

依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂 细胞胆固醇蓄积的影响

高治平, 于伟霞, 袁皓瑜, 朱炳阳, 夏承来, 孙少卫, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 依泽替米贝; 血管平滑肌细胞; 胆固醇蓄积; 动脉粥样硬化; 油红 O 染色法; 高效液相色谱法

[摘要] 目的 观察依泽替米贝对血管平滑肌源性的荷脂细胞胆固醇蓄积的影响。方法 采用 20 mg/L 胆固醇、 β -环糊精混合物处理培养的大鼠主动脉平滑肌细胞建立荷脂细胞模型, 用不同浓度的依泽替米贝(3、10 μ mol/L 和 30 μ mol/L) 处理荷脂细胞 24 h, 随后用 30 μ mol/L 的依泽替米贝处理荷脂细胞不同的时间(0、6、12、24 h 和 48 h)。通过高效液相色谱仪检测细胞内总胆固醇、游离胆固醇的含量; 油红 O 染色观察细胞内胆固醇蓄积的情况。结果 (1) 3、10 μ mol/L 和 30 μ mol/L 依泽替米贝处理荷脂细胞后, 细胞内总胆固醇含量分别为 110.8 ± 3.56 、 90.5 ± 2.30 mg/g 和 60.9 ± 1.86 mg/g, 游离胆固醇含量分别为 85.5 ± 3.12 、 74.6 ± 2.89 mg/g 和 53.8 ± 1.56 mg/g; 与模型组比较, 中、高剂量组总胆固醇、游离胆固醇差异均有显著性($P < 0.05$), 随浓度升高, 两者都有降低趋势(趋势性 χ^2 检验, $P = 0.007$), 且 30 μ mol/L 组作用最佳。(2) 选择 30 μ mol/L 依泽替米贝处理荷脂细胞 0、6、12、24 h 和 48 h, 各时间点细胞内总胆固醇含量分别为 120.1 ± 2.37 、 117.9 ± 3.05 、 80.3 ± 2.81 、 69.2 ± 1.56 mg/g 和 72.1 ± 2.98 mg/g, 随着时间的延长, 总胆固醇浓度逐渐降低, 两者呈负相关($r = -0.776$, $P < 0.05$); 游离胆固醇含量分别为 92.9 ± 2.11 、 90.7 ± 3.76 、 71.4 ± 2.57 、 60.1 ± 1.21 mg/g 和 64.2 ± 2.48 mg/g。随着时间的延长, 游离胆固醇浓度逐渐降低, 两者呈负相关($r = -0.786$, $P < 0.05$); 与 0 h 组比较, 12、24 h 和 48 h 组差异均有显著性($P < 0.01$), 并呈时间依赖性, 24 h 组效果最显著。结论 依泽替米贝能降低血管平滑肌源性荷脂细胞胆固醇蓄积。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of Ezetimibe on Cholesterol Accumulation in Loaded-Lipid Cells Derived From Vascular Smooth Muscle Cells

GAO Zhi-Ping, YU Wei-Xia, YUAN Hao-Yu, ZHU Bing-Yang, XIA Cheng-Lai, SUN Shao-Wei, and LIAO Duang-Fang

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Ezetimibe; Vascular Smooth Muscle Cells; Cholesterol Accumulation; Atherosclerosis; Oil Red O Staining; High Performance Liquid Chromatography

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Ezetimibe on cholesterol accumulation in loaded-lipid cells derived from vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Loaded-lipid cells model were established by 20 mg/L Cholesterol: M β CD treated VSMC. Loaded-lipid cells were respectively treated with different concentration of ezetimibe (0, 3, 10, 30 μ mol/L) for 24 h, and with 30 μ mol/L of ezetimibe for different time (0, 6, 12, 24, 48 h). The concentration of total cholesterol (TG) and free cholesterol (FC) were detected by high performance liquid chromatography (HPLC). Cholesterol accumulation in cells were observed by oil red O staining. **Results** (1) Intracellular TG were 110.8 ± 3.56 , 90.5 ± 2.30 , 60.9 ± 1.86 mg/g and FC were 85.5 ± 3.12 , 74.6 ± 2.89 , 53.8 ± 1.56 mg/g, respectively with loaded-lipid cells treated with different concentration of ezetimibe. Compared with model group, there was significant difference in medium dose and high dose groups ($P < 0.05$), TG and FC had a reducing trend with rising drug concentration (tendency $\chi^2 = 11.56$, $P = 0.007$) and the best drug concentration was 30 μ mol/L. (2) Treated loaded-lipid cells for different time (0, 6, 12, 24, 48 h) with 30 μ mol/L ezetimibe, the content of TG were 120.1 ± 2.37 , 117.9 ± 3.05 , 80.3 ± 2.81 , 69.2 ± 1.56 , 72.1 ± 2.98 mg/g and FC were 92.9 ± 2.11 , 90.7 ± 3.76 , 71.4 ± 2.57 , 60.1 ± 1.21 , 64.2 ± 2.48 mg/g respectively. TG and FC gradually decreased with treated time, and both of them had negative correlations with treated time ($r = -0.776$, $P < 0.05$ and $r = -0.786$, $P < 0.05$ respectively). Compared with 0 h group, there was significant difference for FC in 12 h, 24 h and 48 h groups ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2007-10-17 [修回日期] 2007-12-20

[基金项目] 湖南省教育厅课题(04C539)

[作者简介] 高治平, 学士, 高级实验师, 湖南省科学技术进步奖评审委员会专家库专家(专家号: 140-045), 研究方向为心血管药理, 联系电话为 13187168168 或 0734-8281019, E-mail 为 gaopz58@yahoo.com.cn。于伟霞, 硕士, 助教, 研究方向为心血管药理, 联系电话为 13791132317, E-mail 为 yuweixiaor2004@yahoo.com.cn。袁皓瑜, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, 联系电话为 13407341069, E-mail 为 yuanhaoyu@hotmail.com。

There was time depended tendency for ezetimibe and it was best for 24 hours. accumulation in vascular smooth muscle cells.

Conclusion Ezetimibe decrease cholesterol

单核-巨噬细胞和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 大量吞噬脂质泡沫化的过程是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生发展的重要环节。VSMC 源性荷脂细胞是 As 泡沫细胞的主要来源, 在 As 形成的中后期对斑块的稳定起重要作用^[1]。因此减少 VSMC 源性荷脂细胞内胆固醇蓄积或促进其外向转运, 对于抑制或逆转 As 的发生、发展有特定的意义。

依泽替米贝 (ezetimibe) 是 Schering-Plough 公司与 Merck 公司合作研制开发的一种新型降脂药, 2002 年美国 FDA 批准其上市, 商品名为艾泽庭 (Zetia)^[2], 化学名称为 (1-(4-氟苯基)-(3R)-[3-(4-氟苯基)-(3S)-羟丙基]-(4S-(羟苯基)-2-氮杂环丁酮), 分子式为 $C_{24}H_{21}F_2NO_3$, 相对分子质量为 409.42, 结构式如下 (图 1)^[3]:

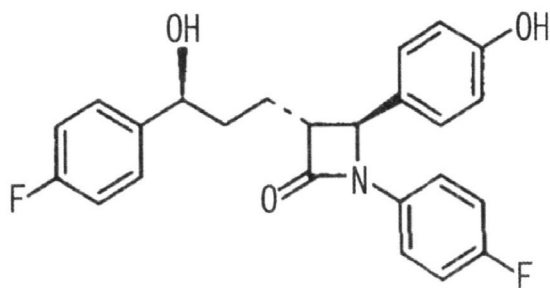


图 1. 依泽替米贝的分子结构式图

有研究显示依泽替米贝作用于小肠刷状缘的 NPC1L1 (Niemann-Pick type C1 Like1) 蛋白、膜联蛋白-2-小凹蛋白-1 (annexin-2-caveolin-1) 复合物、氨基肽酶 N (aminopeptidase N, APN, CD13) 等蛋白质抑制胆固醇的吸收, 目前的研究主要集中在其对肠道胆固醇吸收的抑制作用上, 而针对肠外组织细胞展开的研究极少。载脂蛋白 E (apolipoprotein E) 在外周细胞中能够介导胆固醇的流出, 防止胆固醇蓄积, 载脂蛋白 E 缺陷会导致胆固醇流出的障碍^[4,5]。Harry RD 等用 ApoE^{-/-} (ApoE 基因敲除) 小鼠研究发现, 依泽替米贝不仅能抑制胆固醇吸收、降低血浆胆固醇、升高 HDL 水平, 也能明显减少 As 斑块面积^[6,7]。可以推测依泽替米贝除抑制肠道胆固醇的吸收, 起降脂作用外, 还可能与其他机制影响 As 形成与发展, 该机制可能不依赖载脂蛋白 E 的存在, 并与促进细胞内胆固醇流出或抑制胆固醇蓄积有关联。本研究试图从时效与量效两方面, 观察依泽替米贝对 VSMC 源性荷脂细胞胆固醇蓄积与转运的影响, 为寻找新的

药物防治动脉粥样硬化提供研究依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

依泽替米贝 (Schering-plough 公司), 胆固醇、 β -环糊精混合物 (Cholesterol and β -Cyclodextrin, Sigma 公司), 洛伐他汀 (Lovastatin, 浙江海正药业), DMEM-F12 培养基 (GIBCO 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce 公司), 乙腈、异丙醇、甲醇、色谱纯 (Tedia 公司), 其他试剂均为进口或国产分析纯。Elx-800 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tek 公司), 紫外分光光度计 (美国 Perkin Elme), 高效液相色谱仪 (high performance liquid chromatography, HPLC; 日本三洋公司)。

1.2 细胞培养

贴块法培养 SD 大鼠胸主动脉 VSMC 原代细胞, 倒镜观察, 细胞呈典型的峰谷状生长。待细胞长满后用 0.125% 的胰蛋白酶传代, 取 3~8 代细胞进行实验。实验前先用无血清 DMEM-F12 同步化培养细胞 24 h 后, 用 20 mg/L β -环糊精混合物处理大部分细胞 48 h, 诱导细胞荷脂模型组。

1.3 实验分组

量效关系研究分为 7 组: 正常细胞组, 荷脂细胞模型组, 溶媒对照组, 低浓度依泽替米贝组 (ezetimibe 3 μ mol/L), 中浓度依泽替米贝组 (ezetimibe 10 μ mol/L), 高依泽替米贝组 (ezetimibe 30 μ mol/L), 阳性药物对照组 (洛伐他汀 lovastatin 10 μ mol/L)。正常组细胞不加任何处理因素, 模型组细胞加入 20 mg/L β -环糊精混合物处理 48 h, 溶媒对照组用 1 μ L/L 乙醇处理模型组细胞 24 h, 不同浓度的依泽替米贝组和阳性药物对照组, 分别加相应浓度的依泽替米贝、洛伐他汀处理模型组细胞 24 h。时效关系分组为 5 组, 分别为 0、6、12、24 h 和 48 h 组。5 组细胞待长到 80% 满的时候, 先用无血清 DMEM-F12 同步培养 24 h, 加入 20 mg/L β -环糊精混合物处理 48 h, 然后取最佳作用浓度 30 μ mol/L 依泽替米贝分别作用 0、6、12、24 h 和 48 h。

1.4 高效液相色谱检测细胞内总胆固醇与游离胆固醇

参照文献[8]裂解细胞, BCA 试剂定量蛋白, 三氯乙酸沉淀去蛋白, 离心后取上清制备总胆固醇、游离胆固醇样本。以豆甾醇为内标并作标准曲线, 各样本与内标液 (豆甾醇) 混匀, 用正己烷和无水乙醇

抽提后, 1.5 mol/L 的三氧化铬进行氧化衍生并真空干燥, 200 μ 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 $^{\circ}$ C, 以异丙醇: 正庚烷: 乙腈为流动相, 流速 1 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。细胞内胆固醇酯含量为总胆固醇与游离胆固醇的差值。

1.5 油红 O 染色

参照文献[9]的方法, 用内置无菌盖玻片的 6 孔培养板培养备用细胞(24 h), PBS 冲洗盖玻片 3 次/5 min, 50% 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次/1 min, 苏木素染色 5 min, 1% HCl 分色和返蓝后, 水性封片剂封片, 显微镜下观察, 细胞内脂质呈红色, 细胞核呈蓝色, HPIAS-1000 图像分析系统收集图像并镜下摄像。

1.6 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 11.0 进行统计处理, 统计方法采用方差分析、相关性分析和趋势性 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量依泽替米贝对血管平滑肌源性的荷脂细胞内胆固醇含量的影响

高效液相色谱检测结果显示, 模型组细胞总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离胆固醇(free cholesterol, FC)与胆固醇酯(cholesterol esters, CE)明显高于正常细胞组, CE/TC 从 12.74% 增加到 25.76% (低于 60%, 表明本研究建立的细胞模型确属泡沫化前的荷脂细胞模型); 溶媒对照组细胞内 TC、FC、CE 的含量与 CE/TC 均接近于模型组, 差异无显著性, 表明溶媒对药物的作用无影响; 各浓度药物治疗与阳性药物均能降低 VSMC 源性的荷脂细胞内 FC、TC、CE 的含量, 以及 CE/TC 比值; 与模型组比较, 低剂量依泽替米贝作用差异无显著性, 而中、高剂量组总胆固醇、游离胆固醇差异均有显著性($P < 0.05$), 随着用药浓度增加, 两者都有降低趋势(趋势性 χ^2 , $\chi^2 = 11.56$, $P = 0.01$), 其中 30 μ mol/L 依泽替米贝作用最显著, 比阳性药物对照组作用更强。

表 1. 依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂细胞内总胆固醇、游离胆固醇含量的影响(量效关系, $\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TC(mg/g)	FC(mg/g)	CE(mg/g)	CE/TC
正常组	6	41.6 \pm 1.56	36.3 \pm 1.32	5.3 \pm 0.74	12.74% \pm 1.31%
模型组	6	123.8 \pm 1.46 ^b	91.9 \pm 3.54 ^b	31.9 \pm 1.13 ^b	25.76% \pm 2.03% ^b
溶媒组	6	121.6 \pm 4.32 ^b	90.3 \pm 4.02 ^b	31.3 \pm 1.24 ^b	25.74% \pm 1.98% ^b
依泽替米贝(低)组	6	110.8 \pm 3.56	85.5 \pm 3.12	25.3 \pm 0.99	22.83% \pm 2.74%
依泽替米贝(中)组	6	90.5 \pm 2.30 ^a	74.6 \pm 2.89 ^a	15.9 \pm 0.94 ^a	17.55% \pm 0.74% ^a
依泽替米贝(高)组	6	60.9 \pm 1.86 ^a	53.8 \pm 1.56 ^a	7.1 \pm 0.81 ^a	11.66% \pm 0.96% ^a
洛伐他汀组	6	88.2 \pm 3.52 ^a	74.9 \pm 2.52 ^a	13.3 \pm 1.01 ^a	15.08% \pm 1.55% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; b 为 $P < 0.01$, 与正常组比较。

2.2 依泽替米贝作用不同时间对血管平滑肌源性荷脂细胞内胆固醇含量的影响

30 μ mol/L 依泽替米贝处理荷脂的 VSMC 不同时间后, 与 0 h 比较, 随着药物处理时间的延长, 荷脂细胞内 TC、FC 含量均呈负相关逐渐降低, 相关系数分别为 $r = -0.776$ ($P < 0.05$) 和 $r = -0.786$, ($P < 0.05$) 降低; 其中 24 h 组细胞内 TC、FC 含量最低, 24~48 h 后细胞内 TC、FC 量有回升趋势(图 2)。

2.3 依泽替米贝对血管平滑肌源性的荷脂细胞内脂质的聚积的影响

经油红 O 染色, 显微镜下观察发现, 与正常组比较, 荷脂模型组、溶媒组细胞浆内有大量的脂滴存在, 符合泡沫细胞形态特点。用高、中、低三种浓度的依泽替米贝处理荷脂细胞后, 与荷脂模型组、溶媒

组比较, 其胞浆内脂滴均明显减少, 且呈剂量依赖性降低趋势(图 3)。

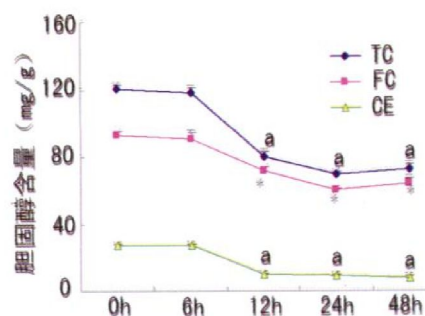


图 2. 依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂细胞内胆固醇蓄积的影响(时效关系) a 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

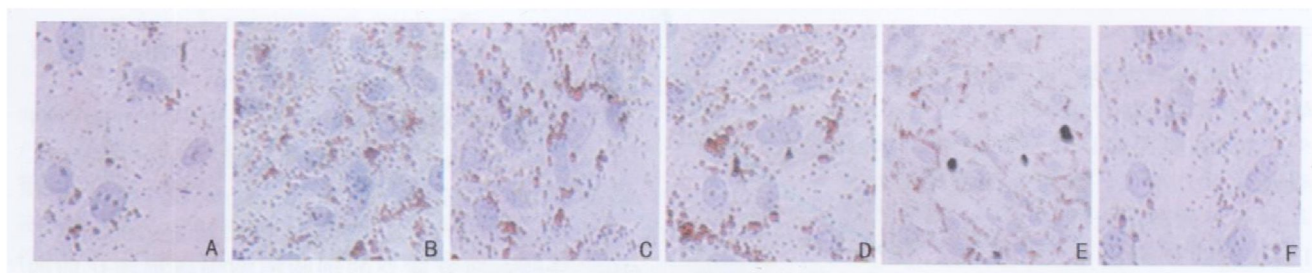


图3. 油红O染色×20 A为正常组, B为模型组, C为溶媒组, D~F分别为高、中、低浓度依泽替米贝处理组, E为洛伐他汀组。

3 讨论

在As的形成与发展中,单核巨噬细胞和VSMC从吞噬脂质到泡沫细胞形成,需要一个相对较长的时期,此时期的巨噬细胞和VSMC,其细胞内胆固醇是在不断增加并逐步酯化的,同时泡沫化细胞胆固醇外向转运的能力已经很低或接近丧失,而荷脂细胞尚有较强的(早期)或一定的(中后期)外向转运胆固醇的能力,所以单核细胞和VSMC从迁移至内膜下开始吞噬脂质到演变成泡沫细胞的荷脂过程是决定动脉粥样硬化进程与转归的关键时期。故寻找或发现促进荷脂细胞内胆固醇流出、抑制泡沫细胞的形成或促使泡沫细胞转归的药物,是防治动脉粥样硬化的有效途径。

依泽替米贝是一类新型的选择性胆固醇吸收抑制剂,通过与小肠刷状缘膜小囊泡上膜蛋白结合,抑制小肠对饮食中和经胆汁输送到肠道中的胆固醇的吸收,降低血清和肝脏中的胆固醇含量^[10,11]。实验研究已证实,依泽替米贝可以抑制植物固醇的吸收,成为首个治疗罕见的遗传性植物固醇血症的治疗药物^[12]。有研究表明依泽替米贝对大鼠小肠和肝脏胆固醇的合成没有直接影响,主要作用是阻止肠壁囊泡中的外源性胆固醇转运至胞内胆固醇池,不影响新合成的内源性胆固醇并入小肠脂蛋白中^[13],也不影响胆固醇酯、三酰甘油和脂溶性维生素的吸收。表明依泽替米贝有肠道外的机制影响肠外组织细胞胆固醇的蓄积与外向转运。本研究结果显示,依泽替米贝能降低VSMC源性荷脂细胞内的总胆固醇与游离胆固醇含量,并在一定药物浓度与作用时间范围内,呈现剂量与时间依赖性,与油红O染色结果相符(也表明依泽替米贝能降低细胞内荷脂情况)。

提示依泽替米贝可促进荷脂细胞内胆固醇外流、降低细胞内胆固醇含量,减轻细胞泡沫化程度或速度,逆转荷脂过程。进一步证明了依泽替米贝有降脂作用外的机制来抑制As的形成与发展,其作用机理有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 廖端芳, 杨永宗. 荷脂细胞胆固醇外向转运的工作模式[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 621-626.
- [2] Rudel LL. Precilical and clinical pharmacology of a new class of lipid management agents [J]. *Am J Manag Care*, 2002, 8(2): S33-35.
- [3] 刘治军, 胡欣, 傅得兴. 新型胆固醇吸收抑制剂依泽替米贝[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(10): 945-947.
- [4] 王亚楠, 洗勋德, 张晓红, 等. 遗传性混合型高脂血症小鼠的自发性动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(9): 775-777.
- [5] Hara M, Matsushima T, Satoh H, et al. Isoform-Dependent Cholesterol Efflux From Macrophages by Apolipoprotein E Is Modulated by Cell Surface Proteoglycans [J]. *Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 269-274.
- [6] Davis HR Jr, Compton DS, Hoos L, et al. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): 2032-2038.
- [7] Gazi IF, Mikhailidis DP. Non-low-density lipoprotein cholesterol-associated actions of ezetimibe: an overview [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, 10(6): 851-866.
- [8] 覃丽, 秦旭平, 王佐, 等. 普伐他汀对泡沫化细胞内胆固醇酯的影响及与小凹蛋白的关系[J]. 生理学报, 2006, 58(1): 47-52.
- [9] 涂光辉, 王北冰, 严鹏科, 等. 亲环素A在巨噬细胞荷脂过程中的表达及普罗布考干预的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(4): 293-296.
- [10] Staprans I, Pan XM, Rapp JH, et al. Ezetimibe inhibits the incorporation of dietary oxidized cholesterol into lipoproteins [J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(11): 2575-2580.
- [11] Brown WV. Cholesterol absorption inhibitors: defining new options in lipid management [J]. *Clin Cardiol*, 2003, 26(6): 259-264.
- [12] G Salen, K von Bergmann, D Lottjohn, et al. Ezetimibe Effectively Reduces Plasma Plant Sterols in Patients With Sitosterolemia [J]. *Circulation*, 2004, 109(8): 966-971.
- [13] M van Heek, C Farley, DS Compton, et al. Ezetimibe potently inhibits cholesterol absorption but does not affect hepatic or intestinal cholesterol synthesis in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 138(8): 1459-464.

(此文编辑 李玲玲)