

## 亲环素 A 在巨噬细胞荷脂过程中的影响

涂剑<sup>1</sup>, 严鹏科<sup>1</sup>, 王北冰<sup>2</sup>, 曹轩<sup>1</sup>, 王蓉蓉<sup>1</sup>, 廖端芳<sup>1</sup>

(南华大学 1. 药物药理研究所; 2. 诊断学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 亲环素 A; 巨噬细胞; 荷脂化; 脂蛋白, 低密度, 氧化; 胆固醇蓄积; Western blot 法; 高效液相色谱法

[摘要] 目的 观察胆固醇转运复合物中关键蛋白亲环素 A 在氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞荷脂过程中的表达变化及其与细胞内胆固醇蓄积的关系, 进而分析亲环素 A 在巨噬源性泡沫细胞形成过程中的作用。方法 采用 75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与 RAW264.7 细胞共同孵育, 建立巨噬细胞荷脂化模型; Western blot、免疫荧光法检测亲环素 A 蛋白的表达水平; 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量的变化。结果 75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与 RAW264.7 细胞共同孵育 48 h 后, 亲环素 A 的蛋白表达逐渐减弱, 48 h、72 h 分别较未处理组下降了 54.5% ± 6.3%、59.8% ± 5.9% ( $P < 0.05$ )。间接免疫荧光定位检测发现氧化型低密度脂蛋白显著抑制 RAW264.7 细胞中亲环素 A 在胞膜、胞浆中的表达, 且随着处理时间的延长作用更明显。细胞内胆固醇酯/总胆固醇的比值由未处理组的 28.3% ± 1.2% 上升至 48 h 的 42.3% ± 5.9% ( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 巨噬细胞泡沫化过程中, 亲环素 A 的表达下调与细胞胆固醇蓄积密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Cyclophilin A on Cellular Cholesterol Accumulation in Lipid-Loaded Macrophages Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

TU Jian<sup>1</sup>, YAN Peng-Ke<sup>1</sup>, WANG Bei-Bing<sup>2</sup>, CAO Xuan<sup>1</sup>, WANG Rong-Rong<sup>1</sup>, and LIAO Duang Fang<sup>1</sup>

(1. Institute of Pharmacy and Pharmacology; 2. Department of Diagnosis, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Cyclophilin A; RAW264.7 Macrophages; Lipid-Loaded; Oxidized Low Density Lipoprotein; Cholesterol Accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the protein expression of Cyclophilin A in lipid-loaded macrophages induced by oxidized low density lipoprotein and its effect on cellular cholesterol accumulation. **Methods** RAW264.7 mouse macrophages were treated with 75 mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for different time (control, 24 hours, 48 hours and 72 hours). Western blot analysis and immunofluorescence were used to detect protein expression of Cyclophilin A. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to determine the content of cellular total cholesterol and cholesterol ester. **Results** Western blot analysis and immunofluorescence showed that the protein expression of Cyclophilin A was significantly decreased in a time-dependent manner in macrophages. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed the content of cellular total cholesterol and cholesterol ester were increased greatly. **Conclusions** The protein expression of Cyclophilin A was down regulated in lipid-loaded macrophages while the content of cellular total cholesterol and cholesterol ester were increased greatly.

亲环素 A (Cyclophilin A, CypA) 广泛存在于细胞胞浆, 是免疫抑制剂环孢霉素 A 在细胞内的作用靶点<sup>[1, 2]</sup>。近年来, 随着人们对亲环素 A 研究的不断深入, 发现亲环素 A 参与了细胞内胆固醇转运复合物的形成<sup>[3]</sup>。因此, 针对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的单核源性泡沫细胞形成过程中出现的胆固醇流出障碍、氧化

损伤等情况, 我们提出: 胆固醇转运复合物蛋白亲环素 A 可能在 ox-LDL 诱导的单核源性泡沫细胞内胆固醇蓄积中发挥作用。研究拟采用 ox-LDL 与 RAW264.7 巨噬细胞共同孵育不同时间, 观察亲环素 A 在巨噬细胞荷脂过程中表达的变化, 及其对细胞内胆固醇蓄积的影响, 进而研究亲环素 A 在单核源性泡沫细胞形成过程中的作用。

[收稿日期] 2005-04-13 [修回日期] 2005-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (30178034)、湖南省医药卫生基金 (B2004-086 和 C2005094) 资助。

[作者简介] 涂剑, 硕士研究生, 助教, E-mail 为 xiaotutj0706@sina.com.cn。严鹏科, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail 为 yanpk@tom.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 联系电话为 0734-8281408, E-mail 为 dfliao66@yahoo.com.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DMEM 培养基和无脂蛋白血清 (LPDS) 均购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自北京赛泰克公司; 胰

蛋白酶购自美国 Hyclone 公司; 亲环素 A 购自 UP State (USA)、 $\beta$ -actin 购自 Santa Cruz Biotechnology (USA)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠二抗购自武汉 Boster; FITC 标记的山羊抗兔二抗购自 Sigma(USA) 公司; Western blot 荧光检测试剂盒为 Santa Cruz Biotechnology(USA) 产品; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Hyclone. Pierce(USA) 公司; 丽春红染色试剂购自 Sigma(USA) 公司; 乙腈、异丙醇等高效液相色谱试剂购自美国 Tedia 公司; 聚丙烯酰胺、亚甲基聚丙烯酰胺、考马斯亮蓝、TEMED、过硫酸铵均购自长沙金泰克公司 Sigma(USA) 公司产品; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

## 1.2 RAW264.7 细胞培养

鼠源性巨噬细胞 RAW264.7 细胞购自中科院上海细胞生物所细胞中心。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调细胞密度至  $1 \times 10^8$  个/L, 接种于 50 mL 培养瓶中, 24 h 后用含 ox-LDL 的 10% 无脂蛋白血清(LPDS)-DMEM 培养基诱导不同时间, 其间每 48 h 换液一次。

## 1.3 低密度脂蛋白的氧化修饰

按文献[4]方法, 取未加抗凝剂的健康人新鲜全血 200 mL, 室温下静置 1 h, 弃血凝块, 以  $4^\circ\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 30 min, 获血清后加入  $\text{NaN}_3$ 、10% EDTA 防腐、防氧化。低密度脂蛋白(native low density lipoprotein, n-LDL) 采用超速离心法分离。 $4^\circ\text{C}$ 、30 000 r/min 离心 18 h, 吸出上层乳白色液体(VLDL)及次层淡黄色液体(IDL); 收集下层液体, 用液体调整密度, 再  $4^\circ\text{C}$ 、40 000 r/min 离心 24 h, 吸出上层黄色液体即为 LDL。将 LDL 置于 PBS 溶液中,  $4^\circ\text{C}$  透析 36 h, 充分去除 EDTA 后, 用含  $10 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  的 PBS 溶液(pH 7.2),  $37^\circ\text{C}$  透析 20 h, 进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL(ox-LDL) 置含  $100 \mu\text{mol/L}$  EDTA 的 PBS 中,  $4^\circ\text{C}$  透析 24 h, 终止氧化。经超滤除菌, BCA 试剂定量蛋白, 调蛋白浓度至 1 g/L 用于实验。

## 1.4 Western-blot 检测亲环素 A 和 $\beta$ -actin 蛋白表达

收集不同条件处理的 RAW264.7 细胞, MBST 裂解液(25 mmol/L MBS pH= 6.5, 0.15 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100) 裂解细胞,  $4^\circ\text{C}$ 、5 000 r/min 离心去除沉淀, BCA 试剂测定蛋白含量, 上样缓冲液调各组蛋白量一致, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 积层胶 80 mV, 分离胶 130 mV 电泳 2 h 后( $4^\circ\text{C}$ , 110 mA, 3 h) 转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白分子量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h, 按 1: 700 加入亲环素 A 或  $\beta$ -actin 一抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 1: 1 000 加入辣根过氧

物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育 0.5 h, TBST 洗 3 次后, 用 Westerr-blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson 1650 photo 扫描仪收集图像。

## 1.5 间接免疫荧光方法检测亲环素表达

RAW264.7 细胞接种于 12 孔板中, 经 ox-LDL 75 mg/L 分组处理后, 用预热至  $37^\circ\text{C}$  的 PBS 洗 3 遍, 用 10% 甲醛固定( $4^\circ\text{C}$  过夜,  $37^\circ\text{C}$  15 min); 弃去孔板内液体, 加 1 mL 穿透液(放置  $37^\circ\text{C}$  20 min), 弃去穿透液, 加 CypA 一抗( $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h), TBST 洗 3 遍, 弃去洗液, 加 FITC 标记的羊抗兔二抗( $37^\circ\text{C}$ , 避光孵育 30 min), TBST 洗 3 遍后穿透液清洗, 荧光显微镜下观察。

## 1.6 细胞内胆固醇的检测

参照文献[5], 待细胞处理结束后, 弃去培养基, PBS 洗 3 遍, 加入  $0.1 \text{ mol/L}$  NaOH 500  $\mu\text{L}$ , 反复冻融 3 次裂解细胞, BCA 试剂定量蛋白后, 7.2% 三氯乙酸沉淀蛋白,  $800 \times \text{g}$  离心 10 min, 留上清进行胆固醇检测。以豆甾醇为内标并作标准曲线, 取 100  $\mu\text{L}$  上清液, 加入  $8.9 \text{ mol/L}$  氢氧化钾溶液 200  $\mu\text{L}$ , 水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇样品, 加入  $1 \text{ mol/L}$  氢氧化钠 200  $\mu\text{L}$  为游离胆固醇样品。各样品分别与内标液混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 用  $1.5 \text{ mol/L}$  三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 100  $\mu\text{L}$  乙腈-异丙醇(80:20)溶解样品, 上样于高效液相色谱仪。采用 C-18 柱, 柱温  $4^\circ\text{C}$ , 流速  $1 \text{ mL/min}$ , 250 nm 紫外光检测, 胆固醇以峰面积定量, 内标校准, 以 mg/g 细胞蛋白为单位。胆固醇酯/总胆固醇值 = [细胞内总胆固醇含量 - 细胞内游离胆固醇含量 (mg/g)]  $\div$  细胞内总胆固醇含量 (mg/g)  $\times 100\%$ 。

## 1.7 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较用方差分析, 两组间均数比较采用 Student-Newmarr-Keuls 检验。用 SPSS11.0 for windows 统计软件分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对亲环素 A 蛋白表达的影响

不同浓度 ox-LDL (25、50 和 75 mg/L) 对 RAW264.7 细胞处理 48 h 发现, 亲环素 A 蛋白表达随着 ox-LDL 浓度的增加逐渐减弱, 分别为未处理组的  $75.2\% \pm 6.8\%$ 、 $63.7\% \pm 5.5\%$  和  $45.5\% \pm 3.7\%$  ( $P < 0.05$ ) (图 1, Figure 1)。因此, 我们选择了 75

mg/L 作为 ox-LDL 对 RAW264.7 细胞的处理浓度。

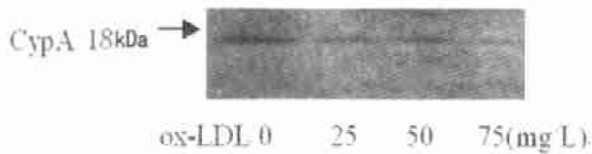


图 1. Western blot 法检测氧化型低密度脂蛋白对亲环素 A 蛋白表达的影响

Figure 1. Western blot analysis detected protein expression of Cyclophilin A after the cells treated with different concentration of ox-LDL for 48 hours

## 2.2 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对亲环素 A 蛋白表达的影响

用 75 mg/L ox-LDL 对 RAW264.7 细胞处理 48 h 后发现, 亲环素 A 蛋白表达明显减少, 与未处理组比较 48 h 下降了 54.5% ± 6.3%, 72 h 下降了 59.8% ± 5.9% ( $P < 0.05$ ) (图 2A, Figure 2A)。间接免疫荧光定位检测发现 ox-LDL 显著抑制 RAW264.7 细胞中亲环素 A 在胞膜、胞浆中的表达, 且随着处理时间的延长, 作用更明显(图 2B, Figure 2B)。

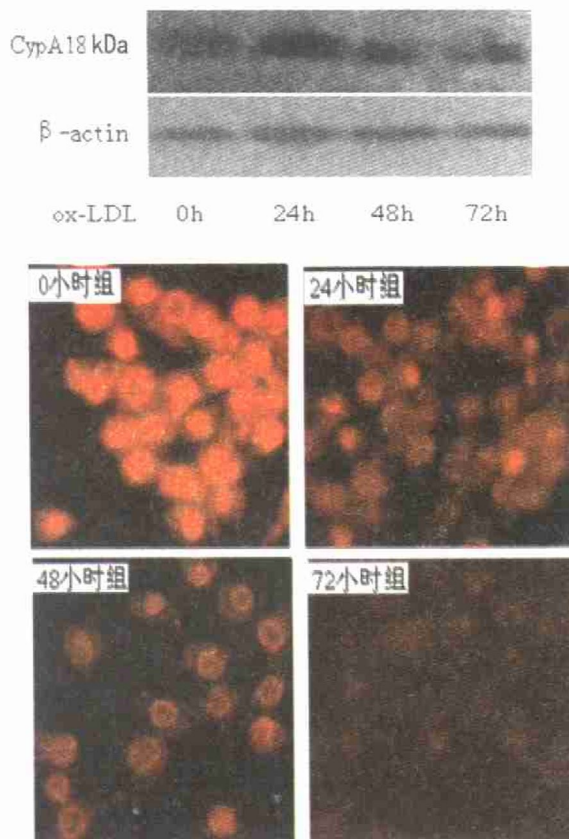


图 2. 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对亲环素 A 蛋白表达的影响 A 为 Western blot 检测, B 为 间接免疫荧光法检测。

Figure 2. Protein expression of Cyclophilin A after treated with 75 mg/L ox-LDL for different time

## 2.3 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对胆固醇含量的影响

用 75 mg/L ox-LDL 对 RAW264.7 细胞处理不同时间(24 h、48 h 和 72 h)发现, 随着 ox-LDL 作用时间延长, 细胞内总胆固醇含量和游离胆固醇含量不断增加( $P < 0.05$ ); 胆固醇酯/总胆固醇值也不断上升( $P < 0.05$ ), 符合荷脂细胞特征(表 1, Table 1)。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白处理 RAW264.7 细胞不同时间对细胞内总胆固醇、游离胆固醇含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1. The content of cellular total cholesterol and free cholesterol after treated with 75 mg/L ox-LDL for different time

处理时间	总胆固醇 (mg/g)	游离胆固醇 (mg/g)	胆固醇酯/ 总胆固醇
0 h	192 ± 10	138 ± 7	28.3% ± 1.2%
24 h	285 ± 13 <sup>a</sup>	181 ± 10 <sup>a</sup>	36.4% ± 6.6% <sup>a</sup>
48 h	456 ± 14 <sup>a</sup>	263 ± 13 <sup>a</sup>	42.3% ± 5.9% <sup>a</sup>
72 h	654 ± 17 <sup>a</sup>	356 ± 12 <sup>a</sup>	45.5% ± 3.3% <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 0 h 组比较。

## 3 讨论

近年发现有很多蛋白质参与了细胞胆固醇流出<sup>[6-10]</sup>, 包括小凹蛋白(caveolin)家族(如 caveolin 1、2 和 3)、腺苷三磷酸结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)、清道夫受体 BI(SR-BI)、亲脂素家族(如亲环素 A 和亲环素 40)和热休克蛋白(HSP)家族(如 HSP 56 和 HSP 90)等。廖端芳等<sup>[11]</sup>为此总结并提出了“四个体系、一个中心、偶联转运、相互调节”的细胞胆固醇外向转运工作模式。当中的 Caveolin-1 胞内转运体系主要由胆固醇转运复合物 caveolin 1/亲环素 A/亲环素 40/HSP 56 构成。该复合物由 Smart 等<sup>[3, 10]</sup>在研究 caveolin 调节胆固醇代谢时发现, 是 NIH3T3 细胞内胆固醇转运的主要载体。在胆固醇转运旺盛的细胞浆中, 可检测到组成该复合物的 4 种蛋白 caveolin 1、亲环素 A、亲环素 40 和 HSP56, 在胞膜上只有组成该复合物的两种蛋白亲环素 A 和 caveolin 1 存在。可见亲环素 A 和 caveolin 1 在当中均有重要作用。对于 caveolin 1, 本课题组的大量前期工作显示<sup>[12, 13]</sup>: 存在于细胞膜上的特异性内陷结构 caveolae(小凹结构), 在介导细胞内的胆固醇转运, 维持细胞内外胆固醇平衡过程中起着重要作用。Caveolae 的主要组成蛋白 caveolin 1 是介导细胞尤其是细胞膜 caveolae 区域的胆固醇转运的关键蛋白。本研究针对胆固醇转运复合

物的另一个关键蛋白亲环素 A 开展研究。

亲环素 A 具有肽脯氨酸异构酶 (peptidyl prolyl cis-trans isomerase, PPIase) 活性<sup>[14, 15]</sup>, 此酶可使脯氨酸发生顺一反式变化, 参与蛋白折叠, 亲环素 A 可能影响 caveolin 1 疏水区两端的脯氨酸残基空间结构, 从而影响 caveolin 1 与胆固醇结合。此外, 亲环素 A 的中部含一个 caveolin 结合区 (Ligand binding domain) 和一个特异的热休克蛋白结合区 (3-unit tetratricopeptide repeat domain, TRP)<sup>[16, 17]</sup>, caveolin 1 的 C-末端 143 位半胱氨酸残基与亲环素 A 结合有关 (这个位点为胆固醇结合和转运复合物形成所必须)<sup>[18]</sup>, 均提示亲环素 A 和 caveolin 1 分子间的相互作用与胆固醇转运密切相关。实验中 Western blot 与间接免疫荧光定量、定位检测亲环素 A 的蛋白表达, 用 75 mg/L ox-LDL 对 RAW264.7 细胞处理 48 h 后发现, 亲环素 A 的蛋白表达逐渐减弱。与 ox-LDL 抑制细胞内胆固醇流出的结果相联系, 运用高效液相色谱检测细胞内胆固醇含量, 发现随着处理时间的延长, 细胞内胆固醇的含量逐渐增加。提示 ox-LDL 对细胞的氧化损伤, 可能使亲环素 A 的表达下调, 从而部分抑制了亲环素 A 甚至 caveolin 1 的胆固醇转运功能。

综上所述, ox-LDL 诱导的巨噬源性细胞荷脂进程中胆固醇转运复合物亲环素 A 的病理改变及细胞胆固醇流出的影响机制为: ox-LDL 通过下调亲环素 A 的表达, 抑制细胞胆固醇流出, 促进荷脂细胞内的胆固醇蓄积。进一步的研究中, 我们将进行体内实验, 从整体动物实验水平验证亲环素 A 的表达改变对动脉粥样硬化发生发展的影响; 运用现代药理学技术筛选具有干预亲环素 A 表达、促进细胞胆固醇流出的药物应用于动脉粥样硬化防治。

#### [参考文献]

- [1] Harigai M, Hara M, Takahashi N, Kitani A, Hirose T, Suzuki K, et al. Presence of autoantibodies to peptidyl prolyl cis-trans isomerase (cyclosporin A-binding protein) in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, 1992, **63** (1): 58-65
- [2] Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol*, 2005, **174** (10): 6 030-038
- [3] Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 29 427-435
- [4] 艾宝民, 夏敏, 唐志红, 凌文华. 氧化型低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞胆固醇蓄积的影响及可能机制. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 114-117
- [5] 董军, 陈文祥, 李健斋. 高效液相色谱测定微量胆固醇氧化产物. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**: 179-182
- [6] Yu C, Alteman M, Dobrowsky RT. Ceramide displaces cholesterol from lipid raft membranes and decreases the association of the cholesterol binding protein Caveolin 1. *J Lipid Res*, 2005, **46** (8): 1 678-691
- [7] 唐朝克, 杨永宗. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (8): 1 084-088
- [8] 冯翔, 凌文华. 氧化低密度脂蛋白及溶血卵磷脂对巨噬泡沫细胞胆固醇外流的影响. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (9): 1 246-249
- [9] Piotukh K, Gu W, Kofler M, Helms V, Freund C. Cyclophilin A binds to liver ear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins. *J Biol Chem*, 2005, **280** (25): 23 668-674
- [10] Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem*, 1998, **273** (11): 6 525-532
- [11] 廖端芳, 鹿勤慧, 罗迪贤, 严鹏科. 荷脂细胞胆固醇流出的体系构成与偶联关系. *南华大学学报·医学版*, 2004, **32** (3): 347-351
- [12] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383
- [13] 王蓉蓉, 严鹏科, 廖端芳, 万腊香, 严奉祥, 杨永宗. 囊泡-囊泡素 1 在清道夫受体 A Ⅱ转基因小鼠动脉粥样硬化发生中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 461-464
- [14] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A binding protein cyclophilin. *Nature*, 1989, **337** (6206): 473-475
- [15] Maki K, Ikura T, Hayano T, Takahashi N, Kuwajima K. Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 1999, **38** (7): 2 213-123
- [16] Annette Uittenbogaard, Eric J Smart. Palmitoylation of caveolin 1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveole. *J Biol Chem*, 2000, **275** (33): 25 595-599
- [17] Kallen J, Walkinshaw MD. The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human Cyclophilin A. *FEBS Lett*, 1992, **300** (3): 286-290
- [18] Zhao Y, Ke H. Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the trans to cis isomerization. *Biochemistry*, 1996, **35** (23): 7 356-361

(此文编辑 朱雯霞)