 动脉粥样硬化;泡沫细胞;膜铁转运蛋白;铁蛋白

中图分类号:R542.22 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-12-1110-04

The establishment of atherosclerotic cell model and the preliminary study of intracellular iron metabolism disorder XU Qiang, ZHOU Yu, QIAO Tong. Department of Vascular Intervention, Affiliated Wujin Hospital, Jiangsu University, Changzhou, Jiangsu Province 213002, China

Corresponding author: QIAO Tong, E-mail: qiaotongmail@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish the atherosclerosis (AS) cell model, to study the relationship between the iron metabolism and AS, and to explore the molecular mechanisms of iron metabolism disorders within the macrophages in AS plaques so as to provide theoretical basis for clinical intervention of iron metabolism and for the prevention and treatment of AS. **Methods** RAW264.3 cells were used to prepare foam cells through oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced oxidation. In order to verify the foam cells, oil red staining and enzyme-linked immunosorbent were employed to assay the total lipids and free lipids (including total cholesterol and free cholesterol) in the foam cells. Western blotting was adopted to test the levels of iron metabolism-associated ferritin (FT) and ferroportin1 (FPN1); immunohistochemistry and immunofluorescence methods were used to determine and locate the expressions of FPN1 in foam cells. **Results** Large amounts of red lipid granules could be seen within the cytoplasm of ox-LDL-induced foam cells, and a great quantity of lipid fused into the form of large oil droplets, which was consistent with the morphological characteristics of foam cells. Massive lipid was accumulated in the foam cells, and the proportion of cholesterol ester (CE) in the foam cells was significantly higher than that in the normal cells ($P<0.05$). Compared with the normal control group, FT content in the foam cells was obviously higher than that in the normal cells; the content of FPN1 was increased, and the increased content of FPN1 mainly existed in cytoplasm. **Conclusion** In the foam cells the iron metabolism is disordered and a great quantity of FPN1 is accumulated in cytoplasm. The non-cell-membrane localization of FPN1 can prevent iron from being

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.12.011

基金项目:国家自然科学基金(81370387)

作者单位:213002 江苏常州 江苏大学附属武进医院介入血管科(徐 强、周 瑜);南京大学医学院附属鼓楼医院血管外科(乔 彤)

通信作者:乔 彤 E-mail: qiaotongmail@aliyun.com

effectively discharged from macrophages and can increase the accumulation of iron in foam cells, which may aggravate the formation and development of AS plaques.(J Intervent Radiol, 2017, 26: 1110-1113)

【Key words】 atherosclerosis; foam cell; ferroportin1; ferritin

动脉粥样硬化(AS)是临床常见疾病,其与铁代谢的关系近年已引起研究关注^[1]。动物实验表明铁螯合剂应用或通过调节血红蛋白水平,可降低血浆中胆固醇含量,有效减缓 AS 进程^[2-3]。铁在粥样斑块处累积与 AS 发展有一定关联,但具体机制仍需充分的实验证据支持。本研究从泡沫细胞模型入手,通过铁代谢与 AS 关系探究粥样斑块中巨噬细胞铁代谢紊乱的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验器材

本实验器材包括 RAW264.7 细胞株(南京大学医学院铁代谢与线粒体疾病实验室),兔抗鼠膜铁转运蛋白(FPN)1、铁蛋白(FT)抗体(美国 Sigma 公司),羊抗兔二抗、牛血清白蛋白(BSA,中国Biosharp 公司),免疫组化试剂盒(武汉博士德公司),胆固醇测定试剂盒(北京普利莱基因技术公司),RPMI1640 细胞培养液,胰酶消化液,枸橼酸铁铵(FAC),去铁胺(DFO),低密度脂蛋白(LDL),以及酶标仪、生物培养箱、搅拌器、生物安全柜、显微镜等。

1.2 LDL 氧化制备

LDL 定量后用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)稀释至 50 mg/L,加入 1 mol/L 硫酸铜(CuSO_4),使之终浓度为 5 mmol/L,37℃水浴 24 h;取少量样品,根据硫代巴比妥酸反应物含量鉴定氧化程度;以四乙氧基丙烷为标准品,按照丙二醛测定试剂盒说明书检测 LDL 氧化程度;其余氧化型 LDL(ox-LDL)转入透析袋中,在含 0.1%乙二胺四乙酸二钠的 PBS 中室温透析 24 h(2 h 换液 1 次),4 次透析后过夜,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌;在光密度(OD)570 处测得 ox-LDL 浓度为 50 mg/L,4℃保存。

1.3 泡沫细胞模型建立与鉴定

将细胞以 $5 \times 10^7/\text{L}$ 密度接种于 6 孔板中,每孔 4 ml,培养 24 h 后弃原液,将细胞培养液配置的 25 mg/L ox-LDL 与细胞共同孵育 24 h,正常对照组不加 ox-LDL;将泡沫细胞分别离心转移至 1 ml Eppendorf 管(EP)中,用无水乙醇超声破碎萃取细胞内胆固醇,根据胆固醇试剂盒操作说明书检测细胞内总胆固醇(TC)、游离胆固醇(FC)含量,计算出胆固醇酯(CE)比重;弃细胞培养液,0.01 mol/L PBS

清洗细胞 3 遍,多聚甲醛固定 10 min,油红 O 染色 15 min;60%油红 O 异丙醇清洗,即刻 PBS 清洗 3 遍,显微镜下观察细胞形态。

1.4 泡沫细胞中铁代谢干预

泡沫细胞培养液中分别加入 FAC 及铁螯合剂 DFO,正常培养 24 h 后观察细胞形态,镜下照相后弃培养液,0.01 mol/L PBS 清洗 3 遍,多聚甲醛固定 10 min;加入 0.2% Triton X-100 溶液静置 10 min,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)染色 5 min,弃上清液,PBS 清洗 3 遍;5% BSA 封闭 1 h,弃上清液,加入兔抗人 FPN1、FT 抗体,室温下静置 2 h;PBS 清洗 15 min($\times 2$),5% BSA 封闭液孵育 15 min($\times 2$);加入荧光标记的羊抗兔抗体,室温下静置 1 h,PBS 清洗 15 min($\times 3$);水溶性封片剂封片,免疫荧光共聚焦显微镜观察。

1.5 统计学方法

实验所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 泡沫细胞形态特征鉴定

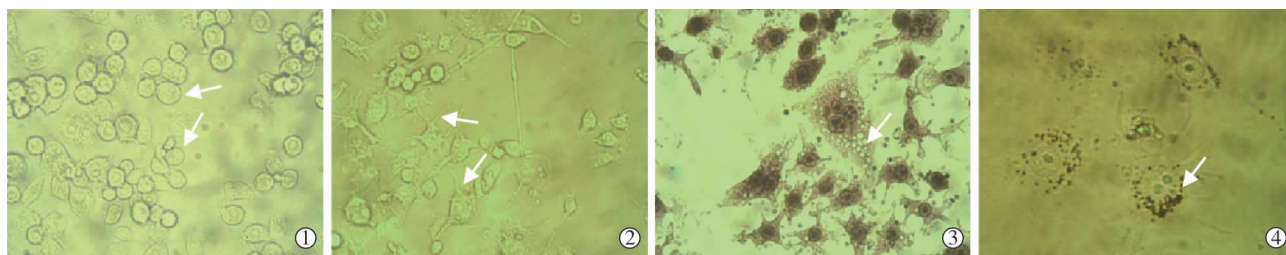
25 mg/L ox-LDL 诱导培养 24 h 后观察显示,RAW264.7 细胞呈梭形贴壁生长,多伸出伪足,表明已分化为巨噬细胞(图 1①~③);油红 O 染色显示,细胞质内有大量红色脂质颗粒,较多脂质融合成大油滴状,符合泡沫细胞形态特点(图 1④)。

2.2 细胞内脂质含量测定

酶联免疫法定量检测 TC、FC、CE(视为细胞内酯化脂质,可反映细胞中堆积的脂质)=TC-FC;结果显示实验组与正常对照组相比,细胞 TC 含量、CE 占比均明显升高($P < 0.05$)(表 1),表明实验组细胞内有大量脂质堆积,符合泡沫细胞特征。

2.3 铁代谢相关蛋白表达与定位

免疫印迹法检测显示,经 FAC 处理的泡沫细胞内 FT 含量较正常细胞明显上升($P < 0.01$),表明泡沫细胞中有铁累积,FPN1 表达高于正常巨噬细胞($P < 0.01$)(图 2、3);免疫组化检测显示,FT 表达增加且大多聚集在细胞内,核内未发现明显聚集,表明铁在泡沫细胞胞质内聚集;免疫荧光检测显示,FPN1 在胞质内染色明显,胞膜上无特异性聚集。



①圆润透明状形态的未分化 RAW264.7 细胞;②细胞逐渐增多的突触(细胞形态逐渐变化,突触增多,细胞黏附性增强);③被吞噬后可见的脂质空泡(加入 ox-LDL 处理后,细胞吞噬大量脂质,胞内可见明显脂质泡);④油红 O 染色的脂质(呈大小不一的透明红色,核内及培养基中无阳性结果)

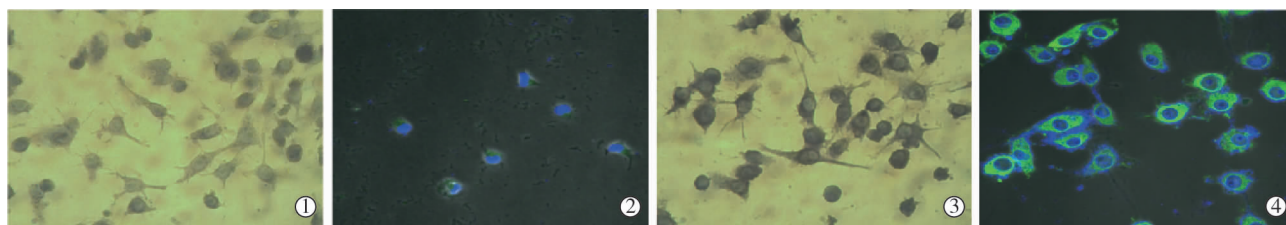
图 1 未处理 RAW264.7 细胞逐渐分化为巨噬细胞并吞噬脂质形成泡沫细胞

表 1 细胞内脂质含量测定

组别	TC/(mmol/L)	CE 占比/%
正常对照组	0.13±0.02	0.19±0.07
实验组	0.26±0.04	0.63±0.06
P 值	0.029	0.021

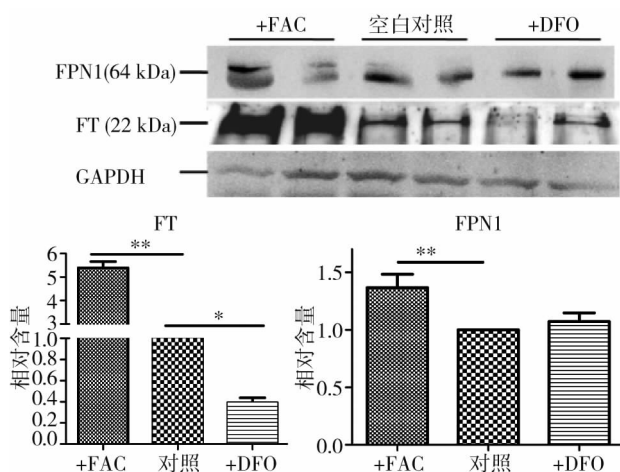
3 讨论

巨噬细胞泡沫化是 AS 早期病变的标志之一, RAW264.7 细胞株最常用于构建巨噬泡沫细胞模型^[4]。本研究通过 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞分化



①②正常对照组 FT 免疫组化(荧光)染色;③④泡沫细胞 FT 免疫组化(荧光)染色示 FAC 处理后胞质内 FT 含量较正常细胞明显上升

图 2 泡沫细胞 FAC 处理的免疫组化



注: ** 与正常对照组相比, $P < 0.01$

图 3 加入 FAC 后泡沫细胞内 FT 含量及 FPN1 表达明显升高

成泡沫细胞,油红 O 染色显示构建的泡沫细胞模型内有大量脂质沉积并汇聚成滴,脂质含量测定显示模型内酯化脂质含量高于 60%,表明 ox-LDL 诱导 RAW264.7 形成泡沫细胞可行。ox-LDL 除了使脂质酯化、诱导破坏细胞结构外,还能选择性作用于细胞循环周期 S 期,对增殖活跃的细胞毒性更强,从而引起泡沫细胞坏死,形成 AS 核心,加速斑块不稳定^[5-6]。

本研究采用 FAC 处理泡沫细胞,探究泡沫细胞中铁代谢相关蛋白表达与定位,结果显示泡沫细胞摄取足够量的铁并积累在胞质中,细胞内 FT 含量上升,FPN1 含量也上升。生理条件下 FPN1 上升,胞质内铁排出增加,FT 含量会相应降低。FPN1 是现阶段已知的唯一巨噬细胞表面排铁蛋白^[7],定位于细胞膜上发挥功能^[8]。本研究发现泡沫细胞中 FPN1 弥散分布于胞质内,细胞膜上未见明显增加,提示总 FPN 虽有增多,但发挥功能的 FPN1 未增多,泡沫细胞排铁存在障碍,致使铁大量积累,同时补充过多铁后巨噬细胞转化成泡沫细胞数量明显增多,形态更不规则。以上结果表明,细胞内铁增加也能促进巨噬细胞向泡沫细胞转化。

Sullivan 等^[9]于 20 世纪 80 年代初提出铁代谢与 AS 密切相关。多项临床研究发现,粥样斑块中铁含量升高与 AS 密切相关^[10-11]。本研究结果表明,RAW264.7 细胞经 ox-LDL 诱导并用高浓度铁处理后,能加快泡沫细胞形成,促进 AS 发展。

[参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420: 868-874.

- [2] Zhang WJ, Wei H, Frei B. The iron chelator, desferrioxamine, reduces inflammation and atherosclerotic lesion development in experimental mice[J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2010, 235: 633-641.
- [3] Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC, et al. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5: 94.
- [4] 李红, 谭理连, 李志铭, 等. 动脉粥样硬化斑块 MRI 巨噬细胞成像实验研究[J]. *临床放射学杂志*, 2014, 33: 1277-1281.
- [5] Kautz L, Gabayan V, Wang X, et al. Testing the iron hypothesis in a mouse model of atherosclerosis[J]. *Cell Rep*, 2013, 5: 1436-1442.
- [6] 阚科佳, 齐昊喆, 杨硕菲, 等. 舒洛地特对氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及其机制研究[J]. *介入放射学杂志*, 2017, 26: 539-543.
- [7] Weiss G. Genetic mechanisms and modifying factors in hereditary hemochromatosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7: 50-58.
- [8] De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, et al. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin[J]. *EMBO J*, 2007, 26: 2823-2831.
- [9] Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2007, 232: 1014-1020.
- [10] 丁蓉蓉. 携人血栓调节蛋白基因内皮祖细胞预防动脉成形术后再狭窄[D]. 南京: 东南大学, 2016.
- [11] Sung KC, Kang SM, Cho EJ, et al. Ferritin is independently associated with the presence of coronary artery calcium in 12,033 men[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 2525-2530.

(收稿日期: 2017-09-10)

(本文编辑: 边 皓)

·消 息·

2017 年度“林贵-刘子江优秀介入论文奖”评选通知

《介入放射学杂志》编辑部为了鼓励大家积极投稿, 表彰优秀介入论文, 促进我国介入放射学的发展, 每年举行一次“林贵-刘子江优秀介入论文奖”评选, 希望广大作者积极参与此项活动。

2017 年度“林贵-刘子江优秀介入论文奖”评奖活动由南京正大天晴制药有限公司赞助, 现在开始申报, 要求如下:

一、原则上凡是 2017 年在《介入放射学杂志》上发表的论文均可申报。

二、申报材料: 作者、单位、题目、2017 年期、页; 申报理由: 科学性, 论点、论据、数据等; 先进性, 有何创新; 实用性, 有何推广价值。

三、申报方法: 将申报材料与申报论文复印件各一式 10 份快递寄送至《介入放射学杂志》编辑部, 以便函审。

四、寄送地址: 上海市华山路 1328 号, 邮政编码: 200052; 联系人: 葛雄, 手机号: 13795454916, 单位电话: 021-62409496, 021-81818191。

五、申报时间: 2017 年 12 月 25 日起, 2018 年 2 月 16 日(春节)截止。