DOI:10.16016/j.1000-5404.201409084

论著

oxLDL通过PPARγ-ABCG1通路促进血管平滑肌细胞泡沫化

曹小洁,张莉莉,郭 露,黎炳护,皮 燕,廖少琼,龙春燕,刘 赟,尹延伟,李敬诚 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科)

[摘要] **目的** 探讨氧化低密度脂蛋白(oxLDL)促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)泡沫化是否与过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ,PPARγ)-三磷酸腺苷结合盒转运子G1(ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1)通路调节相关。**方法** 组织贴块法培养原代VSMCs;细胞免疫荧光染色鉴定原代VSMCs;BODIPY染色定性检测细胞内脂质沉积,酶促比色法定量检测细胞内总胆固醇沉积的量;Western blot检测VSMCs中PPARγ、ABCG1蛋白表达情况。**结果** ①OxLDL作用VSMCs 48 h后脂质沉积增加;②OxLDL作用VSMCs PPARγ蛋白表达量下降约53%($P<0.01$),ABCG1蛋白表达量下降约48%($P<0.05$);③罗格列酮激动PPARγ后,ABCG1蛋白表达量较单独的oxLDL组增加约147%($P<0.05$),VSMCs中脂质沉积明显减少。**结论** oxLDL通过PPARγ-ABCG1通路促进血管平滑肌细胞泡沫化。

[关键词] 泡沫细胞;平滑肌细胞;oxLDL;PPARγ;ABCG1
[中图法分类号] R322.12;R329.26;R543.502 [文献标志码] A

OxLDL promotes vascular smooth muscle cells to form foam cells through PPARγ-ABCG1 signal pathway

Cao Xiaojie, Zhang Lili, Guo Lu, Li Binghu, Pi Yan, Liao Shaoqiong, Long Chunyan, Liu Yun, Yin Yanwei, Li Jingcheng (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) promoting vascular smooth muscle cells (VSMCs) to form foam cells is regulated by peroxisome proliferator receptor γ (PPARγ)-ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) pathway. **Methods** Primary VSMCs were isolated from male C57BL/6J mice, cultured with tissue explant technique, and identified by immunofluorescence staining. BODIPY staining was used to analyze the intracellular lipid deposition, and the total cholesterol deposition in the VSMCs was quantitatively detected by enzymatic colorimetric assay. the protein expression of PPARγ and ABCG1 in the VSMCs was analyzed by Western blotting. **Results** After oxLDL intervention in the VSMCs for 48 h, the lipid deposition was increased. PPARγ protein expression was decreased by about 53% ($P<0.01$), while ABCG1 protein expression was decreased by about 48% ($P<0.05$). After rosiglitazone activated PPARγ, ABCG1 protein expression was increased by about 147% ($P<0.05$), and the lipid deposition was reduced in the VSMCs. **Conclusion** OxLDL promotes the formation of smooth muscle-derived foam cells through PPARγ-ABCG1 signal pathway.

[**Key words**] foam cells; vascular smooth muscle cells; oxLDL; PPARγ; ABCG1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271282, 81400967) and the Science Foundation for Outstanding Young Scholars of Chongqing (CSTC2012JJJQ10003). Corresponding author: Li Jingcheng, Tel: 86-23-68757841, E-mail: lijingcheng11@aliyun.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271282,81400967);重庆市杰出青年科学基金(CSTC2012JJJQ10003)
[通信作者] 李敬诚,电话:(023)68757841,E-mail:lijingcheng11@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1531.089.html (2014-12-02)

动脉粥样硬化是动脉血管的慢性炎症过程,以脂质在血管壁的不断积累为特点。血管平滑肌细胞是内膜增生和动脉粥样硬化某些阶段的主要细胞。研究证实,在动脉粥样硬化过程中,平滑肌细胞发生趋向于巨噬细胞特点的表型转化,易于脂质在平滑肌细胞内的聚集[1]。oxLDL是动脉粥样硬化的危险因素,低密度脂蛋白(oxLDL)干预将导致促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)内胆固醇酯含量明显升高[2]。

过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ)是配体诱导的转录因子的核受体超家族成员[3],参与脂肪形成、脂质代谢和糖代谢[4]。研究发现,PPARγ存在于VSMCs中并参与VSMCs的增殖迁移及炎症反应[5]。ATP结合盒转运体G1(ATP-binding cassette transporter G1, ABCG1)是ATP结合盒转运体家族中的一员,主要作用是将胆固醇从细胞内转运给细胞外的HDL。研究表明在$LDLR^{-/-}$小鼠,缺乏ABCG1将加剧早期动脉粥样硬化病变[6]。同时抑制ABCG1将导致胆固醇脂生成增加[7]。本研究旨在探讨oxLDL可促进平滑肌细胞泡沫化,并且部分通过PPARγ-ABCG1通路调节。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~8周龄C57BL/6J雄性小鼠12只,质量15~25 g,SPF级,购自南京大学模式动物研究所。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)、DMEM细胞培养液购自美国Gibco公司。青链霉素溶液、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗、免疫染色固定液购自江苏碧云天公司。oxLDL购自广东奕源生物公司。ABCG1一抗购自美国Thermo公司,PPARγ、α-SMA和SM-22α一抗、胆固醇定量检测试剂盒购自英国Abcam公司。RNA提取试剂及RT-qPCR试剂盒购自日本TaKaRa,其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 血管平滑肌细胞原代培养及鉴定 小鼠麻醉后取胸主动脉,采用组织贴块法培养血管原代平滑肌细胞,用含20% FBS和1%双抗的DMEM高糖培养基,生长8~14 d后采用胰酶消化液进行传代。选取3~10代状态良好的细胞用于实验。取3代血管平滑肌细胞,接24孔板,计数以1×10^5细胞爬片,18~24 h细胞贴壁后,用免疫染色固定液室温固定30 min,PBS洗涤3次×10 min,0.25% Triton破膜打孔5 min,PBS洗涤3次×10 min,羊血清室温封闭30 min,α-SMA和SM-22α一抗1∶200稀释,4 ℃孵育24 h,弃一抗,PBS洗涤3×10 min,加入Alexa Fluor 488标记鸡抗兔IgG(H+L)二抗(1∶200稀释),室温避光孵育1 h,PBS洗涤3次×10 min,再加入Alexa Fluor 647标记兔抗鼠IgG(H+L)二抗(1∶200稀释),室温避光孵育1 h,PBS洗涤3次×10 min,Hoechst33342避光染核5 min,PBS洗3次×3 min,抗荧光猝灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.2 实验分组及模型建立 oxLDL干预实验分为对照组和oxLDL组,oxLDL(50 μg/mL)干预VSMCs 48 h,使脂质沉积于细胞中。罗格列酮干预实验分为对照组、罗格列酮组、oxLDL组、罗格列酮+oxLDL组共4组,细胞接板培养18~24 h贴壁,弃掉旧培养基,罗格列酮组及罗格列酮+oxLDL组加入罗格列酮(25 μmol/L)预刺激30 min,再加入oxLDL(50 μg/mL)共培养48 h。

1.2.3 BODIPY染色 细胞爬片,免疫染色固定液固定后PBS浸泡30 min,0.25% Triton打孔5 min,增加细胞膜的通透性,BODIPY染料(1 μg/mL)常温染色30 min,PBS洗涤3次×10 min,Hoechst33342避光染核5 min,PBS洗3次×3 min,抗荧光猝灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.2.4 定量检测细胞内总胆固醇含量 干预48 h后收集细胞,胆固醇萃取液(三氯甲烷∶异丙醇∶NP-40 = 7∶11∶0.1)200 μL萃取1×10^6细胞,测定胆固醇浓度,剩余的沉淀使用200 μL RIPA裂解蛋白,采用Lowry法测定蛋白浓度,计算每毫克蛋白中胆固醇的含量(μg/mg)。

1.2.5 Western blot检测 OxLDL干预细胞48 h,收集蛋白,Lowry法测定蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗ABCG1(1∶500)、PPARγ(1∶500)、β-actin(1∶5 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次×10 min,二抗加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠室温孵育1 h,TBST洗膜3次×10 min,化学发光法曝光,采用Image Lab软件分析数据。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,每项实验至少重复3次,每次实验结果取3~5个复孔的均值,数据以$\bar{x}\pm s_x$表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 原代VSMCs培养及鉴定

取小鼠胸主动脉采用组织贴块法培养VSMCs,普

通光镜(图 1)观察原代 VSMCs 呈带状三角形、菱形等多种形态。α-SMA 和 SM-22α 标记 VSMCs 的肌动蛋白,经免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜下见细胞呈现绿色荧光及红色荧光(图 2),即可证实培养的细胞为 VSMCs,且目的细胞纯度达 95% 以上,可用于实验。

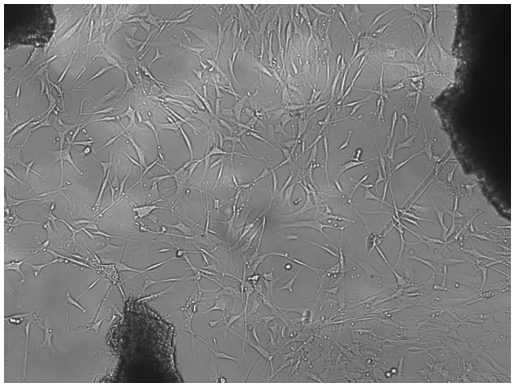


图 1　光镜下观察贴块法培养 14 d 的原代平滑肌细胞　(×100)

2.2　BODIPY 染色观察 VSMCs 脂质沉积情况

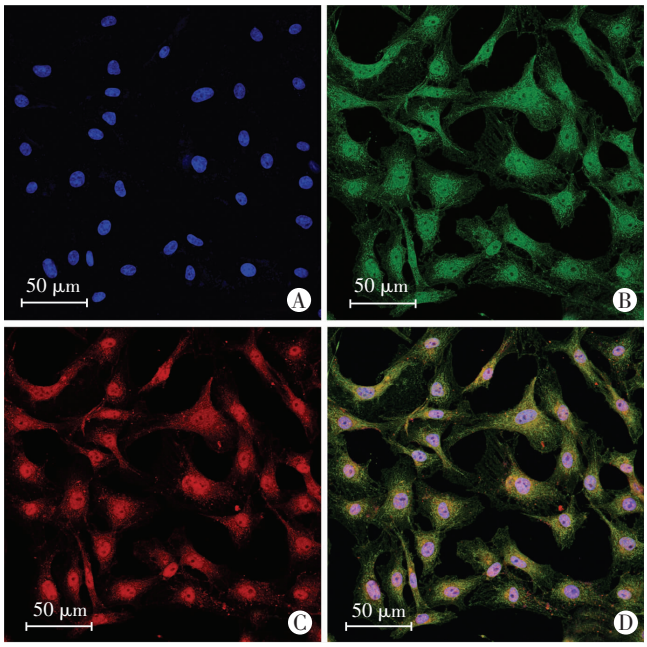
OxLDL 干预细胞 VSMCs 48 h,BODIPY 染色标记 VSMCs 中的脂质为绿色点片状(图 3),oxLDL 组脂质沉积明显多于对照组。

2.3　定量检测 VSMCs 中总胆固醇含量

OxLDL 刺激培养细胞 48 h,收集细胞进行胆固醇萃取、定量测定及蛋白浓度测定,结果显示对照组总胆固醇含量为(22.53 ± 1.85) μg/mg,oxLDL 组总胆固醇含量为(43.85 ± 2.73) μg/mg,oxLDL 组胆固醇含量约为对照组的 195%,且有统计学差异(P < 0.05)。

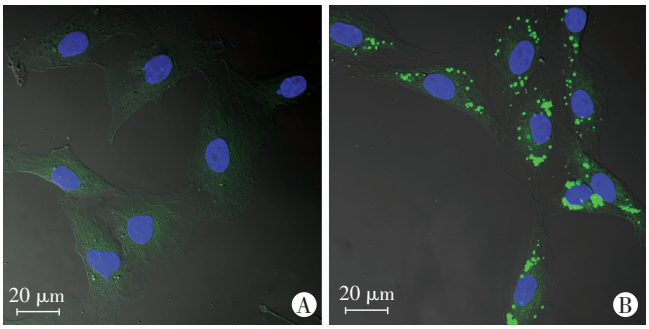
2.4　Western blot 检测脂质沉积于 VSMCs 后 PPARγ 和 ABCG1 蛋白变化

OxLDL(50 μg/mL)干预 VSMCs 48 h,oxLDL 组 PPARγ 蛋白表达是对照组的 53%,差异有统计学意义(P < 0.01)。oxLDL 组 ABCG1 蛋白表达是对照组的 48%,差异有统计学意义(P < 0.05,图 4)。



A:Hoechst 33342;B:α-SMA;C:SM-22α;D:融合图

图 2　α-SMA、SM-22α 免疫荧光双标鉴定原代 VSMCs

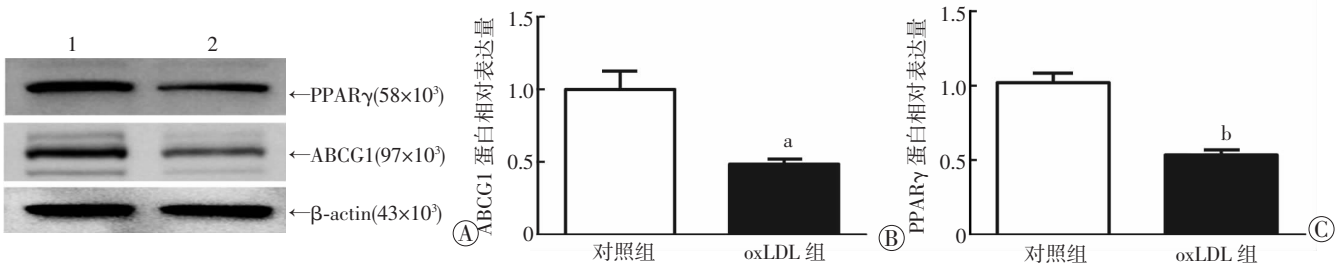


A:对照组;B:oxLDL 组

图 3　BODIPY 染色观察脂质沉积于 VSMCs

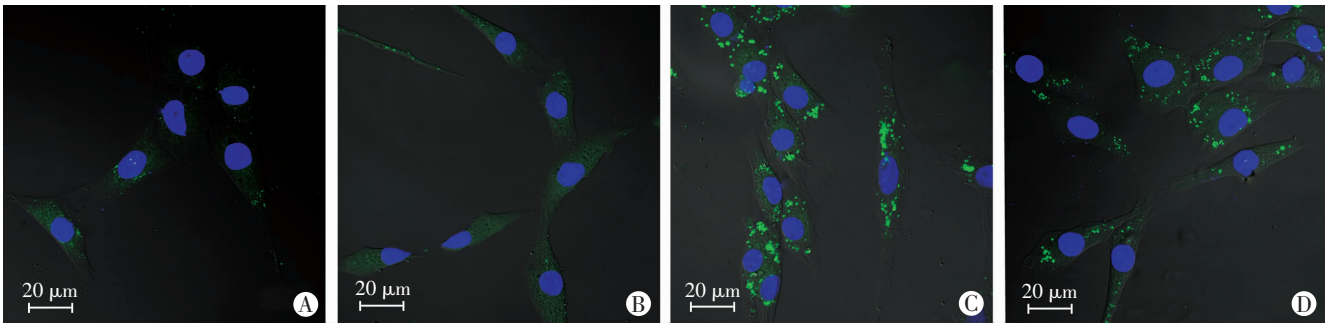
2.5　罗格列酮干预减少 VSMCs 中脂质沉积

罗格列酮 25 μmol/L 预刺激 VSMCs 30 min,加入 oxLDL 干预 48 h,BODIPY 染色标记细胞内脂肪酸沉积罗格列酮 + oxLDL 组较 oxLDL 组明显减少(图 5)。



A:Western blot 检测结果　1:对照组;2:oxLDL 组;B、C:ABCG1、PPARγ 蛋白半定量分析　a:P < 0.05,b:P < 0.01,与对照组比较

图 4　Western blot 检测各组 VSMCs 中 PPARγ、ABCG1 蛋白表达



A:对照组;B:罗格列酮组;C:oxLDL组;D:罗格列酮+oxLDL组

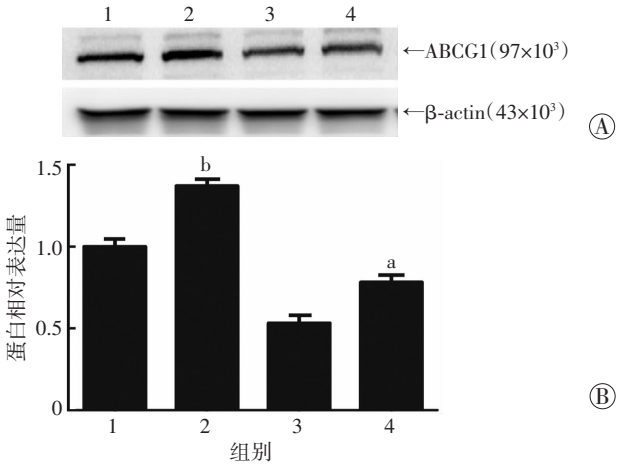
图5 BODIPY染色观察PPARγ激动剂(罗格列酮)干预后脂质沉积于VSMCs

2.6 酶促比色法检测罗格列酮干预后VSMCs中总胆固醇含量

罗格列酮25 μmol/L预刺激VSMCs 30 min,加入oxLDL干预48 h,萃取胆固醇及定量检测。结果显示,对照组、罗格列酮组、oxLDL组和罗格列酮+oxLDL组总胆固醇含量分别为(25.16±1.58)、(23.58±2.08)、(43.28±1.21)、(32.65±1.36)μg/mg。与对照组、罗格列酮组比较,oxLDL组、罗格列酮+oxLDL组总胆固醇含量均显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$),oxLDL组与罗格列酮+oxLDL组差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.7 Western blot检测罗格列酮激动PPARγ后ABCG1的蛋白变化

罗格列酮组ABCG1蛋白表达量是对照组的137%,差异有统计学意义($P<0.05$);oxLDL组分别是对照组的53%,是罗格列酮组的39%,差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);罗格列酮+oxLDL组是oxLDL组的147%,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图6。



1:对照组;2:罗格列酮组;3:oxLDL组;4:罗格列酮+oxLDL组 A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与oxLDL组比较

图6 Western blot检测PPARγ激动剂(罗格列酮)干预后VSMCs中ABCG1蛋白的表达

3 讨论

动脉粥样硬化是引起冠状动脉和脑血管疾病最主要的原因,而心脑血管疾病引起的人类死亡占全球死亡人数的1/5,已成为威胁人类健康的主要杀手[8]。动脉粥样硬化是一种慢性炎症性的血管疾病,涉及动脉内膜脂质聚集、血管损伤及斑块形成。泡沫细胞在血管内皮下的大量堆积是动脉粥样硬化的主要特征。泡沫细胞的形成是由于脂质摄取增多流出减少,不断蓄积于细胞内使细胞发生泡沫样改变。过去的观点普遍认为泡沫细胞是由巨噬细胞转化而来,后来的研究发现VSMCs也是泡沫细胞的重要来源。在遗传性高脂血症和高脂喂养的家兔模型中晚期动脉粥样硬化病变中,仅有30%为巨噬细胞源性的泡沫细胞,而45%则来源于VSMCs[9]。在本实验中oxLDL刺激培养细胞48 h,经BODIPY染色显示脂质沉积于细胞内明显增多,通过酶促比色法测定oxLDL组总胆固醇含量为43.85 μg/mg,为对照组的195%。

PPARγ为核受体超家族成员,早期报道其见于脂肪细胞、树突状细胞和巨噬细胞。参与脂质代谢、脂肪形成和糖代谢。近年来PPARγ在血管平滑肌细胞泡沫化形成中的作用受到越来越多的关注。研究表明在内皮细胞中oxLDL干预可使PPARγ蛋白表达量下降[10]。在巨噬细胞中PPARγ可通过LXR及其靶基因ABCA1、ABCG1激活胆固醇逆转运促进胆固醇流出过程[11-12]。本实验结果显示,oxLDL刺激培养细胞48 h后,VSMCs中PPARγ蛋白表达量下降约47%,ABCG1蛋白表达量下降约52%。胆固醇逆转运体系受损,脂质沉积于细胞内。

噻唑烷二酮类(TZD)是PPARγ的激动剂,研究报道TZD可明显减轻高脂喂养的ApoE$^{-/-}$小鼠斑块形成和动脉粥样硬化病变[13]。罗格列酮作为PPARγ的特异性配体应用广泛。本研究使用25 μmol/L罗格列

酮激动 PPARγ,可使 ABCG1 蛋白表达量升高约137%,同时罗格列酮激活 PPARγ 可部分逆转 oxLDL 对 ABCG1 的抑制作用,结果显示 ABCG1 蛋白表达 oxLDL + 罗格列酮组是 oxLDL 组 147%。作为脂质转运体的 ABCG1 表达量升高,脂质流出增多,因此 BODIPY 染色显示罗格列酮的干预使脂质沉积明显减轻,同时测得罗格列酮干预使细胞内总胆固醇含量较 oxLDL 单独作用降低约 25%。

综上所述,本研究发现核转录调节因子 PPARγ 可调节脂质转运体 ABCG1,参与平滑肌细胞脂质代谢,从而在平滑肌细胞泡沫化过程中发挥着重要作用。从一个新的角度探讨了平滑肌细胞泡沫化的分子机制。该通路的提出将为动脉粥样硬化的防治提供新的思路。

参考文献:

[1] Allahverdian S, Francis G A. Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells[J]. Trends Cardiovasc Med, 2010, 20(3): 96 - 102.

[2] Luo D X, Xia C L, Li J M, *et al*. Static pressure accelerates ox-LDL-induced cholesterol accumulation *via* SREBP-1-mediated caveolin-1 downregulation in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403(1): 52 - 58.

[3] Evans R M, Barish G D, Wang Y X. PPARs and the complex journey to obesity[J]. Nat Med, 2004, 10(4): 355 - 361.

[4] Ahmadian M, Suh J M, Hah N, *et al*. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future[J]. Nat Med, 2013, 19(5): 557 - 566.

[5] Zhang L L, Gao C Y, Fang C Q, *et al*. PPARgamma attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(3): 484 - 493.

[6] Meurs I, Lammers B, Zhao Y, *et al*. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis [J]. Atherosclerosis, 2012, 221(1): 41 - 47.

[7] Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, *et al*. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(6): 1310 - 1316.

[8] Lopez A D, Mathers C D, Ezzati M, *et al*. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data[J]. Lancet, 2006, 367(9524): 1747 - 1757.

[9] Rosenfeld M E, Ross R. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits [J]. Arteriosclerosis, 1990, 10(5): 680 - 687.

[10] Kuo M Y, Ou H C, Lee W J, *et al*. Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C-alpha/extracellular signal-regulated kinase/peroxisome proliferator-activated receptor gamma/nuclear factor-kappaB (PKC-alpha/ERK/PPAR-gamma/NF-kappaB) signaling pathway in endothelial cells[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 5100 - 5108.

[11] Badrnya S, Schrottmaier W C, Kral J B, *et al*. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(3): 571 - 580.

[12] Chawla A, Boisvert W A, Lee C H, *et al*. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis[J]. Mol Cell, 2001, 7(1): 161 - 171.

[13] Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, *et al*. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(3): 372 - 377.

(**收稿**:2014-09-12;**修回**:2014-10-08)

(编辑 张 维)