发放日期	2024.09.10
归档日期	
指导教师（签字）	
第 1 本	共 本

苏州大学研究生科研记录本

（自然科学类专业用）

论文题目：基于血管周围系统药物缓释治疗颈动脉粥样硬化的应用基础研究

培养单位：苏州大学附属第二医院

专　　业：影像医学与核医学

姓　　名：曹泽原

学　　号：20244233019

指导教师：蔡武

使用起止时间：2024.09

记录起止页码：P6-

科研名称：简介与目录 .　　日期：2024年9月10日

课题简介：

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）是心脑血管疾病严重的病理基础，其发生发展与血管壁微环境中脂质代谢紊乱、炎症反应及细胞自噬异常密切相关。研究表明，溶酶体功能障碍导致巨噬细胞胆固醇等脂质聚集并抑制脂自噬，从而促进泡沫细胞形成和加速斑块进展。然而，现有治疗手段难以针对斑块局部微环境进行精准干预。本项目从血管微环境调控角度出发，构建负载GW3965与雷帕霉素的可注射海藻酸钠水凝胶，在超声引导下递送至颈动脉周围间隙，实现药物在血管周围系统的局部缓释与持续作用，从而改善溶酶体功能障碍，恢复脂自噬并促进胆固醇外排，抑制斑块进展。并利用超声技术对系统评估水凝胶局部递药的治疗效果。本研究有望阐明溶酶体功能异常与脂自噬调控在AS中的作用机制，构建基于血管周围局部递药与影像动态评估的新型治疗策略。

Atherosclerosis (AS) is driven by lipid disorder, inflammation, and impaired autophagy in the vascular microenvironment. This project develops an injectable alginate hydrogel loaded with GW3965 and rapamycin and delivers it into the carotid perivascular space under ultrasound guidance to regulate lipophagy and alleviate lysosomal dysfunction. Meanwhile ultrasound will be used to monitor plaque progression and PVAT changes to evaluate therapeutic efficacy. This study aims to elucidate the role of lysosomal dysfunction and lipophagy regulation in AS and establish a perivascular drug delivery strategy for precision intervention.

科研名称：简介与目录.　　日期：2024年9月10日

目录.

文献阅读(24.09.10) ——— 6
细胞培养(RAW264.7) ——— 8
泡沫细胞模型的构建. ——— 16
油红染色. ——— 23
胆固醇水平测定. ——— 32
文献阅读.(2025.09) ——— 42
蛋白免疫印迹WB ——— 46

泡沫细胞模型的构建实验记录

实验简介：

为模拟动脉粥样硬化进程中巨噬细胞脂质负荷及泡沫化过程，本实验采用氧化低密度脂蛋白（oxLDL）刺激RAW264.7细胞构建体外泡沫细胞模型。根据脂质负荷程度不同，设置轻度脂质负荷组（20μg/mL）及重度脂质负荷组（80μg/mL），以探讨不同脂质摄取水平、及模拟不同时期动脉粥样硬化病情中，巨噬细胞的功能状态。

通过不同浓度oxLDL处理，获得体外模拟巨噬细胞由正常状态向泡沫细胞转化的过程，为后续脂质代谢异常相关机制及药物干预实验提供稳定可靠的实验基础。

实验内容：

细胞培养

oxLDL诱导

样本类型（目的对象）：RAW264.7细胞系。

记录内容：

1. 实验仪器与试剂；
2. 实验方法；
3. 实验结果与总结；
4. 参考文献及资料。

目录

一、实验仪器与试剂　18
1. 试验仪器.——————18
2. 实验试剂及配化.————18
3. 相关耗材.——————18
二. 实验方法.　19
1. 细胞培养.——————19
2. ox-LDL诱导的泡沫细胞模型构建.——19
三、实验结果与总结.　20
1. 实验结果.——————20
2. 总结与反思.————22
四. 参考文献或资料　22

科研名称：泡沫细胞模型的构建.　　日期：2014年5月21日

一. 实验仪器与试剂.

1. 实验仪器.

同细胞培养部分的实验仪器(P10).

2. 实验试剂及配比

试剂名称	浓度/规格	厂家/品牌
氧化型低密度脂蛋白 ox-LDL	YB-002 2mg/mL	广州奕元生物, 中国

其余试剂可参考细胞培养部分(P10).

3. 相关耗材.

6孔细胞培养板 six wells cell culture plate. NEST, 中国

其余耗材可参考细胞培养部分(P11).

二. 实验方法.

人细胞培养：

常用的针对RAW264.7的细胞复苏传代，可参考细胞培养部分(P11-12)

2. ox-LDL诱导的泡沫细胞模型构建.

(1). 细胞计数.

取生长状态良好的RAW264.7细胞，弃培养基后用PBS缓冲液轻轻洗涤1次，加入适量PBS重悬后，取10μL细胞悬液加入细胞计数板内，于倒置显微镜下计数4个大方格内的活细胞数量，取4个大格细胞数平均值，依照以下公式计算细胞数量：

细胞数量(Amount of Cells) =

平均每大格细胞数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数.

(2) ox-LDL的诱导.

将包含 1×10^6 个细胞的细胞悬液加入六孔板的单个孔内，接着用新鲜培养基补足至 2mL/孔. 轻轻摇晃后，于37℃ CO_2 培养箱中静置 5h.

5h后，利用倒置显微镜观察六孔板中细胞. 若细胞长至60%-70%后，吸去原有培养基. 按照80μg/mL和20μg/mL的浓度，从2mg/mL的ox-LDL原液中配置新培养基(各组各2mL). 接着将新培养基加入孔内. 细胞于37℃，5% CO_2 条件下继续孵育24h，以诱导巨噬细胞发泡泡沫细胞模型. 诱导结束后，弃去培养基，可依据不同目的加入不同体系的液体以便进行下一步实验.

二. 实验结果与总结.

1. 实验结果：

各孔内计数结果较为一致，重复性良好，说明细胞分布均匀，计数结果可靠. 经计算，细胞悬液浓度约为 1×10^7 cells/ml，处于预期范围内，能够满足后续实验对接种细胞的要求.

经不同浓度 ox-LDL 处理后，RAW264.7 细胞形态发生明显变化.

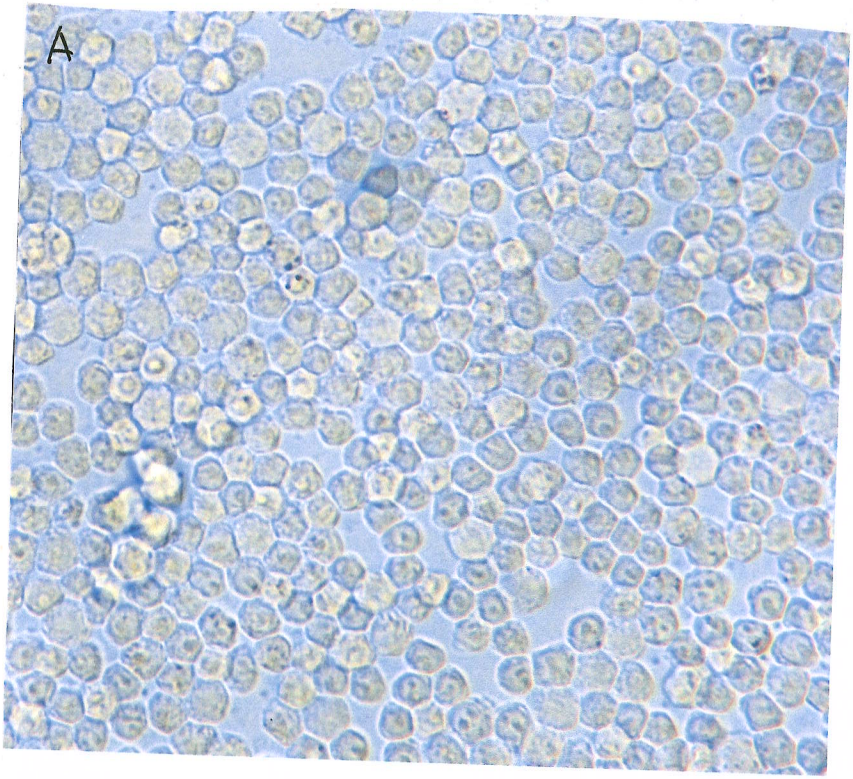
与对照组相比，20 μg/mL ox-LDL 处理组，即轻度脂质负荷处理组，细胞内可见多量脂滴形成，部分细胞体积增大，胞质内出现若干分布均匀的脂质空泡，提示细胞已开始发生脂质摄取及早期泡沫化改变.

在 80 μg/mL ox-LDL 处理组（重度脂质负荷）中，细胞内脂滴显著增多并融合形成较大脂滴，脂质明显积聚，细胞形态趋于圆形或泡沫样改变，呈典型泡沫细胞形态特征，与轻度脂质负荷组及对照组相比，重度脂质负荷组脂质聚集程度明显加重.

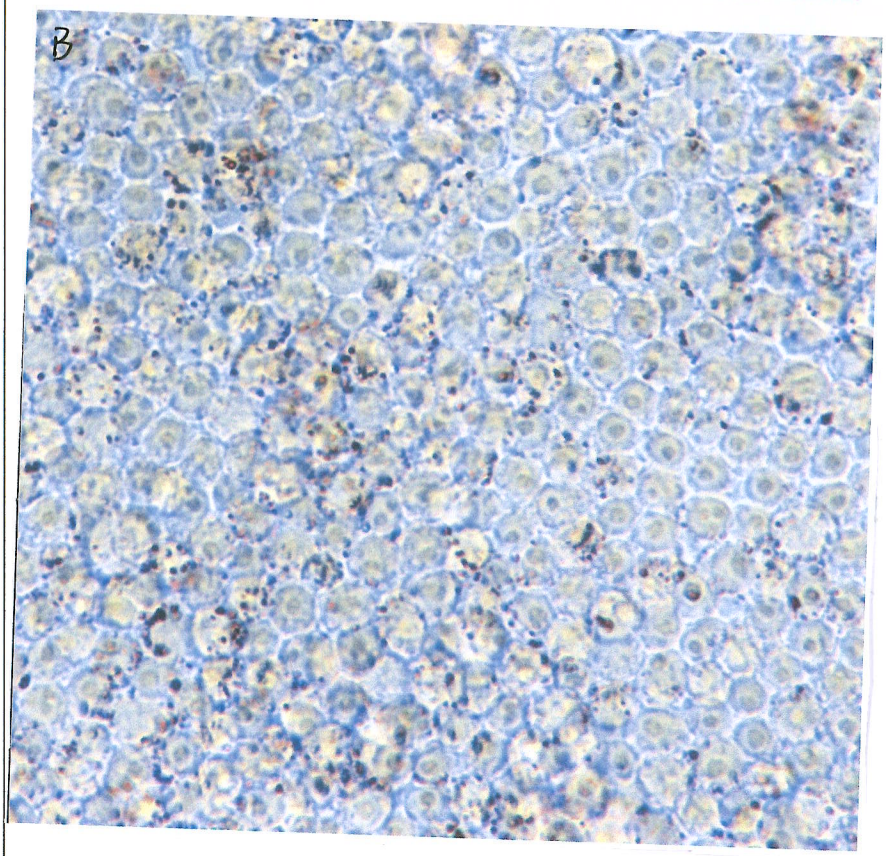
上述结果表明，ox-LDL 处理能够有效诱导 RAW264.7 细胞发生脂质摄取及泡沫化改变，且这种变化呈浓度依赖性趋势. 本次实验所建立的轻度与重度脂质负荷模型，为后续 AS 早期及中晚期斑块巨噬细胞的质谱检测提供了稳定且具有梯度差异的实验体系和模型基础.

科研名称：泡沫细胞模型的构建　　日期：2024年9月24日

相关图像：



图A为40×显微镜的正常细胞形态图.



图B为40×显微镜下的泡沫细胞形态图(油红染色处理).

2024.9.25

科研名称：泡沫细胞模型的构建　　日期：2024 年 4 月 25 日

2.总结与反思：

细胞初始状态对模型构建具有重要影响。处于对数生长期、贴壁状态良好且高密度传代的细胞更易形成稳定的泡沫细胞模型。

RAW 264.7 作为巨噬细胞系，其功能状态具有一定可塑性，可因不同外源刺激发生明显的极化改变。

四.参考文献或资料：

[1] Gao C, Chang Y, Li H, et al. Targeted Therapy of Atherosclerosis via macrophage-biomimetic nanoparticles. Nature Communications, 2020, 11: 2622.

[2] Zhang Y, Li X, Lin Y, et al. Injectable hydrogel system for targeted delivery in Atherosclerosis therapy. Polymers, 2025, 17(5): 625.

[3] Zhang C, Wang X, Lin M, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces foam cell formation and inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. Front Pharmacol, 2023, 14: 1123456.

[4] Li H, Chen Z, Wang Y, et al. Restore of lipophagy attenuates lipid accumulation in macrophage-derived foam cells. Bioactive Materials, 2024, 30: 345-356.

[5] 上海奕元生物科技有限公司. 氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)试剂说明书[Z]，上海：上海奕元生物科技有限公司.