

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0865-04

• 实验研究 •

氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的 平滑肌细胞亲环素 A 表达的影响

周志刚^{1,2}, 涂 剑³, 王北冰⁴, 尹 凯^{2,4}, 孟 军², 涂玉林²

(南华大学 1 附属第一医院; 2 心血管病研究所; 3 药理学教研室; 4 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; 氧化型低密度脂蛋白; 平滑肌细胞; 氨氯地平

[摘要] 目的 观察氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞亲环素 A 表达的影响, 以进一步探讨氨氯地平对动脉粥样硬化的作用机制。方法 用不同浓度氨氯地平 (0.0, 1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育平滑肌细胞 1 h 后, 与氧化型低密度脂蛋白共同孵育, 逆转录聚合酶链反应和 Western blotting 法检测细胞亲环素 A mRNA 及蛋白的表达。结果 氧化型低密度脂蛋白抑制平滑肌细胞亲环素 A mRNA 及蛋白的表达, 而氨氯地平预处理可上调亲环素 A 的表达。结论 氨氯地平可逆转氧化型低密度脂蛋白抑制平滑肌细胞亲环素 A 表达的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Amlodipine on Cyclophilin A Expression in Smooth Muscle Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

ZHOU Zhigang^{1,2}, TU Jian³, WANG Beibing⁴, YIN Kai^{2,4}, MENG Jun², and TU Yulin²

(1 the First Affiliated Hospital; 2 Institute of Cardiovascular Disease; 3 Department of Pharmacology; 4 Department of Diagnosis, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Cyclophilin A; Oxidized Low Density Lipoprotein; Smooth Muscle Cells; Amlodipine

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of amlodipine on the expression of Cyclophilin A in smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), so as to approach the mechanism of amlodipine in atherosclerosis. **Methods** Smooth muscle cells were treated with ox-LDL in different concentration or different time. Based on that the cells were pretreated with amlodipine at different concentrations (0.0, 1.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$) and then incubated with ox-LDL, RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of Cyclophilin A in the cells.

Results The expression of Cyclophilin A in smooth muscle cells induced by ox-LDL was obviously up-regulated by amlodipine in a dose-dependent manner. **Conclusion** Amlodipine may reverse the role of ox-LDL on the Cyclophilin A expression in smooth muscle cells.

1994年本课题组就开始研究钙通道阻滞剂 (calcium channel blocker, CCB) 中尼群地平等的抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作用^[1]。国内外研究者也相继报道过硝苯地平、氨氯地平 and 拉西地平 L 型 CCB 均具有抗 As 作用^[2,3], 但对其抗 As 作用的具体机制尚未阐明。

亲环素 A (cyclophilin A, CypA) 是亲免疫素家族成员之一, 广泛存在于细胞胞质。有研究发现, 亲环素 A 是一种能激活内皮细胞的前炎症因子, 还可作为一种氧化应激诱导分泌的生长因子, 并且参与了细胞内胆固醇转运复合物的形成^[4-6], 表明亲环素

A 与 As 的发生发展密切相关。本研究在体外观察氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的平滑肌细胞亲环素 A 的影响, 以探讨氨氯地平通过亲环素 A 发挥抗动脉粥样硬化机制。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

大鼠血管平滑肌细胞培养采用本室建立的酶消化法^[7]。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 无支原体新生牛血清为杭州四季青生物工程公司产品; 原料药氨氯地平粉剂为扬子江药业惠赠, PBS 溶解后抽滤除菌, 4℃ 保存备用; First-Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI 公司, 2×Taq PCR Master Mix 购自北京天为时代科技有限公司, 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 亲环素 A 一抗购自 UP State

[收稿日期] 2008-09-01 [修回日期] 2008-10-01

[基金项目] 湖南省医药卫生基金 (B2007101); 湖南省教育厅基金 (07C635)

[作者简介] 周志刚, 硕士研究生, 主治医师, E-mail 为 zhouzhigang0734@sina.com.cn; 涂剑, 博士研究生, 讲师。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治及机制研究, E-mail 为 tuyulin0734@yahoo.com.cn

公司。

1.2 细胞培养及分组

平滑肌细胞用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 实验分组: 不同浓度 ox-LDL (0, 20, 40, 80 和 160 mg/L) 与平滑肌细胞共同孵育 72 h; 80 mg/L ox-LDL 孵育平滑细胞 0, 24, 48, 72 和 96 h; 不同浓度氨氯地平 (0, 0.1, 1.0 和 10.0 μmol/L) 与平滑肌细胞共同孵育 1 h 后, 与 80 mg/L ox-LDL 孵育 72 h。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测亲环素 A mRNA 的表达

用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 按 First-Strand cDNA Synthesis Kit 方法合成 cDNA 第一链, 再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环。亲环素 A 的引物序列: 上游 5'-TCT TCT TGC TGG TCT TGC C-3', 下游 5'-TCT CCT TTG AGC TGT TTG C-3', 反应条件为 95℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min。扩增产物长度为 408 bp, 内参 GAPDH 产物长度为 697 bp。

1.4 Western blotting 检测亲环素 A 蛋白的表达

收集各组血管平滑肌细胞, 裂解液裂解细胞, 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 120 mV 电泳后转移至 PVDF 膜, 预染蛋白 Marker 确定蛋白分子量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封闭, 1: 500 加入亲环素 A 或 β-actin 一抗, 37℃ 孵育 2 h, TBST 液洗 3 次, 1: 1000 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗, 37℃ 孵育 30 min, TBST 液洗后用 Western blotting 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。

1.5 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达的影响

随着 ox-LDL 浓度的增加亲环素 A mRNA 的表达逐渐减弱 (图 1), 结合文献选择浓度为 80 mg/L。随着 ox-LDL 作用时间的延长亲环素 A mRNA 的表达也逐渐减弱 (图 2), 结合文献选择时间为 72 h。由此, 80 mg/L ox-LDL 处理平滑肌细胞 72 h 为明显下调亲环素 A mRNA 表达的浓度和时间。

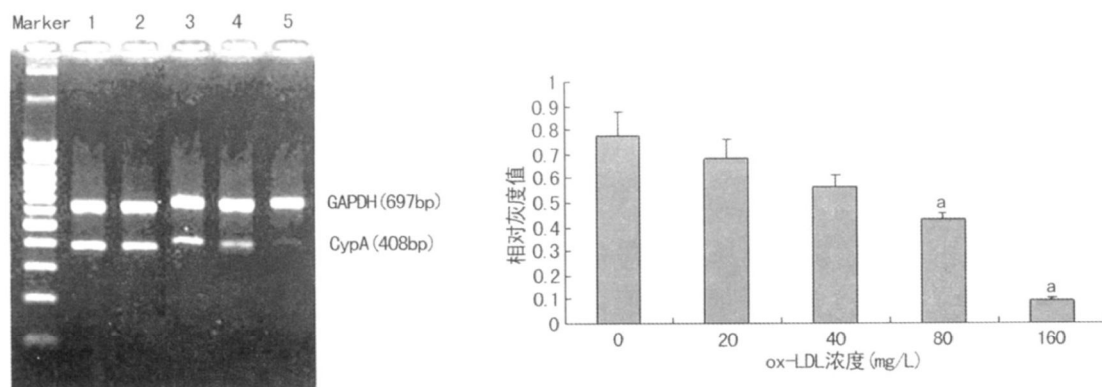


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达的影响 ($n=3$) 左图中 1~5 分别为 0、20、40、80 及 160 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L ox-LDL 组比较。

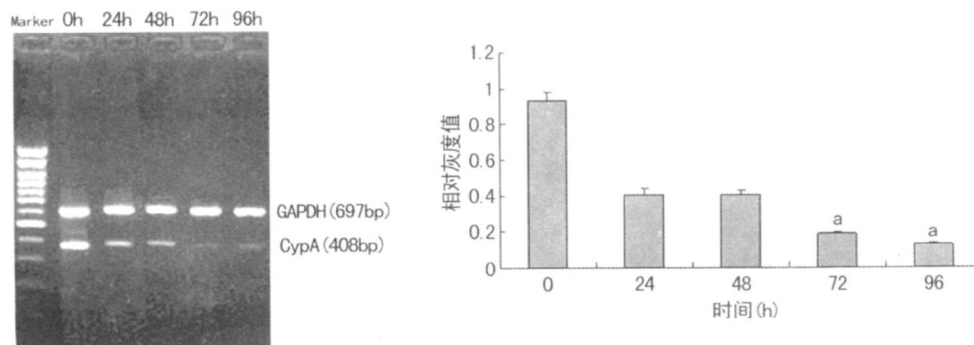


图 2. 氧化型低密度脂蛋白作用不同时间对平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达的影响 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较。

2.2 氨氯地平逆转氧化型低密度脂蛋白抑制平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达

随着氨氯地平浓度的增加,平滑肌细胞亲环素

A mRNA 的表达逐渐增强,当浓度为 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 时作用最明显(图 3)。

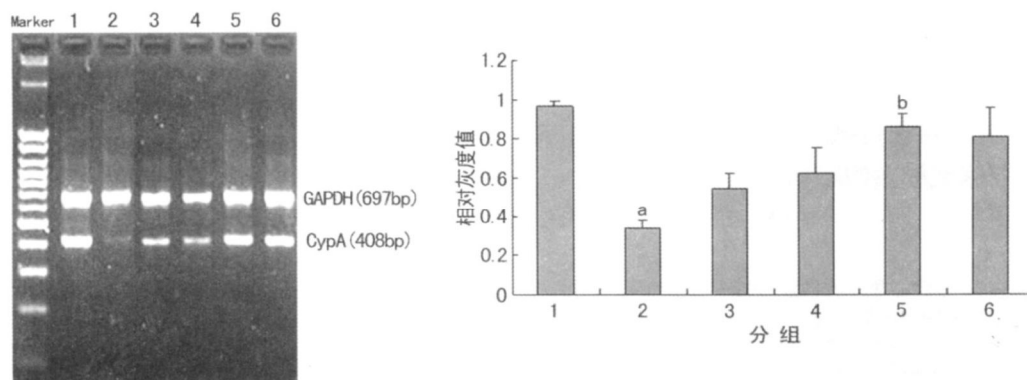


图 3 不同浓度氨氯地平对平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达的影响 ($n=3$) 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + $0.1 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 4 为 ox-LDL + $1.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 5 为 ox-LDL + $10.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 6 为 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组。a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较。

2.3 氨氯地平逆转氧化型低密度脂蛋白抑制平滑肌细胞亲环素 A 蛋白表达

随着氨氯地平浓度的增加,平滑肌细胞亲环素 A 蛋白的表达也逐渐增强,当浓度为 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 时作用最明显(图 4)。

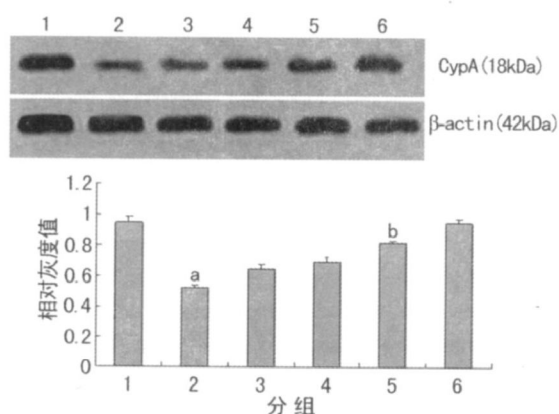


图 4 不同浓度氨氯地平对平滑肌细胞亲环素 A 蛋白表达的影响 ($n=3$) 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL + $0.1 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 4 为 ox-LDL + $1.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 5 为 ox-LDL + $10.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组, 6 为 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组。a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较。

3 讨论

ox-LDL 是启动 As 发生的重要环节,通过多种途径在 As 的起始和进展中起重要作用。研究发现,在 ox-LDL 诱导巨噬细胞、血管平滑肌细胞泡沫化过程中,存在着动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞(和/或平滑肌细胞)通过其表面的清道夫受体不断摄取

修饰的脂蛋白,且不受细胞内游离胆固醇浓度的反馈调节,致使胆固醇及胆固醇酯在细胞内聚集及细胞内胆固醇流出受阻,二者相互联系,共同促进泡沫细胞的形成^[8-9]。

亲环素 A 具有肽脯氨酸异构酶 (peptidyl prolyl cis-trans isomerase, PPIase) 活性^[10-11],此酶可使脯氨酸发生顺-反式变化,参与蛋白折叠,影响 Caveolin-1 疏水区两端的脯氨酸残基空间结构,影响 Caveolin-1 与胆固醇结合。此外,亲环素 A 的中部含一个 Caveolin 结合区和一个特异的热休克蛋白结合区 (3-unit tetratricopeptide repeat domain, TRP)^[12-13],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)^[14]。Caveolin-1 具有结合、运载胆固醇的功能并促进细胞内游离胆固醇的流出,对维持正常细胞胆固醇的稳态起着重要调节作用^[12]。本课题组前期研究中已经发现,经 ox-LDL 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞泡沫化过程中亲环素 A 的表达下调,细胞胆固醇蓄积,胆固醇酯/总胆固醇值不断上升^[15]。提示亲环素 A 与胆固醇转运密切相关。本研究中,随着 ox-LDL 浓度的增加亲环素 A mRNA 的表达逐渐减弱,随着 ox-LDL 处理时间的延长亲环素 A mRNA 的表达也逐渐减弱。

氨氯地平属第三代 1,4-二氢吡啶类 CCB,是目前广泛应用于临床的降血压药。近年来,其降压以外的多效作用备受关注,其中抗 As 作用尤为受到重视。其抗 As 作用可能与改善内皮功能、抗氧化应激、抗炎、抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移及表型改

变等有关^[16-19]。但是对CCB抗As作用的许多具体机制尚未阐明。本研究中,随着氨氯地平浓度的增加细胞亲环素A mRNA和蛋白的表达均逐渐增强,当浓度为100 μmol/L时作用明显。

综上所述,氨氯地平可逆氧化型低密度脂蛋白抑制平滑肌细胞中亲环素A表达的作用。进一步的研究中,我们将探讨氨氯地平影响亲环素A表达的同时对细胞泡沫化的影响。

[参考文献]

- [1] 涂玉林, 杨小毅, 黄红林, 等. 尼群地平对食饵性家兔动脉粥样硬化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(4): 153-155
- [2] García-Pérez B, Ayala I, Castells MT, et al. Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem [J]. *Histol Histopathol* 2003; 18(4): 1 027-033
- [3] 刘海宁, 张兴华, 耿庆信. 拉西地平、氨氯地平对人脐静脉内皮细胞间粘附分子-1表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(5): 575-578
- [4] Jing ZG, Melaragno MC, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress [J]. *Circ Res* 2000; 87(9): 789-796
- [5] Jin ZG, Lungu AO, Xie L, et al. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(7): 1 186-191
- [6] Piotukh K, Gu W, Kofler M, et al. Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins [J]. *J Biol Chem*, 2005; 280(25): 23 668-674
- [7] 涂永生, 黄红林, 朱炳阳, 等. C型胶原酶/胰性蛋白酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(5): 438-440
- [8] Yancey PG, Jerome WG. Lysosomal cholesterol derived from mildly oxidized low density lipoprotein is resistant to efflux [J]. *J Lipid Res* 2001; 42(3): 317-327
- [9] Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Cholesterol delivered to macrophages by oxidized low density lipoprotein is sequestered in lysosomes and fails to efflux normally [J]. *J Lipid Res* 2000; 41(10): 1 658-665
- [10] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidylprolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A binding protein cyclophilin [J]. *Nature* 1989; 337(6206): 473-475
- [11] Maki K, Ikura T, Hayano T, et al. Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease [J]. *Biochemistry*, 1999; 38(7): 2 213-223
- [12] Annette Uittenbogaard, Eric J Smart. Palmitoylation of Caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae [J]. *J Biol Chem*, 2000; 275(33): 25 595-599
- [13] Kallen J, Walkinshaw MD. The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human Cyclophilin A [J]. *FEBS Lett* 1992; 300(3): 286-290
- [14] Zhao Y, Ke H. Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the trans to cis isomerization [J]. *Biochemistry*, 1996; 35(23): 7 356-361
- [15] 涂剑, 严鹏科, 王北冰, 等. 亲环素A在巨噬细胞荷脂过程中的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(5): 541-544
- [16] Yoshii T, Iwai M, Li Z, et al. Regression of atherosclerosis by amiloripine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions [J]. *Hypertens Res* 2006; 29(6): 457-466
- [17] Batova S, DeWeyer J, Godfraind T, et al. The calcium channel blocker amiloripine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res* 2006; 71(3): 478-485
- [18] Toba H, Shimizu T, Miki S, et al. Calcium channel blockers reduce angiotensin II-induced superoxide generation and inhibit lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells [J]. *Hypertens Res* 2006; 29(2): 105-116
- [19] Ziesche R, Petkov V, Lambers G, et al. The calcium channel blocker amiloripine exerts its antiproliferative action via p21(Waf1/Cip1) gene activation [J]. *FASEB J*, 2004; 18(13): 1 516-523

(此文编辑 文玉珊)