

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0293-04

•实验研究•

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

涂光辉¹, 王北冰², 严鹏科³, 廖端芳³, 尹凯², 涂玉林⁴

(1. 南县人民医院病理科, 湖南省南县 413200; 南华大学 2. 诊断学教研室;

3. 药物药理研究所; 4. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 油红 O 染色; 亲环素 A; 巨噬细胞, 荷脂化; 胆固醇蓄积; 普罗布考

[摘要] 目的 观察亲环素 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, 进而探讨亲环素 A 在动脉粥样硬化形成中的作用机制。方法 采用 75 mg/L 氧化型低密度脂蛋白与 RAW264.7 巨噬细胞共同孵育, 建立巨噬细胞荷脂化模型, 油红 O 染色观察细胞内脂滴的形成, 高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量, Western blot 检测亲环素 A 的蛋白表达; 用 75 mg/L 普罗布考干预对上述检测的影响。结果 氧化型低密度脂蛋白与 RAW264.7 细胞共同孵育 48 h 后, 油红 O 染色显示细胞内有大量脂滴形成, 细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量均明显增加, 胆固醇酯/总胆固醇的比值为 $42.3\% \pm 5.9\%$, 符合荷脂细胞特征; 亲环素 A 的蛋白表达明显减弱。予普罗布考处理, 细胞内脂滴明显减少, 胆固醇酯/总胆固醇的比值降至 $32.9\% \pm 2.5\%$, 亲环素 A 的蛋白表达增加 $81.3\% \pm 3.6\%$, 较对照组差异有显著性 (P 均 < 0.05)。结论 氧化型低密度脂蛋白诱导的 RAW264.7 巨噬细胞荷脂过程中, 亲环素 A 表达下调, 促进细胞胆固醇蓄积; 普罗布考干预可上调亲环素 A 蛋白表达, 减轻细胞内的胆固醇蓄积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Cyclophilin A in Lipid-Loaded Macrophages Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein and the Effect of Probucol on Cellular Cholesterol Accumulation

TU Guang-Hui¹, WANG Bei-Bing², YAN Peng-Ke³, LIAO Duang-Fang³, YIN Kai², and TU Yu-Lin⁴

(1. Department of Pathology, People's Hospital of County Nanxian, County Nanxian 413200; 2. Department of Diagnosis; 3. Institute of Pharmacy and Pharmacology; 4. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

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

[ABSTRACT] **Aim** To observe the protein expression of cyclophilin A in lipid-loaded macrophages induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and its effect on cellular cholesterol accumulation. **Methods** RAW264.7 mouse macrophages were treated with 75 mg/L ox-LDL for 0, 24, 48 and 72 hours. Oil red O dye experiment was used to show the lipid droplets in lipid-loaded macrophages. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed to determine the content of cellular total cholesterol (TC) and cholesterol ester (CE). Western blot analysis was used to detect the protein expression of cyclophilin A. Then, 75 mg/L Probucol was added in the cells treated with ox-LDL for 48 hours. **Results** With ox-LDL treatment after 48 hours, Oil red O dye showed a lot of lipid droplets accumulated in RAW264.7 macrophages, HPLC analysis showed the content of cellular TC and CE were increased greatly and Western blot analysis showed the expression of cyclophilin A was significantly decreased. However, with Probucol treatment, cyclophilin A was greatly increased, the lipid droplets significantly decreased, and the content of TC and CE also decreased. **Conclusion** The protein expression of cyclophilin A was down-regulated in lipid-loaded macrophages while the content of cellular TC and CE were increased greatly. However, Probucol could up-regulate the cyclophilin A expression and decrease the cellular cholesterol accumulation.

当细胞内胆固醇的含量大幅度增高, 胆固醇酯 (cholesterol ester, CE) 占总胆固醇 (total cholesterol,

TC) 的比例超过 50% 时, 大多认为这种细胞为泡沫细胞^[1], 在此之前, 通常称为荷脂细胞 (lipid-loaded cells)。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荷脂过程是决定动脉粥样硬化进程与转归的关键时期^[2]。Yancey 等^[3]研究发现, 在氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导巨噬细胞形成泡沫细

[收稿日期] 2006-01-21 [修回日期] 2006-03-20

[基金项目] 湖南省医药卫生基金 (B2004-086 和 C2005094) 资助。

[作者简介] 涂光辉, 主治医师。严鹏科, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事脂蛋白代谢与动脉粥样硬化的研究。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脂蛋白代谢与动脉粥样硬化的研究, 联系电话为 0734-8281345, E-mail 为 tuyulin0734@yahoo.com.cn。

胞的过程中,存在胆固醇流出障碍,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^[4]。亲环素 A(cyclophilin A, CypA)是免疫抑制剂环孢霉素 A 在细胞内的作用靶点^[5],近年研究发现,亲环素 A 参与了细胞内胆固醇流出的调控,对动脉粥样硬化的发生可能有一定的作用^[6]。因此,通过对 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和氧化损伤等情况,我们拟采用 ox-LDL 与 RAW264.7 巨噬细胞共同孵育,观察亲环素 A 在巨噬细胞荷脂过程中的作用,进而探讨亲环素 A 在动脉粥样硬化形成中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

亲环素 A 购自 UP State, β -actin 购自 Santa Cruz Biotechnology, Western blot 荧光检测试剂盒为 Santa Cruz Biotechnology 产品;乙腈和异丙醇等高效液相色谱试剂为美国 Tedia 公司产品;油红 O 染料和普罗布考购自 Sigma 公司;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 1×10^8 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[7],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°C 5 000 r/min 离心 30 min,获血清后加入 NaN_3 、10% EDTA 防腐、防氧化。低密度脂蛋白(LDL)采用超速离心法分离,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,调整密度,离心后,吸出上层黄色液体,即为 LDL。将 LDL 置于 PBS 溶液中, 4°C 透析 36 h,充分去除 EDTA 后,用含 $10 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 溶液(pH 7.2) 37°C 透析 20 h,进行氧化修饰。氧化修饰后的 LDL 即 ox-LDL 置含 $100 \mu\text{mol/L}$ EDTA 的 PBS 中, 4°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 油红 O 染色

按文献[8],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% 汇合,换用含 0.1% 胎

牛血清的 DMEM 培养基加不同的处理因素。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 10 min,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。

1.5 细胞内胆固醇的检测

参照文献[9],待细胞处理结束后,PBS 洗 3 遍,加入 0.1 mol/L NaOH 500 μL ,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 r/min 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 μL 上清液,加入 8.9 mol/L 氢氧化钾溶液 200 μL ,水解胆固醇酯后为细胞内总胆固醇样品,加入 1 mol/L 氢氧化钠 200 μL 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, 1.5 mol/L 三氧化铬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°C ,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。

1.6 Western blot 法检测亲环素 A 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 pH6.5, 0.15 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100)裂解细胞,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 后转移至 PVDF 膜上(4°C , 110 mA, 3 h),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 β -actin 一抗, 37°C 孵育 2 h, TBST 洗 3 次,1:1 000 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗, 37°C 孵育 0.5 h, TBST 洗 3 次后,用 Western 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。

1.7 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-Newman-Keuls 检验。用 SPSS11.0 统计软件分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对脂滴形成的影响

RAW264.7 细胞与 75 mg/L ox-LDL 共同孵育不同时间(0 h、24 h、48 h 和 72 h),随作用时间延长,细胞内脂滴逐渐增加,当 ox-LDL 处理细胞 48 h 后,细

胞质内大量脂滴存在(图 1)。

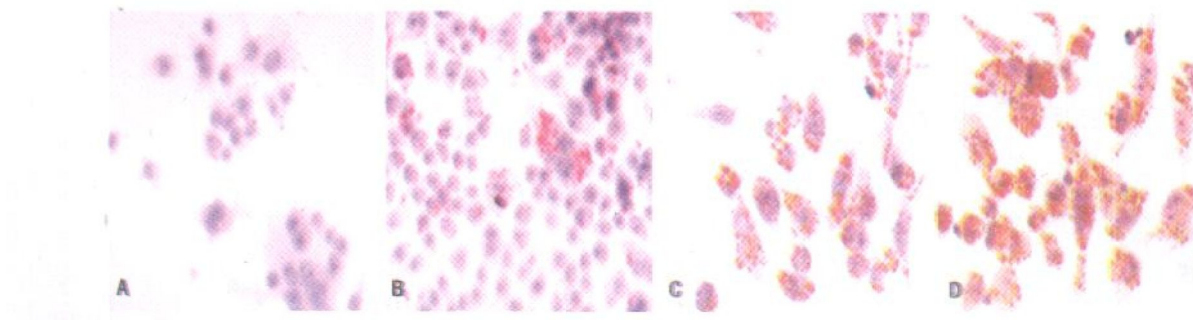


图 1. 氧化型低密度脂蛋白处理细胞不同时间对 RAW264.7 细胞内脂滴形成的影响(油红 O 染色 $\times 200$) A 为 0 h, B 为 24 h, C 为 48 h, D 为 72 h。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对胆固醇含量的影响

高效液相检测结果发现^[10], 随着 ox-LDL 作用时间延长, 细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量不断增加, 48 h 分别增加至 456 ± 14 和 263 ± 13 mg/g 蛋白, 胆固醇酯/总胆固醇值上升至 $42.3\% \pm 5.9\%$, 符合荷脂细胞特征($P < 0.05$, $n = 3$)。

2.3 氧化型低密度脂蛋白对亲环素 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^[10], 亲环素 A 蛋白表达明显减少, 与未处理组比较, 48 h 下降了 $54.5\% \pm 6.3\%$, 72 h 下降了 $59.8\% \pm 5.9\%$ ($P < 0.05$, $n = 3$)。

2.4 普罗布考干预对脂滴形成的影响

实验分为对照组、ox-LDL 组和 ox-LDL+ 75 mg/L 普罗布考组。油红 O 染色显示, ox-LDL 处理 48 h 组细胞胞质内大量脂滴蓄积, 符合荷脂细胞形态特征。而 ox-LDL+ 普罗布考处理 48 h 组, 胞质内脂滴明显减少(图 2)。

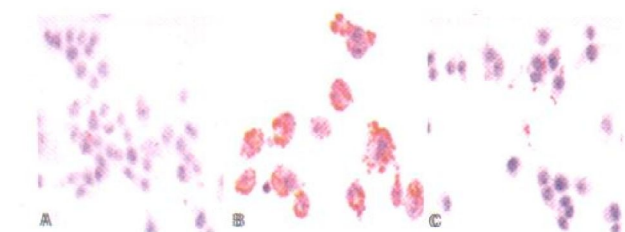


图 2. 不同处理组对 RAW264.7 细胞内脂滴的影响(油红 O 染色, $\times 200$) A 为对照组, B 为 ox-LDL 组, C 为 ox-LDL+ 普罗布考组。

2.5 普罗布考干预对胆固醇蓄积的作用

高效液相检测结果发现, ox-LDL 组细胞内总胆固醇含量为 456 ± 14 mg/g 蛋白, 游离胆固醇含量为

263 ± 13 mg/g 蛋白。ox-LDL+ 普罗布考组细胞内总胆固醇和游离胆固醇含量较 ox-LDL 组明显减少, 胆固醇酯/总胆固醇值由 $42.3\% \pm 5.9\%$ 减至 $32.9\% \pm 2.5\%$ (P 均 < 0.05 , 表 1)。

表 1. 高效液相检测各组细胞内总胆固醇和细胞内游离胆固醇含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

处理组	总胆固醇 (mg/g)	游离胆固醇 (mg/g)	胆固醇酯/ 总胆固醇
对照组	192 ± 10	138 ± 7	$28.3\% \pm 1.2\%$
ox-LDL 组	456 ± 14	263 ± 13	$42.3\% \pm 5.9\%$
普罗布考组	251 ± 14^a	168.3 ± 11.3^a	$32.9\% \pm 2.5\%^a$

a 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较。CE/TC = $[(TC - FC) \div TC] \times 100\%$ 。

2.6 普罗布考干预对亲环素 A 蛋白表达的影响

用 75 mg/L ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 48 h, 细胞内亲环素 A 的蛋白表达明显减少, 加入普罗布考, 细胞内亲环素 A 的蛋白表达增加 $81.3\% \pm 3.6\%$, 较 ox-LDL 组差异有显著性($P < 0.05$)(图 3)。

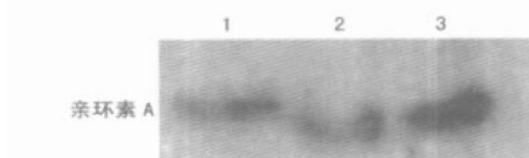


图 3. Western blot 检测各组细胞内亲环素 A 蛋白表达 1 为对照组, 2 为 ox-LDL 组, 3 为 ox-LDL+ 普罗布考组。

3 讨论

有关细胞胆固醇流出的参与蛋白, 廖端芳等^[2]

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。其中小凹蛋白(Caveolin-1)胞内转运体系主要由胆固醇转运复合物小凹蛋白—亲环素 A—Cyclophilin 40—HSP 56 构成。该复合物由 Smart 等^[11]在研究小凹蛋白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胞质中,可检测到组成该复合物的 4 种蛋白,在细胞膜上只有其中的 2 种蛋白亲环素 A 和小凹蛋白,可见亲环素 A 和小凹蛋白在当中的重要作用。已知小凹蛋白是介导细胞尤其是细胞膜小凹区域的胆固醇转运的关键蛋白^[12],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活性^[13],此酶可使脯氨酸发生顺—反式变化,参与蛋白折叠,可能影响小凹蛋白疏水区两端的脯氨酸残基空间结构,从而影响小凹蛋白与胆固醇结合。此外,亲环素 A 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^[14],小凹蛋白的 C-末端 143 位半胱氨酸残基与亲环素 A 结合有关(这个位点为胆固醇转运复合物形成所必须)^[15],均提示亲环素 A 和小凹蛋白分子间的相互作用与胆固醇转运密切相关。本研究发现,ox-LDL 处理 RAW264.7 细胞 48 h 后亲环素 A 的蛋白表达逐渐减弱;高效液相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 甚至小凹蛋白的胆固醇转运功能。文献[16]认为普罗布考能作用于高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)中的胆固醇,使 HDL 颗粒变小,转运胆固醇的能力增强;还能使肝细胞表面的 LDL 受体数目增加,活性增强,而促进胆固醇的分解;同时竞争性抑制 HMG-CoA,降低 TC,抗动脉粥样硬化。作为一种有效抗氧化剂,普罗布考还可阻止 LDL 氧化修饰,抑制粥样斑块泡沫细胞的形成,阻止动脉粥样硬化病变进展,促进病变消退。在本实验中,我们也观察到 ox-LDL 与 RAW264.7 细胞共同孵育 48 h,用普罗布考干预,细胞内脂滴明显减少,细胞内 TC 含量减少至 251 ± 14 mg/g 蛋白,CE/TC 的比值降至 $32.9\% \pm 2.5\%$,细胞内亲环素 A 的蛋白表达增加 $81.3\% \pm 3.6\%$ (P 均 < 0.05),较 ox-LDL 组差异均有显著性。提示普罗布考显著对抗 ox-LDL 对巨噬细胞亲环素 A 的抑制作用,上调亲环素 A 的表达,并

缓解 ox-LDL 损伤后的巨噬细胞内胆固醇蓄积,延缓 ox-LDL 诱导的巨噬细胞源性 RAW264.7 细胞荷脂化过程。

综上所述,ox-LDL 通过下调亲环素 A 的表达促进荷脂细胞内的胆固醇蓄积;普罗布考可通过上调亲环素 A 的表达改善细胞内的胆固醇蓄积,延缓了 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞的荷脂化过程。这为探讨普罗布考抗动脉粥样硬化的机制提供了新的思路。我们将进一步用动物实验验证亲环素 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的防治。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 廖端芳, 廖勤慧, 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[J]. 南华大学学报·医学版, 2004, 32 (3): 347-351
- [3] 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
- [4] Young SC, Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux[J]. Nat Genet, 1999, 22: 316-318
- [5] Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine[J]. J Immunol, 2005, 174 (10): 6 030-038
- [6] Jing ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, et al. CyclophilinA is a secreted growth factor induced by oxidative stress[J]. Circ Res, 2000, 87 (9): 789-796
- [7] 罗育坤, 梁春, 黄东, 许从峰, 贾庆哲, 王克强, 等. 氧化修饰低密度脂蛋白促进人单核细胞源树突状细胞的成熟及活化[J]. 复旦学报(医学版), 2004, 31 (5): 441-444
- [8] 蒋佩, 严鹏科, 莫中成, 曹轩, 唐朝克, 汪江波, 等. 促进细胞内胆固醇流出抑制单核细胞源性泡沫细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (6): 1 041-045
- [9] 王佐, 唐朝克, 吕运成, 李榕娟, 危当恒, 万载阳, 等. 苦瓜蛋白对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的形成及三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 27-30
- [10] 涂剑, 严鹏科, 王北冰, 曹轩, 王蓉蓉, 廖端芳. 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
- [11] Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RG. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane[J]. J Biol Chem, 1996, 271 (46): 29 427-435
- [12] Yu C, Altman M, Dobrowsky RT. Ceramide displaces cholesterol from lipid raft membranes and decreases the association of the cholesterol binding protein Caveolin 1[J]. J Lipid Res, 2005, 46 (8): 1 678-691
- [13] Maki K, Ikura T, Hayano T, Takahashi N, Kuwajima K. Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease[J]. Biochemistry, 1999, 38 (7): 2 213-223
- [14] Annette U, Eric JS. Palmitoylation of Caveolin1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveole[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (33): 25 595-599
- [15] 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
- [16] 严鹏科, 廖端芳. 普罗布考对巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶 9 的抑制作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (3): 199-202

(此文编辑 朱雯霞)