

氨氯地平对平滑肌细胞泡沫化过程中亲环素 A 表达和胆固醇蓄积的影响

涂剑¹, 周志刚^{2,3}, 王北冰⁴, 尹凯^{2,4}, 孟军², 何瑾^{2,3}, 涂玉林²

(南华大学 1. 药理学教研室; 2. 心血管病研究所; 3. 附属第一医院;

4. 诊断学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 氨氯地平; 泡沫细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 亲环素 A; 胆固醇蓄积

[摘要] **目的** 观察氨氯地平预处理对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞泡沫化过程中亲环素 A 表达的影响及其对胆固醇蓄积的作用, 从新的角度探讨氨氯地平的抗动脉粥样硬化作用。**方法** 实验分为 6 组: 对照组、氧化型低密度脂蛋白组、氨氯地平 (0.1, 1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 1 h 后加入 80 mg/L 氧化型低密度脂蛋白共同孵育 72 h 组及 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平单独处理组, Western-blot 和 RT-PCR 分别检测亲环素 A mRNA 和蛋白质的表达改变; 油红 O 染色观察细胞内脂滴的形成情况, 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量变化。**结果** 氧化型低密度脂蛋白处理组的细胞内亲环素 A 的表达明显减少; 经氨氯地平处理后, 随着氨氯地平浓度的增加, 细胞内亲环素 A 的表达逐渐增加, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平预处理细胞组效果最明显, 较氧化型低密度脂蛋白组差异有显著性 ($P < 0.05$)。油红 O 染色显示, 氧化型低密度脂蛋白组细胞内大量脂滴形成, 细胞内胆固醇酯/总胆固醇的比值为 57.9%, 符合泡沫细胞特征; 预先予氨氯地平处理后, 随着药物浓度的增加, 细胞内脂滴逐渐减少, 细胞内胆固醇酯/总胆固醇的比值逐渐降低, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平预处理细胞组效果最明显, 为 37.8%; **结论** 氨氯地平预处理, 可上调氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞泡沫化过程中亲环素 A 的表达, 减轻细胞内的胆固醇蓄积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Amlodipine on Cyclophilin A Expression and Cellular Cholesterol Accumulation in Foam Cells Derived from Smooth Muscle Cell

TU Jian¹, ZHOU ZhiGang^{2,3}, WANG BeiBing⁴, YIN Kai^{2,4}, MENG Jun², HE Jin^{2,3}, and TU YuLin²

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

[KEY WORDS] Amlodipine; Foam Cells; Oxidized Low Density Lipoprotein; Cyclophilin A; Cholesterol Accumulation

[ABSTRACT] **Aim** To study the function of amlodipine on cellular cholesterol accumulation and cyclophilin A expression in foam cells derived from smooth muscle cell induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to explore the new antiatherosclerotic role of Amlodipine. **Methods** The experiment groups included 6 groups: control group, ox-LDL group, different concentration (0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) of amlodipine pretreated for 1 h and treated with 80 mg/L ox-LDL for 72 h group and amlodipine treated alone without ox-LDL group. RT-PCR and Western-blot analysis were used to detect the mRNA and protein expression of cyclophilin A. Oil red O dye experiment showed the lipid droplets in the cells of each group. High Performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to measure the content of cellular total cholesterol and cholesterol ester. **Results** RT-PCR and Western-blot analysis showed that with ox-LDL and amlodipine treatment, cyclophilin A expression were greatly increased in a concentration-dependent manner. Oil Red O dye showed that with the treatment of amlodipine, the lipid droplets were greatly decreased in a concentration-dependent manner vs ox-LDL group. The content of cellular total cholesterol and cholesterol ester were both significantly increased with ox-LDL treatment but decreased after amlodipine treatment. **Conclusion** Amlodipine can up-regulate the expression of cyclophilin A and relieve the cellular cholesterol accumulation in foam cells derived from smooth muscle cells induced by ox-LDL.

氨氯地平 (amlodipine) 属第三代钙通道阻滞

剂, 近年来, 其降压以外的多效作用备受关注, 其中抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 作用尤为受到重视。研究资料显示, 其抗 As 作用可能与改善内皮功能^[1,2]、抗氧化应激^[3]、抗炎^[3,4]和抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移^[5]等有关。但对其抗 As 作用的具体机制尚未阐明。

[收稿日期] 2008-11-04 [修回日期] 2009-02-03

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

[作者简介] 涂剑, 博士研究生, 讲师, 主要从事心血管药物的研究, Email 为 tujian0734@yahoo.com.cn。周志刚, 硕士, 主治医师。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的机制研究, Email 为 tuyulin0734@yahoo.com.cn。

近年的研究发现, 亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 与 As 的发生发展密切相关: CyPA 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^[6-8]。本实验旨在体外研究氨氯地平对平滑肌细胞泡沫化过程中 CyPA 的表达及胆固醇蓄积的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

采用本室建立的酶消化法分离大鼠主动脉血管平滑肌细胞^[9]。原料药氨氯地平粉剂由扬子江药业惠赠, First-Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI 公司, 引物由上海生工有限公司合成, CyPA 一抗为 UP State 公司产品, 油红 O 染料为美国 Sigma 公司产品, 乙腈、异丙醇等高效液相色谱试剂为美国 Tedia 公司产品。

1.2 细胞分组

实验分为 6 组: 对照组、氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 组、氨氯地平 (0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 预处理细胞 1 h 后加入 80 mg/L ox-LDL 共同孵育 72 h 组及 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平单独处理组。

1.3 RT-PCR 检测 CyPA mRNA 的表达

CyPA 的引物序列: 上游 5'-TCTTCTTGC TG-GTCTTGCC-3', 下游 5'-TCTCCTTTGAGCTGTTTGC-3'; 提取细胞总 RNA, 按 First-Strand cDNA Synthesis Kit 方法合成 cDNA 第一链, 逆转录产物进行 PCR 循环: 95℃变性 30 s \rightarrow 53℃退火 30 s \rightarrow 72℃延伸 30 s 30 个循环, 72℃终延伸 7 min, 扩增产物长度为 408 bp。内参 GAPDH 产物长度为 697 bp。

1.4 Western-blot 检测亲环素 A 蛋白的表达

收集各组细胞, 裂解液裂解, 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。封闭后加入 1:500 CyPA 或 β -actin 一抗, 4℃过夜, TBST 液洗 3 次, 加入 1:1000 二抗, 37℃孵育 0.5 h, TBST 液洗后压片、显影、定影, 结果扫描后用图像分析仪分析。

1.5 油红 O 染色

参照文献 [10], 将细胞接种于预先放有盖玻片的 6 孔培养板中, 培养细胞至 60% 融合, 加不同的处理因素。处理结束后, 用 PBS 冲洗 3 次, 50% 异丙醇固定 1 min, 油红 O 染色液染色, 去离子水冲洗

3 次, 苏木素染色。分色和返蓝后, 显微镜下观察, HPIAS-1000 型图像分析系统收集图像。

1.6 细胞内胆固醇的检测

参照文献 [11], 各组裂解细胞, BCA 试剂定量蛋白, 以豆甾醇为内标作标准曲线, 离心后取上清液, 加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液为细胞内总胆固醇样品, 加入 1 mol/L 氢氧化钾为游离胆固醇样品。各样品分别与内标液混匀, 用正己烷和无水乙醇抽提后, 氧化衍生并真空干燥, 100 μL 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℃, 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。

1.7 统计学处理

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

2 结果

2.1 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 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示^[12] CyPA mRNA 的表达随着氨氯地平浓度增加, 细胞 CyPA mRNA 的表达逐渐增强, 当浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时作用明显 (表 1)。

表 1 不同浓度氨氯地平对平滑肌细胞亲环素 A mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 相对灰度值 |
|---------------------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 0.97 \pm 0.03 |
| ox-LDL 组 | 0.33 \pm 0.05 ^a |
| ox-LDL + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组 | 0.55 \pm 0.08 |
| ox-LDL + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组 | 0.63 \pm 0.10 |
| ox-LDL + 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组 | 0.87 \pm 0.06 ^b |
| 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氨氯地平组 | 0.85 \pm 0.10 |

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL 组比较。

2.2 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 蛋白质表达的影响

不同浓度氨氯地平 (0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育平滑肌细胞 1 h 后, 与 80 mg/L ox-LDL 共同孵育 72 h, Western-blot 检测显示^[12] CyPA 蛋白的表达结果与 RT-PCR 一致, 随着氨氯地平浓度增加, 细胞 CyPA 蛋白的表达也逐渐增强, 当浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 时作用明显 (表 2)。

2.3 氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞中脂滴形成的影响

80 mg/L ox-LDL 孵育平滑肌细胞 72 h 细胞内

脂滴明显增多,随着氨氯地平处理浓度增加,细胞胞浆内脂滴较 ox-LDL处理组明显减少,当浓度为 10 0 μmol/L时作用明显(图 1)。

2 4 氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞中胆固醇含量的影响

80 mg/L ox-LDL孵育平滑肌细胞 72 h,细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量均明显增加,胆固醇酯/总胆固醇比值增至 57. 9%,符合泡沫细胞水平。随着氨氯地平处理浓度增加,细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量及胆固醇酯/总胆固醇比值较 ox-LDL处理组均明显降低,当浓度为 10 0 μmol/L时胆固醇

酯/总胆固醇比值降至 37. 8%(表 3)。

表 2 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 ($\bar{x} \pm s$)

| 分 组 | 相对灰度值 |
|----------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 0.95 ± 0.04 |
| ox-LDL 组 | 0.52 ± 0.02 ^a |
| ox-LDL + 0.1 μmol/L 氨氯地平组 | 0.65 ± 0.03 |
| ox-LDL + 1.0 μmol/L 氨氯地平组 | 0.69 ± 0.03 |
| ox-LDL + 10.0 μmol/L 氨氯地平组 | 0.82 ± 0.02 ^b |
| 10.0 μmol/L 氨氯地平组 | 0.95 ± 0.03 |

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与 ox-LDL组比较。

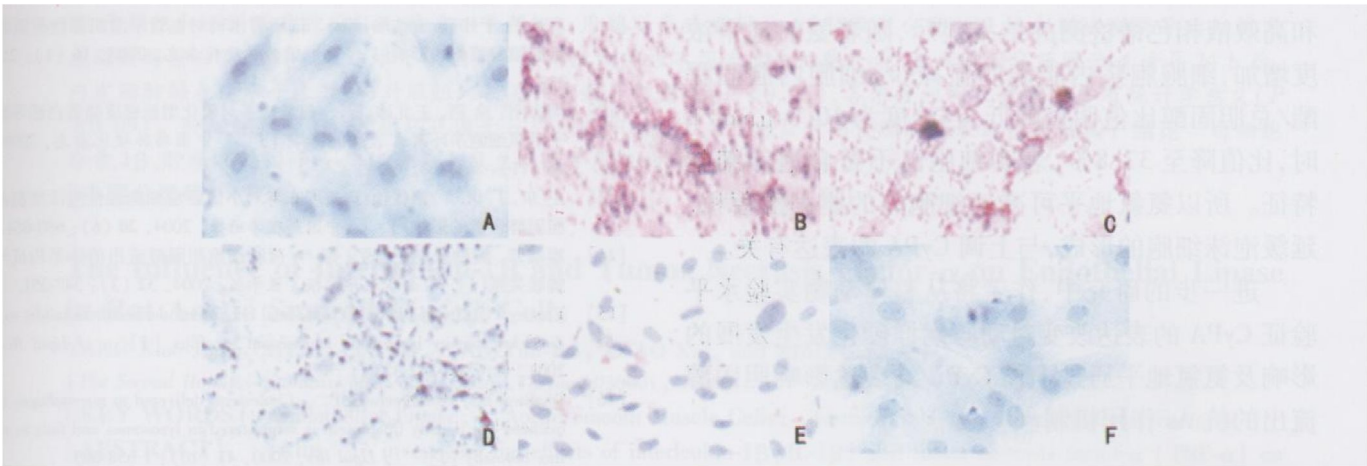


图 1 不同处理细胞组对血管平滑肌细胞内脂滴形成的影响(油红 O 染色 × 200) A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为 ox-LDL + 0.1 μmol/L 氨氯地平组, D 为 ox-LDL + 1.0 μmol/L 氨氯地平组, E 为 ox-LDL + 10.0 μmol/L 氨氯地平组, F 为 100.0 μmol/L 氨氯地平组。

表 3 各平滑肌细胞组中细胞内胆固醇酯/总胆固醇的比值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

| 分 组 | 总胆固醇 (mg/g) | 游离胆固醇 (mg/g) | 胆固醇酯/总胆固醇 |
|----------------------------|--------------|--------------|---------------------------|
| 对照组 | 50.2 ± 4.1 | 35.7 ± 3.7 | 28.9% ± 1.7% |
| ox-LDL 组 | 202.4 ± 10.2 | 85.3 ± 5.6 | 57.9% ± 0.6% ^a |
| ox-LDL + 0.1 μmol/L 氨氯地平组 | 188.5 ± 9.8 | 82.6 ± 4.3 | 56.2% ± 0.0% |
| ox-LDL + 1.0 μmol/L 氨氯地平组 | 125.7 ± 7.2 | 58.3 ± 4.5 | 53.6% ± 1.0% |
| ox-LDL + 10.0 μmol/L 氨氯地平组 | 65.3 ± 5.5 | 40.6 ± 3.5 | 37.8% ± 0.2% ^b |
| 100.0 μmol/L 氨氯地平组 | 50.8 ± 4.3 | 35.8 ± 3.1 | 29.5% ± 0.2% |

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

泡沫细胞的形成是 AS 发生、发展的核心环节和主要的细胞学改变。当细胞内胆固醇的含量大幅度增高,细胞内胆固醇酯占总胆固醇的比例超过 50% 时,大多认为这种细胞即已转变为光镜下的泡沫细胞^[13-14]。单核细胞和血管平滑肌细胞从迁移至内膜下开始吞噬脂质到演变成泡沫细胞的过程是决定动脉粥样硬化进程与转归的关键时期^[14]。在 ox-LDL 诱导巨噬细胞、血管平滑肌细胞形成泡沫细胞

的过程中,存在着细胞胆固醇流出障碍^[15-17]。但 ox-LDL 损伤细胞胆固醇流出的分子机制一直未能完全阐明。

CyPA 具有肽脯氨酸异构酶活性^[18],此酶可使脯氨酸发生顺-反式变化,参与蛋白折叠,影响小凹蛋白 1 疏水区两端的脯氨酸残基空间结构,影响小凹蛋白 1 与胆固醇结合。此外, CyPA 的中部含一个小凹蛋白结合区和一个特异的热休克蛋白结合区^[19],小凹蛋白 1 的 C 末端 143 位半胱氨酸残基与

CyPA 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)^[20]。小凹蛋白 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^[21]。

本实验用氨氯地平预先处理细胞 1 h 后再加入 80 mg/L ox-LDL 共同孵育 72 h RT-PCR 和 Western blot 检测均观察到,随着氨氯地平浓度增加,细胞 CyPA mRNA 和蛋白的表达均逐渐增强,当浓度为 10 0 μ mol/L 时作用明显;而氨氯地平单独处理组 CyPA mRNA 的表达较对照组略有减弱,但蛋白表达差异无显著性,故氨氯地平的作用为通过预先处理增强被 ox-LDL 抑制的 CyPA 的表达。采用油红 O 和高效液相色谱检测的结果显示,随着氨氯地平浓度增加,细胞胞浆内脂滴明显减少,细胞内胆固醇酯/总胆固醇比值明显降低,当浓度为 10 0 μ mol/L 时,比值降至 37.8%,表明细胞已不符合泡沫细胞特征。所以氨氯地平可减轻细胞内的胆固醇蓄积,延缓泡沫细胞的形成,与上调 CyPA 的表达有关。

进一步的研究中,作者将从整体动物实验水平验证 CyPA 的表达改变对动脉粥样硬化发生发展的影响及氨氯地平通过干预 CyPA 的表达影响胆固醇流出的抗 As 作用机制。

[参考文献]

- [1] Toba H, Nakagawa Y, Maki S, et al. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the n(g)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine [J]. *Hypertens Res* 2005; **28** (8): 689-700
- [2] Yoshit T, Iwai M, Li Z, et al. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and antioxidative stress actions [J]. *Hypertens Res* 2006; **29** (6): 457-466
- [3] Batova S, Dawver J, Godfrind T, et al. The calcium channel blocker amlodipine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res* 2006; **71** (3): 478-485
- [4] Toba H, Shimizu T, Maki 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
- [5] Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, et al. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **286** (2): 768-774
- [6] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Circulation* 2008; **117** (24): 3 088-098
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 朱莹, 张文高, 郑广娟, 等. 脂欣康胶囊对血管平滑肌细胞源性泡沫细胞 CD 36 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (7): 481-483
- [10] 王飞, 戴亚蕾. 白细胞介素 10 对巨噬细胞源性泡沫细胞趋化因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (1): 19-22
- [11] 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
- [12] 周志刚, 涂剑, 王北冰, 等. 氨氯地平对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞环素 A 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (11): 865-868
- [13] 王东, 丁华. 洛伐他汀、普罗布考对小鼠巨噬细胞源性泡沫细胞内胆固醇含量的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2004; **20** (6): 680-684
- [14] 廖端芳, 庾勤慧, 罗迪贤, 等. 荷脂细胞胆固醇流出的体系构成与偶联关系 [J]. *南华大学学报·医学版*, 2004; **32** (3): 347-351
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Gelissen IC, Brown AJ, Mander EL, et al. Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol [J]. *J Biol Chem* 1996; **271** (30): 17 852-860
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Zhao Y, Ke H. Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the trans to cis isomerization [J]. *Biochemistry* 1996; **35** (23): 7 356-361
- [21] Jansen M, Pietiäinen VM, Peltanen H, et al. Cholesterol substitution increases the structural heterogeneity of caveolae [J]. *J Biol Chem* 2008; **283** (21): 14 610-618

(此文编辑 李小玲)