

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0097-04

• 实验研究 •

依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂细胞 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1和肝 X受体 α 表达的影响

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] 依泽替米贝; 血管平滑肌细胞; 胆固醇蓄积; 荷脂细胞; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 肝 X受体 α

[摘要] 目的 观察依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1和肝 X受体 α 表达的影响, 探讨依泽替米贝促进血管平滑肌源性荷脂细胞胆固醇流出的作用机制。方法 采用 20 mg/L 胆固醇、 β 环糊精混合物处理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 选择 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)。通过逆转录聚合酶链反应检测三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 mRNA 变化和免疫印迹法检测肝 X受体 α 蛋白的表达。结果 (1) 三种浓度的依泽替米贝处理荷脂细胞后, 逆转录聚合酶链反应显示随着依泽替米贝浓度增加, 血管平滑肌源性荷脂细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的 mRNA 表达明显上调, 30 μ mol/L 依泽替米贝处理 24 h 组相比模型组上调 3.4 倍左右; 当选用 30 μ mol/L 依泽替米贝处理荷脂细胞不同的时间 (0、6、12、24 h 和 48 h) 后, 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的 mRNA 水平在 0~24 h 之间随时间增加而增加并于 24 h 达到峰值。(2) 三种浓度的依泽替米贝处理荷脂细胞后, 免疫印迹结果显示随着浓度增加血管平滑肌源性荷脂细胞肝 X受体 α 蛋白的表达逐步增加, 其中 30 μ mol/L 依泽替米贝组作用最强, 较模型组增加 2 倍多。30 μ mol/L 依泽替米贝分别处理荷脂细胞不同时间 (0、6、12、24 h 和 48 h) 后, 肝 X受体 α 蛋白表达随时间增加而增加, 24 h 组作用最佳。结论 依泽替米贝能明显上调平滑肌源性荷脂细胞 ATP 结合盒转运体 A1 和肝 X受体 α 表达。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Effect of Ezetimibe on the Expressions of ABCA1 and LXR α in Loaded-Lipid Cells Derived From Vascular Smooth Muscle Cell

GAO Zhi-Ping, YU Wei-Xia, YUAN Hao-Yu, ZHU Bing-Yang, XIA Cheng-Lai, SUN Shao-Wei and LIAO Duan-Fang
(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Ezetimibe; Vascular Smooth Muscle Cells; Cholesterol Accumulation; Lipid-Loaded Cells; ATP Binding Cassette Transporter A1; Liver X Receptor α

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of ezetimibe-induced cholesterol efflux by observing the effect of ezetimibe on ATP binding cassette transporter A1 and Liver X Receptor α in lipid-loaded cells derived from vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Lipid-loaded cell model was established with the mix of 20 mg/L Cholesterol and β -CD treating VSMC. Lipid-loaded cells were treated with different concentration of ezetimibe (3, 10, 30 μ mol/L) for 24 hours respectively, and 30 μ mol/L ezetimibe was selected for lipid-loaded cell treatment of different time respectively (0, 6, 12, 24, 48 h). ATP binding cassette transporter-A1 mRNA was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and the protein expression of Liver X Receptor α was examined by Western-blotting. **Results** (1) With different concentration of ezetimibe treated lipid-loaded cells, the mRNA expression of ATP binding cassette transporter-A1 increased with concentration. Compared with the model group, the 30 μ mol/L ezetimibe-treated group (24 h) had a 3.4 folds rising. Treated with 30 μ mol/L ezetimibe for different time (0, 6, 12, 24, 48 h), the mRNA expression of ATP binding cassette transporter-A1 had a time dependant trend reaching plateau at 24 h and the best concentration was 30 μ mol/L. (2) With different concentration of ezetimibe treated lipid-loaded cells, the protein expression of Liver X Receptor α increased with rising concentration. Compared with the model group, the 30 μ mol/L ezetimibe-treated group (24 h) had an increase of more than 2 folds. Treated with 30 μ mol/L ezetimibe for different time (0, 6, 12, 24, 48 h), the

[收稿日期] 2008-06-03 [修回日期] 2008-12-15

[基金项目] 湖南省教育厅基金项目 (04C539)。

[作者简介] 高治平, 学士, 研究员, 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 0734-8281587, 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 0734-8281587, E-mail 为 yuweixiao_2004@yahoo.com.cn。袁皓瑜, 硕士, 研究方向为心血管药理, 联系电话为 0734-8281587, E-mail 为 yuanhaoyu@hotmail.com。通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及急性冠状动脉综合症的发病机制, 药物防治和药物开发, E-mail 为 Dfliao66@yahoo.com.cn。

protein expression of Liver X Receptor α had a time dependant trend with 24 h reaching plateau and the best time was 24h

Conclusion Ezetimibe promotes cellular cholesterol efflux in lipid-loaded cells derived from VSMC by up-regulating Liver X Receptor α and ATP binding cassette transporter A1 expression

胆固醇逆向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生与发展密切相关^[1]。三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP binding cassette transporter A1, ABCA1) 是细胞内游离胆固醇转运至载脂蛋白 AI 途径中的关键调节子。在脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 合成和 RCT 过程中起重要作用^[2]。增加 ABCA1 能促进 RCT, 减少细胞内胆固醇积聚并抑制细胞泡沫化的形成, 最终阻断或逆转 As 的发生与发展。肝 X 受体 α (liver X receptors, LXR α) 是核受体超家族的成员, 作为维持细胞内胆固醇相对稳定的关键感受器, 它通过调节靶基因的表达进而影响胆固醇代谢与转运的多个环节^[3]。有研究报道 LXR α 激动剂可以上调细胞内 ABCA1 表达, 增加细胞内胆固醇流出^[4-5]。依泽替米贝是新近开发的一种新型降脂药^[6]。目前的研究主要集中于对肠道胆固醇吸收的影响, 对肠道外细胞胆固醇代谢与转运的研究极少。作者的前期研究已表明, 依泽替米贝能够呈时间依赖性降低大鼠血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 源性荷脂细胞内脂质含量^[7]。本研究试图推测依泽替米贝是否通过影响 ABCA1 和 LXR α 等与细胞胆固醇流出密切相关的蛋白表达, 进而实现其降低荷脂细胞内脂质含量的作用, 故本研究观察依泽替米贝对 ABCA1 和 LXR α 表达的影响, 探究依泽替米贝促进血管平滑肌源性荷脂细胞胆固醇流出作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备

依泽替米贝 (ezetimibe, Shering-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), LXR α 一抗、 β -actin 一抗 (Santa Cruz 公司), RT 试剂盒 (Invitrogen 公司), PCR 试剂盒、ABCA1 和 GAPDH 引物 (上海生工), 其他试剂均为进口或国产分析纯。垂直电泳仪及转膜系统 (美国 Bio-Rad), PCR 仪 (美国伯乐) 等。

1.2 荷脂细胞模型的建立与实验分组

参照文献 [7] 的方法培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞、建立其荷脂细胞模型。

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 (3 μ mol/L), 中浓度依泽替米贝组 (10 μ mol/L), 高浓度依泽替米贝组 (30 μ mol/L), 阳性药物对照组 (洛伐他汀 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 胆固醇、 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。

时效关系研究分组为 0、6、12、24 h 和 48 h 组。参照文献 [7] 的方法取最佳作用浓度 30 μ mol/L 依泽替米贝分别处理平滑肌荷脂细胞 0、6、12、24 h 和 48 h。

1.3 低渗法提取细胞核蛋白

用裂解液处理荷脂模型细胞, 1 kr/min 离心 (4 $^{\circ}$ C) 10 min 弃上清, 5 倍体积低渗缓冲液重悬沉淀物, 再次离心弃上清; 3 倍体积低渗缓冲液重悬沉淀物, 冰育 10 min 重悬液转入匀浆器, 上下匀浆 25 次, 1.8 kr/min 离心 (4 $^{\circ}$ C) 15 min 弃上清; 0.5 倍体积低盐缓冲液重悬沉淀物, 逐滴加入一定量的氯化钾 (2.5 mol/L) 致其终浓度为 0.4 μ mol/L, 冰育 30 min, 14 kr/min 离心 (4 $^{\circ}$ C) 30 min 收集上清即为细胞核蛋白。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测细胞内三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 mRNA 变化

细胞总 RNA 的提取按 Trizol 抽提试剂说明书进行。分别提取总 RNA, 用紫外分光光度计定量后, 调整 RNA 的浓度为 0.2 g/L。RNA 逆转录按试剂盒进行, 生成的 cDNA 按以下反应体系进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系组成: 双蒸水 8.5 μ L, 2 \times PCR master 12.5 μ L, cDNA 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L (1 μ mol/L), 混匀后, 短速离心, 按以下条件进行反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 进行 30~32 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。结束后, 各取产物 5 μ L, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳 (60~80 v, 60~90 min), 用全自动凝胶分析系统灰度扫描分析, 结果用 3 个样本的平均相对单位 ABCA1/GAPDH 表示。ABCA1 引物: 正义引物: 5'-TCT CTG CTA TCT CCA ACC TCA TC-3', 反义引物: 5'-ACG TCT TCA CCA GGT AAT CTG AA-3' (973 bp); GAPDH 引物: 正义引物: 5'-CAGTC-CATGCCATCACTGCCA-3', 反义引物: 5'-AGG TGG

AGG AGT GGG TGT CGC-3' (302 bp)。

1.5 免疫印迹法检测细胞内肝 X 受体 α 蛋白的表达变化

100 μ g 蛋白上样于 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, PDVF 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 按 1: 1000 加入一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 加入 1: 1000 辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1h, TBST 洗 3 次, 显影, 结果扫描。以正常组的面积灰度值为 100%, 比较分析各组实验结果。

1.6 统计学处理

实验数据均用均数 \pm 标准差表示。用 SPSS 11.0 进行统计处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 依泽替米贝对血管平滑肌源性荷脂细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1mRNA 表达的影响

不同浓度 (3、10 和 30 μ mol/L) 依泽替米贝处理 VSMC 源性荷脂细胞 24 h, RT-PCR 检测 ABCA1mRNA 的表达, 发现 ABCA1mRNA 表达水平逐渐上调, 30 μ mol/L 组的表达量较模型组上调了 3.4 倍 (图 1 表 1)。30 μ mol/L 依泽替米贝处理 VSMC 源性荷脂细胞不同时间 (0、6、12、24 h 和 48 h) 后, 结果显示 ABCA1 的 mRNA 水平在 0~24 h 之间随时间增加而增加并于 24 h 达到峰值, 但 48 h 组有所减少 (图 1 表 2)。

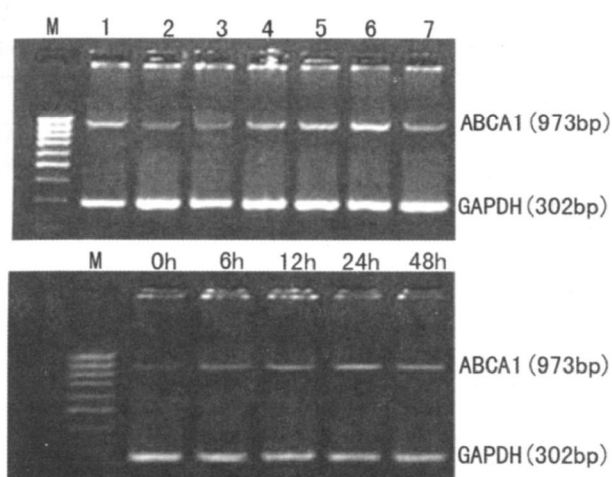


图 1 不同浓度依泽替米贝 (上图) 和 30 μ mol/L 依泽替米贝处理不同时间 (下图) 对血管平滑肌源性荷脂细胞中三磷酸腺苷结合盒转运体 A1mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
M 为 Mark, 1 为对照组, 2 为模型组, 3 为溶媒对照组, 4~6 为 3、10 和 30 μ mol/L 依泽替米贝组, 7 为 30 μ mol/L 洛伐他汀组。

2.3 依泽替米贝对血管平滑肌源性的荷脂细胞肝 X 受体 α 蛋白表达的影响

3、10 和 30 μ mol/L 依泽替米贝处理 VSMC 源性荷脂细胞 24 h, Western 印迹法检测 LXR α 蛋白的表达结果显示依泽替米贝逐渐增加 LXR α 蛋白的表达, 其中 30 μ mol/L 依泽替米贝组作用最强, 较模型组增加 2 倍多 (图 2 表 1)。30 μ mol/L 依泽替米贝分别处理 VSMC 源性的荷脂细胞 0、6、12、24 h 和 48 h 后, 结果显示 LXR α 蛋白表达随时间延长而增加 (图 2 表 2)。

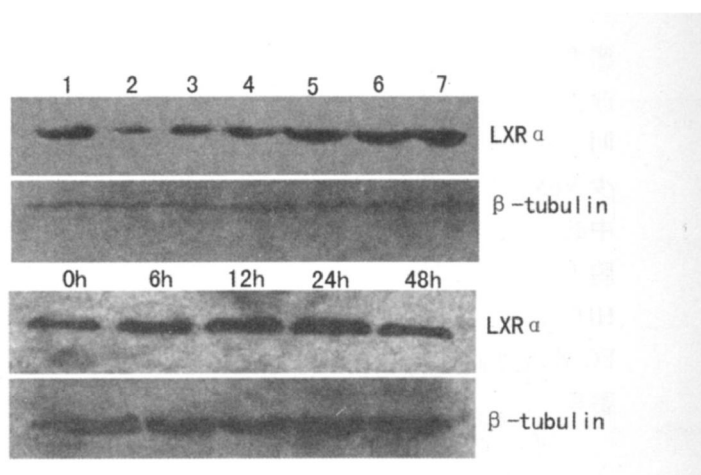


图 2 不同浓度依泽替米贝 (上图) 和 30 μ mol/L 依泽替米贝处理不同时间 (下图) 对血管平滑肌源性荷脂细胞肝 X 受体 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) 1 为对照组, 2 为模型组, 3 为溶媒对照组, 4~6 为 3、10 和 30 μ mol/L 依泽替米贝组, 7 为 30 μ mol/L 洛伐他汀组。

表 1 不同浓度依泽替米贝处理荷脂细胞对三磷酸腺苷结合盒转运体 A1mRNA 和肝 X 受体 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	ABCA1 (灰度值)	LXR α (灰度值)
正常组	1.231 \pm 0.015	1.834 \pm 0.020
模型组	0.204 \pm 0.021	0.869 \pm 0.016
溶媒组	0.395 \pm 0.012	1.031 \pm 0.030
依泽替米贝 (3 μ mol/L) 组	0.682 \pm 0.011 ^a	1.543 \pm 0.014 ^a
依泽替米贝 (10 μ mol/L) 组	0.893 \pm 0.010 ^a	1.608 \pm 0.021 ^a
依泽替米贝 (30 μ mol/L) 组	0.900 \pm 0.012 ^a	1.753 \pm 0.061 ^a
洛伐他汀 (30 μ mol/L) 组	0.733 \pm 0.008 ^a	1.585 \pm 0.041 ^a

a 为 $P < 0.01$ 与模型组比较。

3 讨论

依泽替米贝通过与小肠刷状缘膜小囊泡上膜蛋白结合, 抑制胆固醇的吸收^[8]。研究发现依泽替米贝不仅 ApoE^{-/-} 小鼠的胆固醇吸收, 而且升高血浆中高

表 2 30 $\mu\text{mol/L}$ 依泽替米贝处理荷脂细胞不同时间对三磷酸腺苷结合盒转运体 ABCA1 mRNA 和肝 X 受体 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

时间 (h)	ABCA1 (灰度值)	LXR α (灰度值)
0	0.137 \pm 0.005	0.848 \pm 0.020
6	0.370 \pm 0.010 ^a	0.905 \pm 0.028 ^b
12	0.640 \pm 0.015 ^b	0.998 \pm 0.027 ^b
24	2.080 \pm 0.020 ^b	1.010 \pm 0.033 ^b
48	1.530 \pm 0.008 ^a	0.790 \pm 0.030

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 h 组比较。

密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的水平, 改善主动脉的动脉粥样斑块病变, 但具体机制未明^[9]。作者的前期研究也表明依泽替米贝能够减少 VSMC 源性荷脂细胞内脂质蓄积^[7]。已知血浆中载脂蛋白 A I 能够结合细胞膜上 ABCA1 并接受细胞内游离胆固醇 (free cholesterol, FC) 进而形成 HDL, 因此, 依泽替米贝有可能是通过促进细胞内 FC 外流进而升高血浆 HDL 水平来减少细胞内脂质蓄积。

研究证实^[10, 11] 细胞膜上 ABCA1 在促进细胞内 FC 转运出细胞、增加血浆 HDL 表达水平、减少细胞荷脂的过程中发挥关键作用。那么依泽替米贝是否可能通过影响 ABCA1 和 LXR α 等与细胞胆固醇流出密切相关的蛋白表达, 进而实现其降低荷脂细胞内脂质含量的作用呢? 实验首先观察依泽替米贝对细胞中 ABCA1 表达的影响。结果显示, 随着药物处理的浓度和时间增加, ABCA1 的表达逐渐增加, 证明依泽替米贝的确能够通过上调 ABCA1 表达, 进而促进细胞内脂质外流、减少脂质蓄积程度。已知细胞内 ABCA1 的基因表达受核转录因子 LXR α 的正性调节, LXR α 能够通过作用 ABCA1 启动子中的 DR-4 元件增加 ABCA1 的转录^[12], 因此对不同药物处理组中的 LXR α 进行了进一步的检测。结果表

明, VSMC 源性荷脂细胞内的 LXR α 表达随着药物作用浓度和时间的增加而增加, 与 ABCA1 的变化趋势一致。至此本研究结果显示依泽替米贝在一定浓度与时间内, 随浓度增加和时间延长, 能增加 ABCA1 和 LXR α 的表达, 进一步证明依泽替米贝减少细胞脂质蓄积的作用是通过增加核转录因子 LXR α 表达从而进一步增加促进胆固醇外流的关键蛋白 ABCA1 的表达来实现的。

[参考文献]

- [1] Ryan EM, Mohamad N, John SM, et al. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-1 attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation [J]. *Circ Res* 2005; **97** (8): 763-771.
- [2] Wade DP, Owen JS. Regulation of the cholesterol efflux gene ABCA1 [J]. *Lancet* 2001; **357** (9251): 161-163.
- [3] 唐朝克, 杨永宗. LXR 和 ABCA1 对体内胆固醇代谢的调节作用 [J]. *生命的化学*, 2003; **23** (5): 381-384.
- [4] 钱宗杰, 曾秋棠, 吴旭斌. 冠心病患者巨噬细胞肝 X 受体对其目的基因的表达及胆固醇外流的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (2): 149-152.
- [5] 颜伟, 胡厚源, 周林, 等. 肝 X 受体激动剂对人 THP-1 细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 和肝 X 受体 α 、 β 亚型表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; **13** (2): 158-162.
- [6] 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.
- [7] 高治平, 于伟霞, 袁皓瑜, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (1): 25-28.
- [8] 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): 2575-580.
- [9] 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): 2032-038.
- [10] Alberti S, Schuster G, Parini P, et al. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR α -deficient mice [J]. *Clin Invest* 2001; **107** (5): 565-573.
- [11] Nan Wang, David LS, Christoph T, et al. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein [J]. *J Biol Chem*, 2001; **276** (26): 23742-747.
- [12] K Schwartz, RM Lawn, DP Wade. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **274** (3): 794-802.

(此文编辑 李玲玲)