

网络出版时间:2024-03-21 18:31:06 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.016

# SPARCL1 在动脉粥样硬化斑块形成中的作用研究

程煦<sup>1</sup>, 陈心严<sup>2</sup>, 陈婷婷<sup>3</sup>, 程筱雯<sup>2</sup>, 朱华庆<sup>4</sup>, 葛圣林<sup>1</sup>

**摘要 目的** 探讨富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白类似蛋白 1 (SPARCL1) 对动脉粥样硬化 (AS) 斑块形成的影响。**方法** 采用病例对照研究, 选取 394 例 AS 确诊患者作为病例组, 年龄、性别相匹配的 394 例健康对照者作为对照组。利用酶联免疫吸附试验测定血清 SPARCL1 表达水平; 免疫组织化学实验评估 SPARCL1 蛋白在 AS 斑块区的表达水平及定位, 同时检测 AS 患者和正常对照人群外周血的中性粒细胞及单核细胞的 SPARCL1 蛋白表达情况; 构建 SPARCL1 过表达及抑制表达的重组腺病毒载体, 以小鼠巨噬细胞 (J774A.1) 为靶细胞, 进行细胞划痕实验观察 SPARCL1 对细胞迁移的影响。**结果** AS 患者组的血清 SPARCL1 水平低于健康组 ( $P < 0.05$ ); 在 AS 斑块中检测到 SPARCL1 高表达, 且主要表达在泡沫细胞胞浆; AS 患者的外周血中性粒细胞及单核细胞 SPARCL1 表达水平低于正常对照 ( $P < 0.05$ ); SPARCL1 过表达及抑制表达的重组腺病毒构建成功; 抑制 SPARCL1 表达的 J774A.1 细胞中的细胞迁移率降低, 过表达 SPARCL1 的 J774A.1 细胞中的细胞迁移率增加 ( $P < 0.05$ )。**结论** SPARCL1 在 AS 病变部位泡沫细胞高表达, 这可能来自于外周血单核细胞和中性粒细胞的代偿性募集, SPARCL1 可能作为血管保护因子参与抑制 AS 斑块的发生发展。

**关键词** SPARCL1; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; SPARCL1 重组腺病毒; 细胞划痕实验

**中图分类号** R 543.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0473-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.016

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 及其引起的一系列并发症是目前心血管疾病的主要致病因素, 持续威胁人类健康<sup>[1]</sup>。AS 被认为是一种慢性炎症状态, 是由于血管平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞

和其他细胞的不受控增殖所引起的<sup>[2-3]</sup>。目前, 内皮细胞的功能障碍被认为是 AS 的启动和加重的重要因素<sup>[4]</sup>。

富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白类似蛋白 1 (secreted protein acidic and rich in cysteines like 1, SPARCL1) 也被称作 Hevin、SC1 以及 ECM2, 隶属于 SPARC 家族 (参与细胞黏附、迁移和增殖调节的细胞基质蛋白家族)<sup>[5]</sup>。SPARCL1 广泛表达于人体的各个组织中, 但在如前列腺癌、非小细胞癌、卵巢癌以及结肠癌中表达下调<sup>[6]</sup>, 提示 SPARCL1 基因可能是一种潜在的肿瘤抑制基因。通过对人类主动脉硬化病变的外周血白细胞转录组的研究<sup>[7]</sup>, 以及对人 AS 斑块的单细胞转录组的研究<sup>[8]</sup>, SPARCL1 已被视为与 AS 有关的新的候选基因, 并且确定了 SPARCL1 在 AS 组织中的表达。并且发现, SPARCL1 在 AS 斑块中的表达增高<sup>[9]</sup>。然而 SPARCL1 参与 AS 的具体过程和作用尚不清楚。该研究旨在探讨 SPARCL1 在 AS 斑块形成中的作用, 以期为深入探寻 AS 发生发展的分子机制以及有效的早期诊疗分子标志物提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 研究对象来自于安徽医科大学第一附属医院 2022 年 3 月—2023 年 2 月收治的 394 例已经过临床确诊为 AS 的患者。对照组来自于同时期年龄、性别匹配的 394 例健康对照人群, 已排除心脑血管疾病, 且无其他显著疾病。免疫组织化学的组织切片来自于安徽医科大学第一附属医院病理中心的临床动脉组织标本。本研究所选取的样本均来自安徽省。

**1.1.2 主要材料** 人 SPARCL1 酶联免疫分析试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, 货号: 0-001493); DNA 提取试剂盒、蛋白裂解液、RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (山东思科捷生物技术有限公司, 货号: AA0902-A、EA0003、AC0202-A、AG0401、AH0301); DAB 显色液、通用型二抗、枸橼酸抗原修复粉末 (北京中杉金桥生物技

2024-02-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82170484); 安徽医科大学研究生科研与实践创新项目 (编号: YJS20230072)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 心脏外科、<sup>2</sup> 检验科, 合肥 230022

安徽医科大学<sup>3</sup> 病理教研室、<sup>4</sup> 生化与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 程煦, 男, 硕士研究生;

葛圣林, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: geshenglin@ahmu.edu.cn

术有限公司,货号:PV-6002、SAP9100、ZLI-9066);苏木精(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0105S);3%过氧化氢( $H_2O_2$ )(福州迈新生物技术开发有限公司,货号:BLK-0001);多克隆抗 SPARCL1 抗体(武汉三鹰技术有限公司,货号:13517-1-AP);人外周血单核细胞分离液、人外周血中性粒细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司,货号:P8680、P9040);高糖 DMEM、小鼠单核巨噬细胞 J774A.1(武汉普诺赛生物科技有限公司,货号:PM150210、CL-0370);胎牛血清(南京维森特生物技术有限公司,货号:085-150);BCA 定量试剂盒(美国 Thermofisher Scientific 公司,货号:23225);ECL 反应液(成都正能生物技术有限责任公司,货号:17064);PMSF(北京金克隆生物技术有限公司,货号:CS3215);蛋白 Marker(上海生工生物工程股份有限公司,货号:C600526);过表达质粒:pENTR-CMV-MCS-EF1a-copGFP 质粒(货号:LM1479,上海联迈生物工程有限公司);shRNA 质粒:pENTR-U6-CMV-EGFP 质粒(货号:NTCC510825,上海西图生物科技有限公司)

**1.1.3 实验仪器** 酶标仪(型号:A51119700DPC);恒温细胞培养箱(型号:51023126);NanoDrop one 微量核酸蛋白浓度测定仪(型号:ND-LITE-PR)(美国 Thermofisher Scientific 公司);大容量台式高速离心机(美国 BECKMAN 公司,型号:369003);正置显微镜(德国 Leica 公司,型号:DM2700-M);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司,型号:Roche LightCycler96)

## 1.2 方法

**1.2.1 ELISA 测定血清 SPARCL1 表达水平** 所有实验操作均按照 SPARCL1 酶联免疫分析试剂盒提供的说明书进行。酶标板设置标准孔、样品孔(3个复孔)和空白孔,经加样、加酶、温育、洗涤等步骤后,在酶标仪中读取吸光度值并计算各样品浓度。

**1.2.2 人外周血中性粒细胞及单核细胞分离** 采集 AS 患者及正常对照人群的新鲜抗凝全血,严格按照人外周血中性粒细胞及单核细胞分离试剂盒说明书进行操作,分离出 AS 患者及正常对照人群的外周血中性粒细胞及单核细胞。

**1.2.3 Western blot 检测 SPARCL1 蛋白表达情况** 采集细胞后对细胞进行裂解、离心,得到细胞蛋白液。随后使用 BCA 法对得到的蛋白液进行定量,计算出各样品的蛋白浓度,将各样品浓度调整相同,经过制胶、电泳、转膜、封闭以及 4℃ 孵育一抗(多克隆抗 SPARCL1 抗体,1:200)12 h 和室温孵育二抗

(通用型二抗,1:5 000)2 h,最后经过显影得到 SPARCL1 的蛋白条带并拍照记录。

**1.2.4 免疫组织化学实验(immunohistochemistry, IHC)评估 SPARCL1 蛋白在 AS 斑块区的表达水平**

将 AS 斑块区组织石蜡切片分别置于二甲苯溶液、70%乙醇、85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、纯水中进行脱蜡。随后在枸橼酸钠缓冲液中修复抗原。加入适量内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min。孵育结束后用 PBS 轻微冲洗 3 次,每次 2 min。滴加适量多克隆抗 SPARCL1 抗体(1:200)覆盖全部组织,37℃ 孵育 60 min, PBS 冲洗 3 次,滴加通用型二抗,室温孵育 20 min,加入新鲜配置 DAB 显色液,室温孵育 6 min,自来水冲洗后苏木精复染 20 s。封片、观察。

**1.2.5 SPARCL1 重组腺病毒包装及验证** 合成 SPARCL1 短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)反向互补引物以及 SPARCL1 编码序列(coding sequence, CDS)构建目的基因质粒,随后将目的基因序列重组至腺病毒载体,获得过表达和抑制表达重组腺病毒质粒,对重组质粒进行酶切,随后进行转染,转染操作严格按照转染说明书进行,对获得的初级病毒液进行扩增、纯化,得到 SPARCL1 过表达及抑制表达的重组腺病毒。在 6 孔板中培养小鼠巨噬细胞(J774A.1),待细胞长至 60% 时将病毒注入 6 孔板内(每孔 5  $\mu$ l),板内设置空白对照,继续培养,分别在 24、48 h 时荧光下拍照,观察转染效率。在 60 h 时收集细胞,提取细胞蛋白测量 SPARCL1 蛋白表达量并进行对比验证。

**1.2.6 细胞划痕实验检测 SPARCL1 对细胞增殖和迁移的影响** 在细胞培养皿中培养小鼠巨噬细胞(J774A.1),待细胞铺满培养皿后均匀转入细胞 6 孔板,待细胞长至 60% 每孔时分别于不同孔注入 SPARCL1 干扰病毒、SPARCL1 过表达病毒。待细胞均匀铺满 6 孔板后(约 48 h),使用 200  $\mu$ l 枪头垂直于板面在 6 孔板中划出直径约 1 mm 的直线, PBS 清洗 6 孔板以洗去游离细胞,加入细胞专用无血清培养基培养,在划痕后的 0、12、24 h 分别在显微镜下拍照记录每孔划痕直径。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 27.0 统计软件、ImageJ 以及 Graphpad Prism 9.0 对采集数据进行处理分析。正态分布定量资料以  $\bar{x} \pm s$  描述,两组间比较采用 *t* 检验;定性资料采用频率描述,组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 研究对象的一般特征及 SPARCL1 在血清中的表达情况** 患者组与对照组男女所占比例均分别为 54.8% 及 45.2%，平均年龄均为 50.02 岁。两组研究对象的性别、年龄差异无统计学相关性，组间具有可比性。ELISA 检测结果显示，患者组与对照组的血清 SPARCL1 浓度差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，即 AS 患者血清 SPARCL1 表达明显低于正常对照。见表 1。

表 1 研究对象一般特征及 SPARCL1 血清浓度的比较

指标	患者组 (n=394)	对照组 (n=394)	t 值	P 值
性别			0.380	0.726
男性[n(%)]	216(54.8)	216(54.8)		
女性[n(%)]	178(45.2)	178(45.2)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	50.02 $\pm$ 6.11	50.02 $\pm$ 6.11		0.407
SPARCL1 浓度 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$ )	469.34 $\pm$ 69.60	532.03 $\pm$ 74.30	-3.015	0.003

**2.2 SPARCL1 在 AS 斑块中的表达情况** 对 AS 斑块病变动脉组织免疫组织化学染色 (SPARCL1 呈棕黄色), AS 患者的粥样硬化斑块部位的 SPARCL1 的表达量高于邻近正常动脉组织, 且主要表达在泡沫细胞胞质 (图 1)。通过对比正常动脉和病变动脉的免疫组织化学染色发现, 相比于正常对照人群, AS 患者血清中 SPARCL1 表达量下降 ( $t = 2.97, P < 0.05$ )。

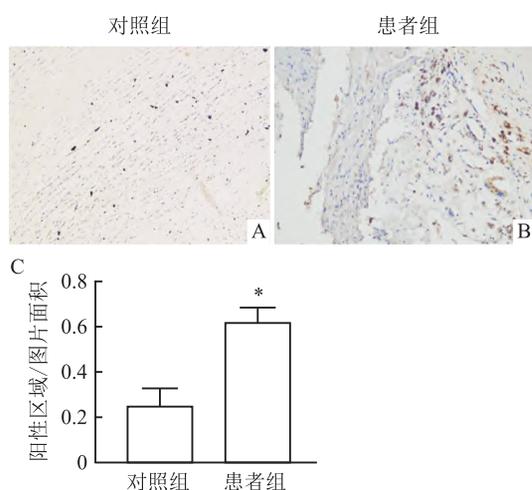


图 1 SPARCL1 在 AS 病变部位 (B) 以及正常动脉组织 (A) 中表达的 IHC 染色图  $\times 200$  以及免疫组化 SPARCL1 表达量对比统计图 (C)  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 2.3 AS 患者外周血中性粒细胞及单核细胞

**SPARCL1 蛋白表达情况** AS 斑块部位的成分细胞主要源于血液中的单核细胞和中性粒细胞的募集, Western blot 检测结果显示, 两组外周血中性粒细胞及单核细胞均有 SPARCL1 表达, 并且 AS 患者的 SPARCL1 蛋白表达量均低于对照组 ( $t = 3.05, 2.83$ , 均  $P < 0.01$ ) (图 2)。

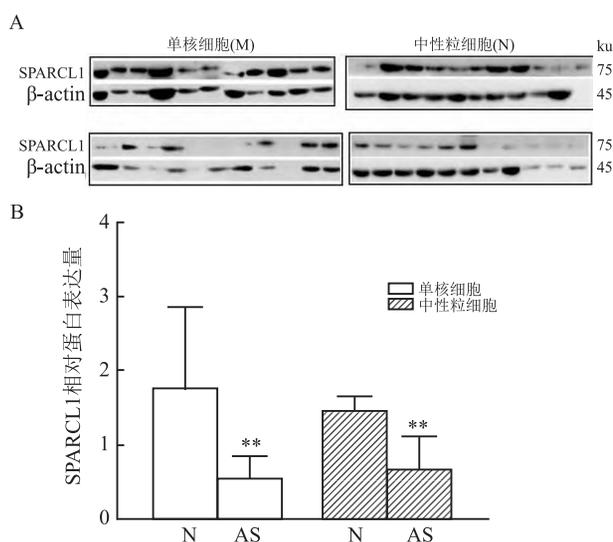


图 2 两组细胞 SPARCL1 蛋白表达量的比较

N: 对照组; AS: 患者组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.4 SPARCL1 过表达及抑制表达重组腺病毒的包装效果验证** 靶细胞感染 24、48 h 后, 分别置于荧光显微镜下观察并拍照, 可见细胞中有荧光显示, 且 48 h 荧光数量  $> 24$  h。说明 SPARCL1 过表达及抑制表达重组腺病毒感染成功 (图 3)。随后培养至 60 h 提取细胞蛋白进行 Western blot 实验检测 SPARCL1 蛋白表达量, 结果显示, 用 SPARCL1 过表达重组腺病毒感染的 J774A.1 细胞可观察到 SPARCL1 蛋白表达水平上升 ( $t = -2.19, P < 0.05$ ), 用

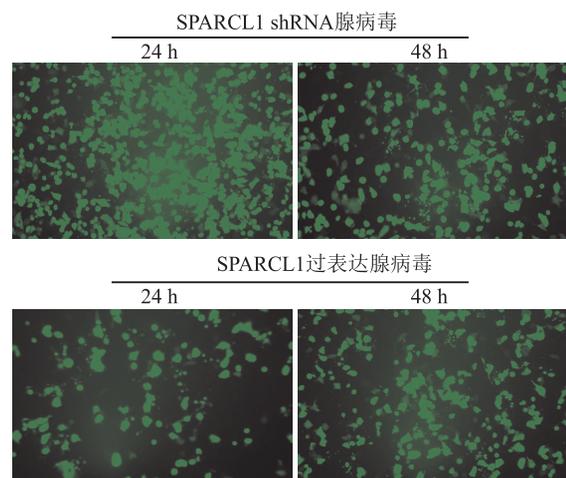


图 3 腺病毒感染后荧光显微镜下拍照  $\times 20$

SPARCL1重组腺病毒感染J774A.1细胞可观察到SPARCL1蛋白表达水平降低( $t = 2.64, P < 0.01$ ),表明SPARCL1过表达和抑制表达重组腺病毒包装成功(图4)。

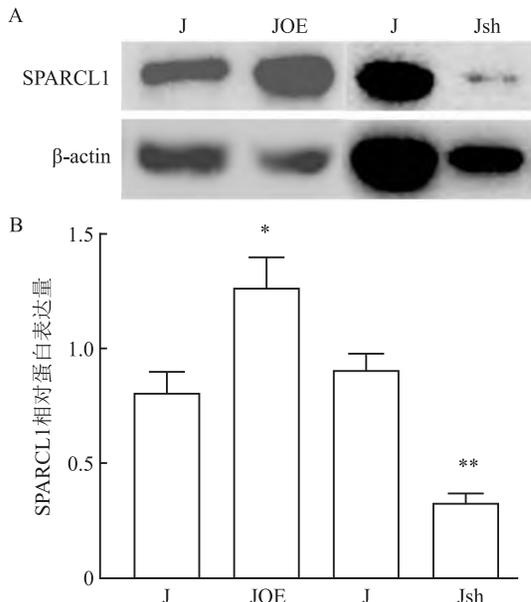


图4 两组细胞感染SPARCL1重组腺病毒后SPARCL1蛋白表达量的比较

J: J774A.1 对照组; JOE: 过度表达组; Jsh: 抑制表达组; 与J774A.1 对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.5 SPARCL1对巨噬细胞迁移的影响** 细胞划痕实验结果显示,SPARCL1抑制表达组的迁移距离低于对照组( $t = 3.12、-2.58$ ,均  $P < 0.05$ )。这表明SPARCL1参与到了巨噬细胞的迁移过程(图5)。

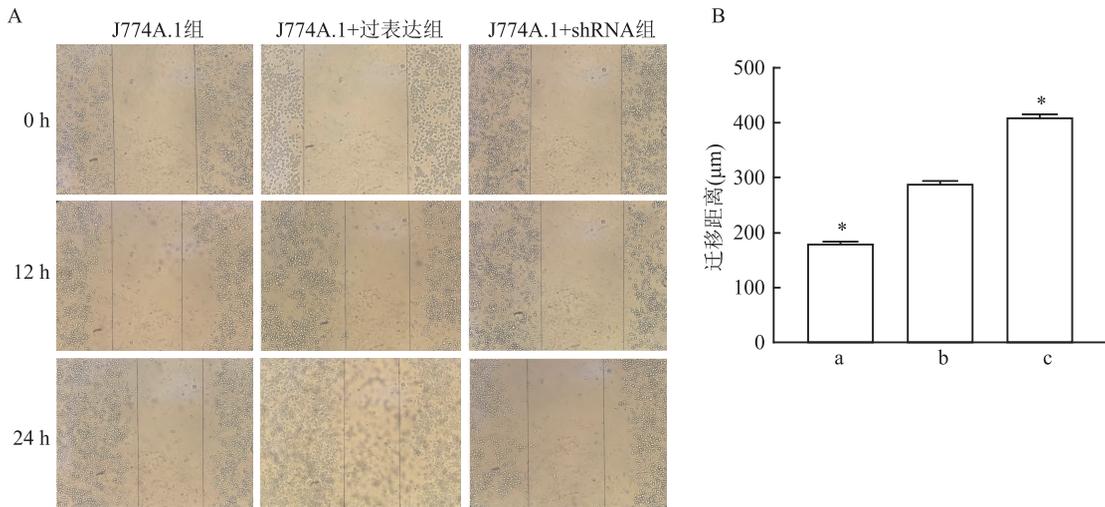


图5 SPARCL1重组腺病毒感染靶细胞进行细胞划痕实验检测迁移距离

A: 划痕后显微镜下拍照  $\times 100$ ; B: 三组细胞迁移速率的比较; a: J774A.1 + 抑制表达组; b: 对照组; c: J774A.1 + 过表达组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

SPARCL1在1990年首次在大鼠中枢神经系统发现,并命名为SCI<sup>[5]</sup>。随后又从非小细胞肺癌的内皮细胞和人扁桃体淋巴组织的高内皮小静脉中克隆了Hevin的基因<sup>[10-11]</sup>。SPARCL1定位于染色体4q22-25,横跨约47 kb的基因组。SPARCL1由N端酸性结构域、卵泡抑制剂样结构域以及细胞外钙离子结合域<sup>[9]</sup>组成。

目前关于SPARCL1的研究主要在其与癌症的关系,其与AS之间关系的研究尚少。在以往研究<sup>[12]</sup>显示,SPARCL1与血管壁稳定的维持有关。而AS发生的重要环节之一是血管内皮功能的障碍,因此SPARCL1可能参与AS发生过程。并且既往有学者<sup>[13-15]</sup>认为AS是一种血管壁的癌症,它们在一些病理过程中较为相似,如:① AS和癌症都有不受控制的细胞增殖<sup>[15]</sup>;② 两种疾病都有细胞粘附分子的变化,分别与动脉粥样斑块的形成和肿瘤细胞的迁移和侵袭有关<sup>[14]</sup>;③ 都有相应的炎症表现<sup>[13]</sup>;④ 都与氧化应激密切相关<sup>[13]</sup>;⑤ 有血管生成和细胞凋亡。提示SPARCL1有可能作为一种血管保护因素参与抑制AS的发生发展。

在2009年的一个通过对人类动脉硬化病变的外周血白细胞转录组的研究<sup>[7]</sup>中,SPARCL1就被视为与AS有关的新的候选基因。最近,在对人类AS斑块的单细胞转录组的研究<sup>[8]</sup>中显示,SPARCL1在AS组织中表达。本研究也显示SPARCL1在AS

斑块中表达升高,且 AS 患者的血清 SPARCL1 水平明显低于正常人,提示 SPARCL1 很可能参与 AS 的发生发展过程。

此外,本研究显示 AS 患者及正常对照的外周血中性粒细胞及单核细胞均有 SPARCL1 表达,并且 AS 患者的表达量低于健康对照,免疫组织化学染色发现 SPARCL1 主要表达于 AS 斑块中的泡沫细胞,这表明 AS 斑块中高表达 SPARCL1 可能是由于在 AS 的炎症过程中,将血液中的单核细胞和中性粒细胞募集至斑块部位并随后演变为泡沫细胞。

SPARCL1 具有调节细胞的黏附、迁移和增殖的作用<sup>[5]</sup>。巨噬细胞在 AS 发生中的作用不可忽视,而 SPARCL1 是否参与了巨噬细胞在斑块中的增殖或迁移过程,对斑块形成的影响还需要进一步证明。本研究结果显示,抑制 SPARCL1 表达的巨噬细胞迁移率降低,该结果为 SPARCL1 参与 AS 的具体过程提供了研究方向。

综上所述,本研究证明 AS 病变部位泡沫细胞高表达的 SPARCL1 有可能来自于外周血单核细胞和中性粒细胞的代偿性募集,SPARCL1 可能作为血管保护因子参与抑制 AS 斑块的发生发展。后续将通过继续完善细胞表型实验,建立 SPARCL1 基因敲除小鼠模型以明确 SPARCL1 影响 AS 斑块形成的具体机制,探讨 SPARCL1 成为 AS 诊疗新靶点的可能性。

### 参考文献

- [1] Li J J, Gao R L. Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall? [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 64(4): 694-8.
- [2] Tapia-Vieyra J V, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Atherosclerosis and cancer; a resemblance with far-reaching implications [J]. *Arch Med Res*, 2017, 48: 12-26.
- [3] Ouimet M. Autophagy in obesity and atherosclerosis: interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(6): 1124-33.
- [4] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-26.
- [5] Bradshaw A D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(3): 480-8.
- [6] Cheng X, Chen X, Zhang M, et al. Sparcl1 and atherosclerosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 2121-7.
- [7] Timofeeva A V, Gorunova L E, Khaspekov G L. Comparative transcriptome analysis of human aorta atherosclerotic lesions and peripheral blood leukocytes from essential hypertension patients [J]. *Kardiologiia*, 2009, 49(9): 27-38.
- [8] Depuydt M A C, Prange K H M, Slenders L, et al. Microanatomy of the human atherosclerotic plaque by single-cell transcriptomics [J]. *Circ Res*, 2020, 127(11): 1437-55.
- [9] 陈心严,程 煦,陈婷婷,等. SPARCL1 基因多态性与动脉粥样硬化遗传易感相关性分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5): 872-5, 884.
- [10] Schraml P, Shipman R, Stulz P, et al. cDNA subtraction library construction using a magnet-assisted subtraction technique (MAST) [J]. *Trends Genet*, 1993, 9(3): 70-1.
- [11] Girard J P, Springer T A. Cloning from purified high endothelial venule cells of hevin, a close relative of the antiadhesive extracellular matrix protein SPARC [J]. *Immunity*, 1995, 2(1): 113-23.
- [12] Naschberger E, Liebl A, Schellerer V S, et al. Matricellular protein SPARCL1 regulates tumor microenvironment-dependent endothelial cell heterogeneity in colorectal carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(11): 4187-204.
- [13] Ross J S, Stagliano N E, Donovan M J, et al. Atherosclerosis: a cancer of the blood vessels? [J] *Am J Clin Pathol*, 2001, 116(Suppl): S97-107.
- [14] Cordero A, Fácila L, García-Carrilero M, et al. Breakfast habits in patients hospitalized for acute coronary syndrome [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2015, 68(9): 814-5.
- [15] de Nigris F, Sica V, Herrmann J, et al. c-Myc oncoprotein: cell cycle-related events and new therapeutic challenges in cancer and cardiovascular diseases [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 325-8.

## The role of SPARCL1 in atherosclerotic plaque formation

Cheng Xu<sup>1</sup>, Chen Xinyan<sup>2</sup>, Chen Tingting<sup>3</sup>, Cheng Xiaowen<sup>2</sup>, Zhu huaqing<sup>4</sup>, Ge Shenglin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Cardiovascular Surgery, <sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>3</sup>Dept of Pathology, <sup>4</sup>Laboratory of Molecular Biology and Dept of Biochemistry, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of cysteine-rich acidic secretory protein-like protein 1 (SPARCL1) on atherosclerosis (AS) plaque formation. **Methods** A case-control study design was used, 394 patients with confirmed AS were selected as the case group, and 394 healthy medical examiners matched for age and gender were selected as the control group. The expression level of serum SPARCL1 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay; immunohistochemistry was used to assess the expression level and localization of SPARCL1 protein in

# 大麻二酚对创伤性脑损伤大鼠脑皮质 Occludin、ZO-1 表达水平及血脑屏障通透性的影响

李佳丽<sup>1\*</sup>, 曹艳<sup>1\*</sup>, 凌腾哈<sup>1</sup>, 尹爱平<sup>1</sup>, 李恒希<sup>1</sup>, 李经辉<sup>2</sup>, 张瑞林<sup>3</sup>, 吴海鹰<sup>4</sup>, 李坪<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察创伤性脑损伤(TBI)大鼠血脑屏障(BBB)中紧密连接蛋白闭合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白1(ZO-1)的表达及变化趋势,探讨大麻二酚(CBD)对BBB的干预作用。方法 采用改良Feeney自由落体法制备大鼠TBI模型,将大鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、模型组(TBI+vehicle组)和CBD干预组(TBI+CBD组),每组24只;每个组又分为损伤后8h、1、2、3、5和7d共6个时间点,通过免疫组化和免疫荧光染色,Western blot检测与BBB通透性密切相关的Occludin和ZO-1在不同时间点的表达情况;通过荧光素钠实验检测BBB通透性。结果 免疫组

化实验结果表明,与假手术组相比,TBI后随着时间推移Occludin和ZO-1蛋白阳性表达减少( $P < 0.05$ ),2d达到最低;CBD干预1d后Occludin和ZO-1蛋白表达水平均上调( $P < 0.05$ );免疫荧光染色实验与Western blot结果趋势近似,与假手术组相比,TBI后Occludin和ZO-1荧光表达强度及蛋白表达量减少( $P < 0.05$ ),CBD干预2d后Occludin和ZO-1表达水平上调( $P < 0.05$ );荧光素钠实验结果表明,TBI后脑组织BBB完整性遭到破坏,通透性升高( $P < 0.01$ ),CBD干预后BBB通透性下降( $P < 0.05$ )。结论 TBI后紧密连接蛋白Occludin和ZO-1表达下降,BBB通透性升高,CBD干预可逆转TBI对BBB的破坏。

**关键词** 大麻二酚;创伤性脑损伤;血脑屏障;紧密连接蛋白;大鼠;闭合蛋白;闭锁小带蛋白1

**中图分类号** R 742

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2024)03-0478-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.017

2024-02-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060241,82260387);云南省科技厅计划项目(编号:202101AY070001-002);昆明医科大学研究生创新基金(编号:2023S133)

作者单位:昆明医科大学<sup>1</sup>人体解剖学与组织胚胎学系、<sup>3</sup>法学院,昆明 650500

昆明医科大学第一附属医院<sup>2</sup>神经外科、<sup>4</sup>急诊科,昆明 650032

作者简介:李佳丽,女,硕士研究生;

吴海鹰,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:why02092022@163.com;

李坪,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:kyzplp@163.com

\*对本文具有同等贡献

创伤性脑损伤(trumatic brain injury,TBI)是一种由于外力作用于大脑而导致的中枢神经系统疾病<sup>[1-2]</sup>。TBI的继发性损伤涉及血脑屏障(blood brain barrier, BBB)受损、水肿、炎症等复杂的级联反应, BBB主要由紧密连接的脑微血管内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞足板和基底膜组成,在维持大脑稳态中至关重要。其完整性与紧密连接蛋白密切相

the AS plaque region, and the expression of SPARCL1 protein was also detected in the neutrophils and monocytes of peripheral blood of AS patients and normal controls; SPARCL1 overexpressing and the recombinant adenoviral vectors were constructed to inhibit SPARCL1 overexpression and expression, and the effects of SPARCL1 on cell migration were observed in the cell scratch assay using mouse macrophage cells (J774A.1) as target cells. **Results** Serum SPARCL1 levels in the AS patient group were lower than those in the healthy group ( $P < 0.05$ ); high SPARCL1 expression was detected in AS plaques and was mainly expressed in the cytoplasm of foamy cells; SPARCL1 expression levels in peripheral blood neutrophils and monocytes were lower than those in normal controls in AS patients ( $P < 0.05$ ); recombinant SPARCL1 overexpression and inhibition of expression of adenovirus was successfully constructed; the cell migration rate was decreased in J774A.1 cells that inhibited SPARCL1 expression and increased in J774A.1 cells that overexpressed SPARCL1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SPARCL1 is highly expressed in foam cells at the site of AS lesions, which may result from compensatory recruitment of peripheral blood monocytes and neutrophils, and SPARCL1 may be involved as a protective factors for blood vessels in inhibiting the development of AS plaques.

**Key words** SPARCL1; atherosclerosis; macrophages; SPARCL1 recombinant adenovirus; cell scratching assay