

聚苯乙烯纳米塑料对大鼠主动脉平滑肌细胞泡沫化的影响

罗佳颖 牛璇 朱柯东 文婷婷 但亮 张兆辉

【摘要】 目的 探讨聚苯乙烯纳米塑料(Polystyrene nanoplastics, NPs)对大鼠主动脉平滑肌细胞(Rat aortic smooth muscle cells, RASMCs)泡沫化的影响。**方法** 体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞,用不同水平的直径为 80 纳米的绿色荧光 NPs(80 nm NPs)处理 RASMCs 24 小时;采用细胞计数试剂盒(Cell counting kit-8, CCK8)检测细胞活力,并检测细胞释放的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)活性以评估细胞损伤程度;利用 DiI 荧光标记的氧化型低密度脂蛋白(Dioctadecyl-3, 3, 3, 3-tetramethylin docarbocyanine-oxidized low density lipoprotein, DiI-oxLDL)诱导平滑肌细胞泡沫细胞形成,并行油红 O 染色显示脂滴;采用蛋白免疫印迹法检测自噬相关指标(Microtubule-associated protein 1 light chain 3B, MAP1LC3B)的表达水平。**结果** 80 nm NPs 可被 RASMCs 吞噬并产生细胞毒性,呈水平依赖性促进 RASMCs 摄取 oxLDL, 自噬相关指标(LC3B)表达水平降低。**结论** 聚苯乙烯纳米塑料可被血管平滑肌细胞吞噬并促进泡沫细胞形成,其潜在机制可能是通过抑制 RASMCs 自噬来实现的。

【关键词】 动脉粥样硬化 血管平滑肌细胞 泡沫细胞 纳米塑料 自噬

【中图分类号】 R543.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)01-0003-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.01.001

Effects of Polystyrene Nanoplastics on Foam Cell Formation in Rat Aortic Smooth Muscle Cells Luo Jiaying, Niu Xuan, Zhu Kedong, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To investigate the role of polystyrene nanoplastics (NPs) in foam cell formation in rat aortic smooth muscle cells (RASMCs). **Methods** RASMCs were treated with green fluorescent NPs of 80-nanometer diameter (80 nm NPs) at different concentrations for 24 hours. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Lactate dehydrogenase (LDH) activity assay kit was used to measure LDH release as an indicator of cell damage. Foam cell formation was induced using DiI-labeled oxidized low-density lipoprotein (DiI-oxLDL). Oil Red O staining was performed to visualize lipid droplets. Protein immunoblotting was conducted to assess the expression levels of autophagy-related marker microtubule-associated protein 1 light chain 3B (MAP1LC3B/LC3B). **Results** The results demonstrated that RASMCs internalized the 80 nm NPs, and their uptake was associated with concentration-dependent cytotoxicity. Furthermore, the NPs promoted the uptake of oxLDL by RASMCs and downregulated the expression level of the autophagy-related marker LC3B. **Conclusion** The 80nm NPs promote the uptake of oxLDL by RASMCs and induce foam cell formation. The potential mechanism underlying this effect may involve the inhibition of autophagy in RASMCs.

【Key words】 Atherosclerosis Vascular smooth muscle cells Nanoplastics Microplastics Autophagy

动脉粥样硬化是导致急性心脑血管事件如脑卒中、冠心病和外周血管疾病的病理基础,其发展机制极为复杂^[1]。在动脉粥样硬化的病变过程中平滑肌细胞在动脉中膜积聚大量脂质,形成泡沫细胞^[2],这

一过程与斑块的发展和稳定性密切相关^[3]。

塑料制品作为最常见的海洋和土壤垃圾之一,在经过物理剪切和微生物等因素处理后可分解成<5 mm 的微塑料颗粒^[4]。微塑料可累积在组织器官中,并经食物链被人体吸收^[5]。已有研究发现微塑料具有肺毒性^[6]、神经毒性^[7]和生殖毒性^[8]等特性,并且已在人体血液中监测到微塑料的存在^[8]。血管是微

基金项目:国家自然科学基金(82071183,82001245)

作者单位:430061 武汉大学人民医院神经内科[罗佳颖 牛璇 朱柯东 文婷婷 但亮 张兆辉(通信作者)]

塑料进入血液循环的主要靶器官,因此研究微塑料对血管的影响具有重要意义。内皮细胞作为循环系统的第一道防线,对血管健康有着重要意义。有研究表明微塑料能诱导血管内皮细胞自噬和衰老^[10-11]。血管平滑肌细胞为参与泡沫细胞形成的重要成分;有研究表明斑块内超过 50% 的泡沫细胞可能都是平滑肌细胞来源的^[12]。然而,到目前为止微塑料对血管平滑肌细胞的影响以及作用机制仍不清楚。

本研究旨在探究聚苯乙烯纳米塑料对血管平滑肌细胞泡沫细胞的影响,并试图探讨其中潜在机制。该研究将有助于揭示微塑料对血管壁组织的影响,表明微塑料可能为促进动脉粥样硬化的环境危险因素,进而为动脉粥样硬化的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

RASMCs 取自 Sprague-Dawley (SD) 大鼠胸主动脉原代培养。实验试剂:达尔伯克改良伊格尔培养基/营养混合液 F12 (Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12, DMEM/F12) 培养基 (03. 18004C) 购自北京中生奥邦生物科技有限公司;双抗(青霉素、链霉素)、0. 25% 胰酶、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;绿色荧光标记的 80 nm NPs (7-3-0008) 购于天津市倍思乐色谱技术开发中心;CCK8 试剂 (CK04) 购于同仁化学科技有限公司;油红 O 粉剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司;LDH 活性检测试剂盒 (BC0685) 购自北京索莱宝科技有限公司;DiI-oxLDL (YB-0010) 购于广州奕元生物技术有限公司;LC3B 抗体 (14600-1-AP) 购自 Proteintech 公司; β -肌动蛋白 (Actin beta, β -actin) 抗体 (GTX629630) 购自 GeneTex 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代主动脉平滑肌细胞提取和培养

2% 戊巴比妥钠 (40 mL/kg) 腹腔注射 SD 大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死,置于 75% 乙醇浸泡 5 min,在无菌条件下打开胸腔,取出大鼠胸主动脉置于无菌磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffered saline, PBS) 中,剥离血管外脂肪组织和外膜,沿纵轴剪开血管,无菌刀片刮去内膜,镊子钝性加压刮中膜,出现裂口后夹住中膜将其剥离;中膜剪碎成约 1 mm² 组织块铺于培养瓶壁上,用含 12% 胎牛血清的 DMEM/F 12 培养液培养,每 3 d 传代 1 次,第 3~8 代用于试验。

1.2.2 CCK8 细胞增殖实验

将 RASMCs (5×10^4 个细胞/孔) 接种到 96 孔板中,然后用不同水平的 NPs (0、1、5、25、50、100 μ g/mL) 处理 24 h;将 10 μ L CCK-8 溶液添加到 96 孔板的每个孔中;37 $^{\circ}$ C 温育 2 h 后通过酶标仪在 450 nm 处检测吸光度。

1.2.3 乳酸脱氢酶活性测定

收集 80 nm NPs 处理 24 h 的 RASMCs,用试剂盒中的试剂制样,将样品置于酶标仪中在 450 nm 下测定吸光度。

1.2.4 DiI-oxLDL 摄取

80 nm NPs 处理 24 h 的 RASMCs 加用 10 μ g/mL 的 DiI-oxLDL 置于细胞培养箱 37 $^{\circ}$ C 继续处理 4 h,然后用 PBS 洗涤;用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后用磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次;再用 4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (4,6-Di-amino-2-phenyl indole, DAPI) 染细胞核 5 min, PBS 洗涤 3 次后封片,在荧光显微镜 (Olympus IX73) 下拍照;每张细胞爬片选取 5 个不同的 40 倍视野,用 Imagej 软件分析荧光强度。

1.2.5 油红 O 染色

80 nm NPs 与 10 μ g/mL 的 DiI-oxLDL 共同处理 24 h;用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后再用 PBS 洗涤 3 次;用苏木精染细胞核 5 min,分化液分化,用 PBS 洗涤 3 次后在显微镜 (Olympus IX73) 下拍照。

1.2.6 蛋白免疫印迹法检测蛋白水平

细胞处理完成后收集细胞,用放射免疫沉淀法缓冲液 (Radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 裂解液提取细胞内总蛋白;置于金属恒温加热器中加热 10 min,使蛋白变性;使用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 电泳将蛋白分离并转印至硝酸纤维素 (Nitrocellulose filter, NC) 膜;5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后加入相应一抗 Anti-LC3B (1:500),于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 [Tris (hydroxymethyl) aminoethane buffered saline with Tween 20, TBST] 洗膜,室温孵育二抗 (1:8000) 1 h,使用电化学发光 (Electrochemical luminescence, ECL) 仪中显影;用 Imagej 软件分析条带灰度值。

1.2.7 统计学处理

每个实验至少重复 3 次;采用 SPSS 27.0 软件;使用 Graphpad Prism 9.0 制作图表;定量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 one-way ANOVA 统

计方法以 $P<0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 RASMCs 吞噬 80 nm NPs

与空白对照组比较,经绿色荧光的 80 nm NPs 处理的 RASMCs 在荧光显微镜下可见胞内有绿色荧光 NPs 沉积,并且荧光强度随 NPs 水平增高而增

强(图 1)。

2.2 NPs 对 RASMCs 有毒性作用

CCK8 检测 RASMCs 活力发现,与空白对照组比较,低水平 NPs 可提高细胞活力,而高水平 NPs 抑制细胞活力(图 2);LDH 试剂盒检测 RASMCs 中 LDH 活力发现,与空白对照组比较,NPs 处理显著提高 RASMCs 中 LDH 水平(图 2)。

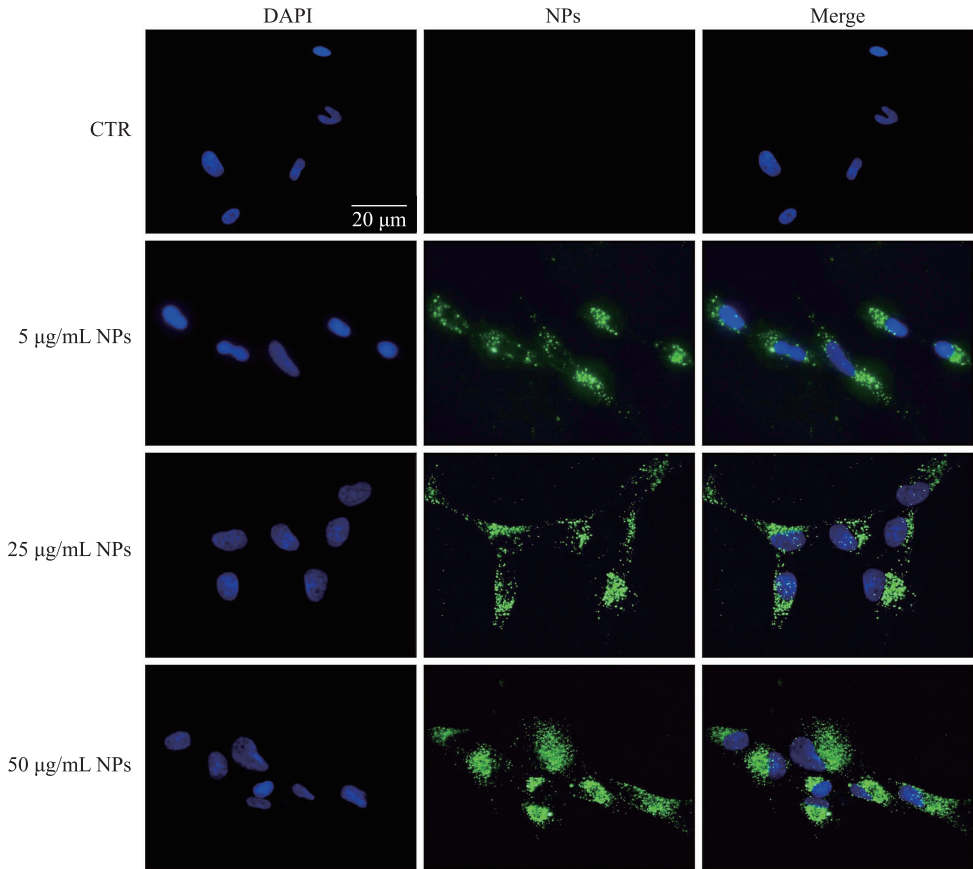


图 1 RASMCs 吞噬 NPs 蓝色代表 DAPI,绿色代表 NPs

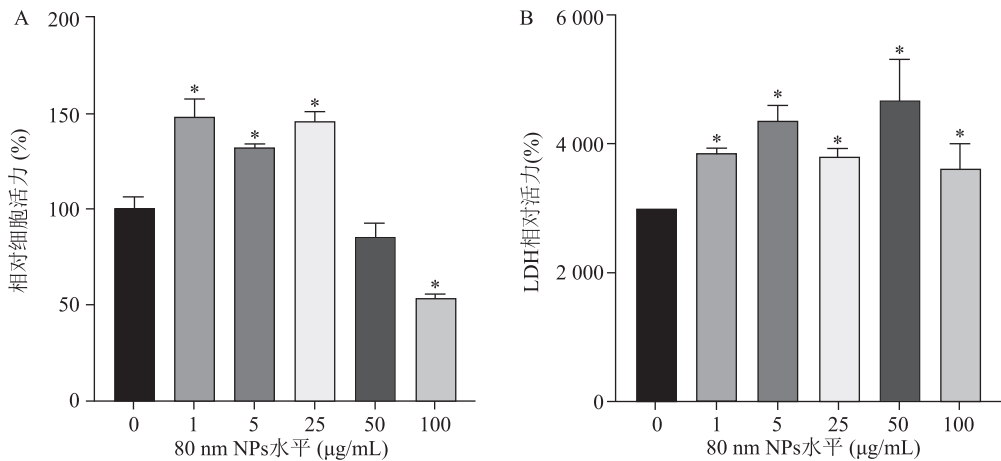


图 2 NPs 对 RASMCs 有毒性作用 A 为低水平 NPs 对 RASMCs 起兴奋作用,高水平对 RASMCs 起抑制作用;B 为 NPs 处理组较空白对照组 LDH 活力显著增高,与空白对照组比较,* $P<0.05$

2.3 NPs 促进 RASMCs 摄取 oxLDL 和脂滴形成

NPs 诱导 RASMCs 摄取 DiI-oxLDL, oxLDL 的荧光强度随 NPs 水平增高而增强(图 3);NPs 增强 oxLDL 诱导的 RASMCs 泡沫化,与对照组比较, NPs 处理组细胞内形成更多红色脂滴, NPs 水平越高, RASMCs 内红色脂滴累积越多。

2.4 NPs 抑制 RASMCs 自噬

与空白对照组比较, NPs 处理组的 LC3B 蛋白表达水平呈水平依赖性下降(图 4)。

3 讨 论

动脉粥样硬化是一种常见的血管疾病,其发展

与泡沫细胞的形成密切相关。泡沫细胞主要来源于平滑肌细胞泡沫化,而细胞摄取 oxLDL 后的胆固醇脂累积是泡沫细胞形成的关键步骤^[12]。

塑料制品在全球范围内被广泛使用,经过物理剪切和微生物等因素处理后可降解成<5 毫米的微塑料。目前微塑料对陆生生物的影响了解甚少,尤其对人类和其他哺乳动物的影响和作用机制尚不明确。最近的研究发现,人体血液中存在微塑料,其中消化道和呼吸道是人类摄入微塑料的主要途径^[13]。血管是微塑料进入血液循环的主要靶器官,因此研究微塑料对血管的影响具有重要意义。目前已有体外研究显示微塑料不仅能抑制血管内皮细胞的血管

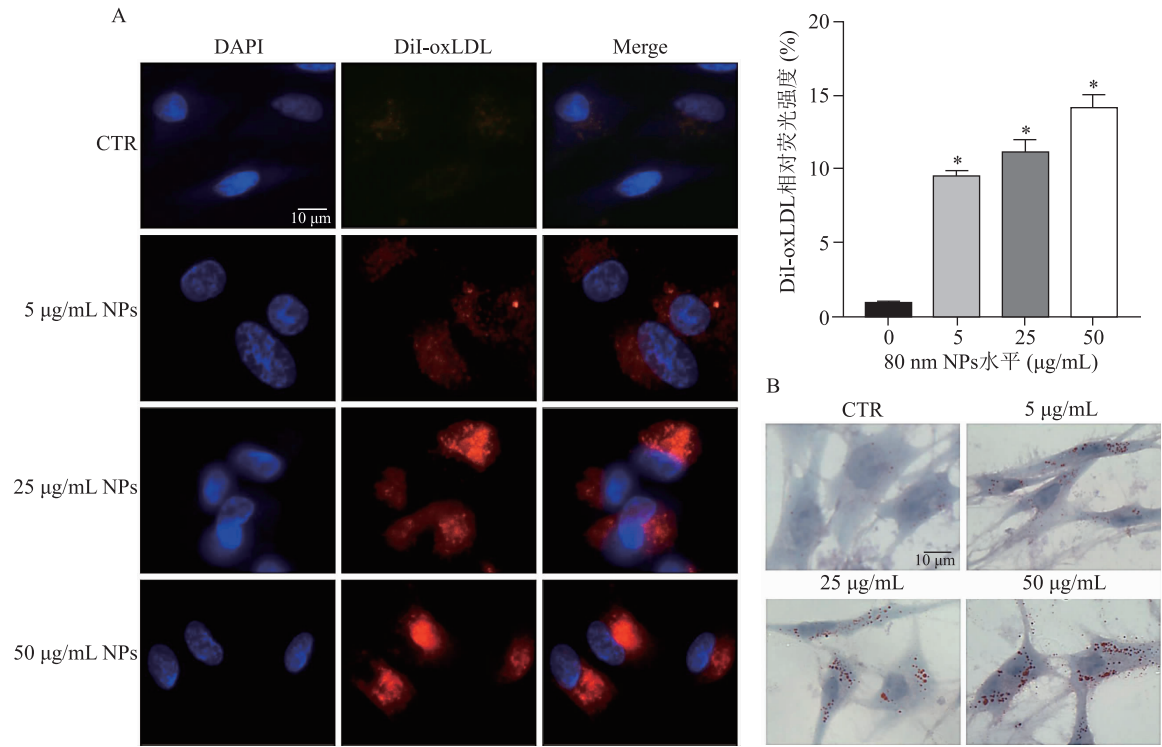


图 3 NPs 处理组泡沫化增加 A 为 NPs 处理组较对照组摄取 oxLDL 水平增高,与空白对照组比较,* $P<0.05$;B 为 NPs 处理组较对照组脂滴堆积增加;蓝色代表 DAPI,红色代表 DiI-oxLDL

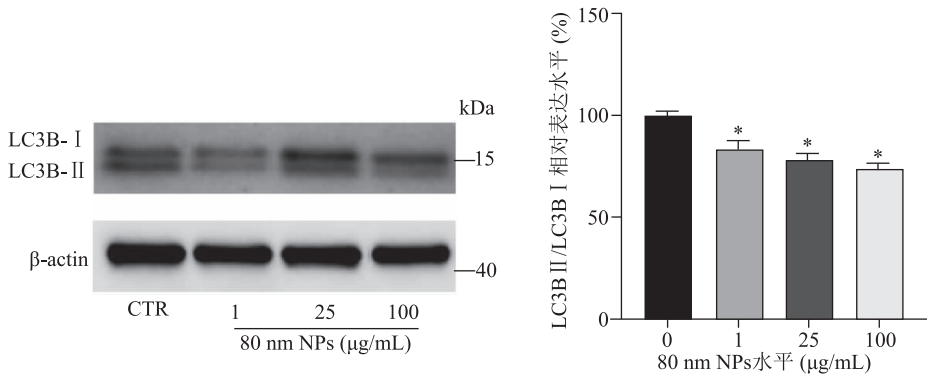


图 4 免疫印迹检测自噬相关指标的表达水平 与空白对照组比较,* $P<0.05$

形成效应并诱导细胞衰老和坏死^[10,14],还能干扰巨噬细胞的脂质代谢,促进泡沫化^[15-16]。然而,尚无研究探讨微塑料对血管平滑肌细胞的影响。

本研究选取 RASMCs 作为研究对象,旨在探究微塑料对 RASMCs 泡沫化的影响。本实验结果显示,低水平的微塑料对 RASMCs 产生兴奋作用,而高水平则抑制了 RASMCs 的活力。然而,在检测 LDH 活性时发现微塑料处理组细胞膜的损伤水平显著升高,提示微塑料对 RASMCs 具有细胞毒性作用。此外,本实验结果还表明微塑料处理呈水平依赖性地诱导了 RASMCs 对 DiI-oxLDL 的摄取,进一步提示微塑料诱导了 RASMCs 的泡沫化。此外,本研究还发现微塑料呈水平依赖性地抑制了 RASMCs 中 LC3BII / I 的表达水平,这提示微塑料抑制了 RASMCs 的自噬水平。已有研究表明,血管平滑肌细胞自噬通路的减少促进了泡沫细胞的形成^[17],这进一步表明微塑料可能通过抑制自噬过程来促进 RASMCs 的泡沫化。

综上所述,本研究结果揭示了微塑料对血管平滑肌细胞的影响。微塑料处理对 RASMCs 产生了毒性作用,同时诱导了 RASMCs 的泡沫化,并抑制了自噬水平。这些发现为进一步探究微塑料在动脉粥样硬化发展中的作用机制和潜在危害提供了重要线索。深入研究微塑料与动脉粥样硬化的关联对于预防和治疗这一全球性疾病具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature,2021,592(7855):524-533.
[2] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature,2000,407(6801):233-241.
[3] Mr B,S S,Gk O. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Circulation research,2016,118(4):692-702.
[4] Andradý AL. Microplastics in the marine environment[J]. Marine Pollution Bulletin,2011,62(8):1596-1605.
[5] Miranda D de A,de Carvalho-Souza GF. Are we eating plastic-

ingesting fish? [J]. Marine Pollution Bulletin,2016,103(1-2):109-114.
[6] Dong CD,Chen CW,Chen YC, et al. Polystyrene microplastic particles;in vitro pulmonary toxicity assessment[J]. Journal of Hazardous Materials,2020,385:121575.
[7] Jin H. Evaluation of neurotoxicity in BALB/c mice following chronic exposure to polystyrene microplastics[J]. Environmental Health Perspectives,2022,130(10):107002.
[8] Zhao T,Shen L,Ye X,et al. Prenatal and postnatal exposure to polystyrene microplastics induces testis developmental disorder and affects male fertility in mice[J]. Journal of Hazardous Materials,2023,445:130544.
[9] Leslie HA, van Velzen MJM, Brandsma SH, et al. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood [J]. Environment International,2022,163:107199.
[10] Lu YY,Li H,Ren H,et al. Size-dependent effects of polystyrene nanoplastics on autophagy response in human umbilical vein endothelial cells [J]. Journal of Hazardous Materials,2022,421:126770.
[11] Wang Y,Dubland JA, Allahverdian S, et al. Smooth muscle cells contribute the majority of foam cells in ApoE (Apolipoprotein E)-deficient mouse atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,2019,39(5):876-887.
[12] Di Pietro N, Formoso G, Pandolfi A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis[J]. Vascular Pharmacology,2016,84:1-7.
[13] 孙香莹,庄银,王玉邦,等. 微塑料环境暴露与人体健康效应研究进展[J]. 环境科学研究,2023,36(5):1020-1031.
[14] Lee HS,Amarakoon D,Wei CI,et al. Adverse effect of polystyrene microplastics (PS-MPs) on tube formation and viability of human umbilical vein endothelial cells[J]. Food Chem Toxicol,2021,154:112356.
[15] Florance I,Ramasubbu S,Mukherjee A,et al. Polystyrene nanoplastics dysregulate lipid metabolism in murine macrophages in vitro[J]. Toxicology,2021,458:152850.
[16] Florance I,Chandrasekaran N,Gopinath PM,et al. Exposure to polystyrene nanoplastics impairs lipid metabolism in human and murine macrophages in vitro[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2022,238:113612.
[17] Pi S, Mao L, Chen J, et al. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis [J]. Autophagy,2021,17(4):980-1000.

(2023-07-08 收稿)