

· 基础研究 ·

阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞 TLR4 及下游 MyD88 依赖性信号转导通路的影响*

姜 华, 姜玉姬

(延边大学附属医院, 吉林延吉 133000)

摘要:目的 研究阿托伐他汀(ATV)对 Toll 样受体 4(TLR4)及其下游信号转导通路主要元件下游髓样分化因子 88(MyD88)及肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TRAF-6)表达的影响,探讨 ATV 防治动脉粥样硬化(AS)的机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,用脂多糖(LPS)刺激并加入 ATV 干预 24 h,收集细胞,用荧光定量 PCR 方法测定 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 mRNA 表达;用 Western blotting 法测定 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 蛋白表达。结果 用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞后,引起 TLR4、MyD88 和 TRAF-6 的高表达(与空白对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.01$),用 ATV 干预以后显著抑制 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 的表达(与模型组比较差异有统计学意义, $P < 0.01$)。结论 ATV 可阻断 TLR4 高表达,同时阻断 TLR4 胞内信号转导的 MyD88 依赖性途径,这可能是 ATV 抗 AS 的作用机制之一。

关键词:阿托伐他汀;Toll 样受体 4;MyD88;动脉粥样硬化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1106-02

Effect of atorvastatin on the expression of TLR4 and MyD88-dependent signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells*

Jiang Hua, Jiang Yuji

(The Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-atherosclerotic effect of atorvastatin on the expression of TLR4 and its downstream signal transduction pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** LPS stimulated HUVECs were treated with atorvastatin for 24 h. The mRNA expression of TLR4, MyD88 and TRAF-6 were measured by real-time PCR. Protein level of TLR4, MyD88 and TRAF-6 were measured by western blotting. **Results** The mRNA expression of TLR4, MyD88 and TRAF-6 increased inducing by LPS, and were significantly decreased after atorvastatin treatment. LPS increased protein level of TLR4, MyD88 and TRAF-6, which were markedly inhibited by atorvastatin. **Conclusion** Atorvastatin reduces the expression of TLR4, and influences the MyD88-dependent signaling pathway of TLR4. These findings suggest that atorvastatin may exert the function of anti-atherosclerosis through blocking the MyD88-dependent signaling pathway of TLR4.

Key words: atorvastatin; TLR4; MyD88; atherosclerosis

研究表明, Toll 样受体 4(TLR4)在抗感染免疫、移植免疫、肿瘤的形成、创伤的愈合、动脉粥样硬化(AS)的形成和炎性肠病等疾病中起着重要的作用。越来越多的证据表明 TLR4 是免疫反应和慢性炎症、脂代谢紊乱之间的一个桥梁,有可能在动脉粥样硬化过程中发挥重要的作用^[1-2]。本研究应用 TLR4 特异性激动剂脂多糖(LPS)刺激人脐静脉内皮细胞,并用阿托伐他汀进行干预,研究阿托伐他汀对 TLR4 及下游髓样分化因子 88(MyD88)依赖性信号转导通路的影响,探讨阿托伐他汀(ATV)防治 AS 的机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂 实验用 ATV 纯品购自美国 LKT Laboratories 公司;FBS 购自四川四季青公司;胰蛋白酶、LPS 购自 Sigma 公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;第Ⅷ因子相关抗原购自北京中杉金桥公司;RNA-OUT 总 RNA 提取试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量测定试剂盒购于武汉博士德生物工程公司;M-MLV 逆转录酶为 Promega 产品;兔抗人 TLR4、MyD88、肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TRAF-6)抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定 在无菌条件下,用胰酶消化法分离人脐静脉内皮细胞^[3],在 37℃、5% CO₂ 条件下静置培养。培养到融合状态的人脐静脉内皮细胞呈单层“铺路石”样排列,状如梭形或多角形,大小均匀(封 3 图 1)。用第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光染色,绝大多数细胞为第Ⅷ因子相关抗原阳性(封 3 图 2)。实验时采用第 2~4 代细胞,待细胞生长融合成单层后用于实验。

1.2.2 分组及干预 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养人脐静脉内皮细胞 18 h,待细胞生长融合成单层后,分为空白对照组、模型组和 ATV 组,各组分别以下列方法干预。(1)空白对照组:含 10% FBS 的 DMEM。(2)模型组:含 10% FBS 的 DMEM + LPS(1 μg/mL)。(3)ATV 组:含 10% FBS 的 DMEM + LPS(1 μg/mL) + ATV(10 μmol/L)^[4]。每组均设 5 个复孔,培养 24 h 后收集细胞。

1.2.3 荧光定量 PCR 用 RNA-OUT 提取总 RNA,逆转录,应用荧光定量 PCR 方法测定 TLR4、MyD88 和 TRAF-6 mRNA 的表达。PCR 反应条件:扩增条件:94℃变性 5 min(94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s) × 55 个循环,72℃ 延伸 5 min。本

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160476)。

实验设定 GAPDH 为内参照做平型管。引物从 Gene Bank 获得,由大连宝生物工程有限公司合成。TLR4 上游引物:5'-AGC GCT GCC TAC ACT AC-3',下游引物:5'-GAT TAT ACC AGC GCG AC-3',扩增产物长度为 187 bp;MyD88 上游引物:5'-ATA GGC ACC AGC ATG CAC-3',下游引物:5'-TAG GGT CCT TAC CAG GTA-3',扩增产物长度为 181 bp;TRAF-6 上游引物:5'-AGC CAC AAT CCC ATG-3',下游引物:5'-GTC ACG GAA AGG CGC-3',扩增产物长度为 224 bp;GAPDH 上游引物:5'-CTC ATC ACC ACA ATC CAT GC-3',下游引物:5'-CAC GTT GAG GGT AAG AAC AC-3' 扩增产物长度为 227 bp。反应结束后由计算机自动计算得出 Ct 值,用 2^{-△△Ct} 方法进行计算和统计。

1.2.4 蛋白质印迹分析 收集各组细胞,加入 1×SDS 上样缓冲液裂解细胞,收集细胞蛋白样品,BCA 法检测蛋白浓度,并将制备好的蛋白样品置于-80℃冰箱保存备用。每加样孔加 60 μg 的蛋白样品电泳,经 SDS-PAGE 电泳,转至硝酸纤维素膜上,分别加入 1:200 兔抗人 TLR4、MyD88、TRAF-6 一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 15 min,加入过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1000),置室温 2 h 显色,计算机扫描,用图像分析软件(Lab work 3.0)比较目的条带吸光度值(A value)^[3]。

1.3 统计学处理 全部数据采用 SPSS15.0 统计软件进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

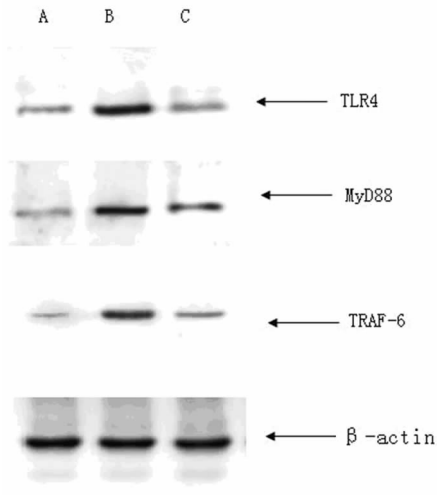
2 结 果

ATV 对 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 mRNA 表达的影响,见表 1。ATV 对 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 蛋白表达的影响见表 2,图 3。

表 1 ATV 对 TLR4、MyD88 及 TRAF-6 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TLR4	MyD88	TRAF-6
空白对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	4.23±0.16*	3.58±0.72*	3.64±0.35*
ATV 组	2.46±0.47#	2.31±0.22#	2.07±0.51#

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较;#: $P < 0.01$,与模型组比较。



A:空白对照组;B:模型组;C:ATV 组。

图 3 蛋白表达水平

表 2 ATV 对 TLR4、MyD88 和 TRAF-6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TLR4	MyD88	TRAF-6
空白对照组	0.247±0.026	0.31±0.008	0.226±0.004
模型组	0.942±0.061*	0.963±0.036*	0.837±0.054*
ATV 组	0.398±0.02#	0.464±0.012#	0.375±0.016#

*: $P < 0.01$,与空白对照组比较;#: $P < 0.01$,与模型组比较。

3 讨 论

AS 以血管壁内脂质、炎症细胞聚集为特征^[5]。TLR4 作为一种介导天然免疫反应的跨膜信号转导受体参与了 AS 的形成、发展以及斑块破裂的各个环节,可通过多途径影响 AS 进程。研究发现与正常血管相比,AS 病变中的内皮细胞 TLR4 表达明显增加。体外培养的人血管内皮细胞在基础条件下 TLR4 表达很低,但经促炎因子刺激,TLR4 表达明显升高;血管外膜成纤维细胞中 TLR4 激活可促进新内膜的生成,此效应在 TLR4 缺陷的基因敲除小鼠模型中明显降低,TLR4 参与了 AS 进程中新内膜的形成^[6-9]。TLR4 下游信号转导通路包括 MyD88 依赖性途径和 MyD88 非依赖性途径。其中 MyD88 依赖性途径主要包括 MyD88 和 TRAF-6 等主要元件,经过一系列信号转导,最终激活核转录因子(NF-κB)^[10]。TLR4 与接头蛋白 MyD88 结合后再与白细胞介素相关激酶(IL-RAKs)结合,促使核转录因子 NF-κB 移位,启动天然免疫和炎症反应有关基因的转录,诱发炎症反应^[11]。

目前在 AS 治疗方面,主要以降低血脂为主,同时也用一些抗氧化保护血管内皮、抗血栓形成、抗免疫损伤的药物。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂即他汀类药物是调脂治疗的一线药物。他汀类药物通过阻断肝脏羟甲基戊二酰辅酶 A 转化为甲羟戊酸而抑制胆固醇的合成,降低血浆中的低密度脂蛋白。长期使用他汀类药物可预防冠状动脉疾病的发生,减少致死性和非致死性心血管病事件的发生率,具有对心脏的保护作用。除有效降低血脂外,还具有抗炎、抗氧化、改善血管内皮功能、调节细胞增殖等独立于降脂之外的作用^[12-13]。

实验结果表明,ATV 对 TLR4 及下游信号转导通路主要元件 MyD88 及 TRAF-6 mRNA 和蛋白表达有明显抑制作用。ATV 能明显下调人脐静脉内皮细胞 TLR4 的高表达,说明 ATV 对 TLR4 具有拮抗作用,同时 ATV 能明显下调 MyD88 和 TRAF-6 的表达,说明 ATV 对 TLR4 胞内信号转导的 MyD88 依赖性途径有明显的抑制作用。ATV 通过抑制 TLR4 及下游 MyD88 依赖性途径 MyD88 和 TRAF-6 发挥其抗炎、改善血管内皮的作用,这可能是其抗 AS 的机制之一。

参考文献:

[1] Harrington LS, Belcher E, Moreno L, et al. Homeostatic role of Toll-like receptor 4 in the endothelium and heart [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2007, 12(4): 322-326.
 [2] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. Circulation, 2002, 105(10): 1158-1161.
 [3] 姜华, 张艳, 王辰. 益气活血复方含药血清对人脐静脉内皮细胞 TLR4 及其下游髓样分化因子 88、肿瘤坏死因子受体相关因子-6 表达的影响 [J]. 中国(下转第 1110 页)

机辐射引起睾丸或附睾组织液浓度引起氧化应激引起的呢?这种影响是不是直接影响到精子的顶体酶活性及受精能力?还有待于进一步研究。精子运动能量主要来自糖酵解,电磁辐射通过影响能量代谢对精子活力产生作用。研究电磁辐射对精子 DNA 损伤及能量代谢的影响也将是下一步研究的课题。

男性精液质量是受多因素影响的。本研究尽量排除其他因素如特殊职业(司机、厨师、油漆工等)、生活居住环境(装修)、药物等影响因素;使个体差不多处于同一个水平(体质量、身高、年龄、抽烟、饮酒、喝茶等);但是还有其他影响因素还不能考虑,如移动电话使用、变电站存在、运动、压力等因素。还有,样本量本身不太大,而且主要是重庆主城区的研究对象,所以研究结果还有一定局限。但是本研究结果至少预示长期使用计算机会降低精子活力、活率,并使正常精子数量减少。这将为加强计算机辐射的防护措施的建立提供依据。

参考文献:

[1] 袁方. 某作业场所计算机超高频辐射和工频电场强度检测结果分析[J]. 中国卫生工程学, 2010, 9(3): 208-209.

[2] Derias EM, Stefanis P, Drakeley A, et al. Growing concern over the safety of using mobile phones and male fertility [J]. Arch Androl, 2006, 52(1): 9-14.

[3] Al-Akhras MA, Darmani H, Elbeticha A. Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats[J]. Bioelectromagnetics, 2006, 27(2): 127-131.

[4] 世界卫生组织. 人类精液及精子——宫颈黏液相互作用实验室检验手册[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[5] Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108

(10): 961-966.

[6] Li Y, Lin H, Ma M, et al. Semen quality of 1346 healthy men, results from the Chongqing area of southwest China [J]. Hum Reprod, 2009, 24(2): 459-469.

[7] Fernie KJ, Reynolds SJ. The effects of electromagnetic fields from power lines on avian reproductive biology and physiology: a review[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2005, 8(2): 127-140.

[8] Derias EM, Stefanis P, Drakeley A, et al. Growing concern over the safety of using mobile phones and male fertility [J]. Arch Androl, 2006, 52(1): 9-14.

[9] 操冬梅, 周春, 张元珍, 等. 移动电话电磁辐射对小鼠精子的损伤作用[J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31(6): 364-367.

[10] 丁晓萍, 闫素文, 张宁, 等. 微波辐射对雷达操作人员精液质量影响的现况调查[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(1): 40-43.

[11] 索永善, 马川花, 叶玲玲, 等. 雷达微波辐射对精子穿透去透明带金黄色小鼠卵能力与顶体酶活性的影响[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(3): 275-276.

[12] Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, et al. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study[J]. Fertil Steril, 2008, 89(1): 124-128.

[13] Eroglu O, Oztas E, Yildirim I, et al. Effects of electromagnetic radiation from a cellular phone on human sperm motility: an in vitro study[J]. Arch Med Res, 2006, 37(7): 840-843.

(收稿日期: 2011-11-08 修回日期: 2011-12-11)

(上接第 1107 页)

中西医结合杂志, 2010, 30(5): 519-522.

[4] 王虹艳, 曲鹏, 富晶, 等. TLR4 激动上调内皮细胞氧化低密度脂蛋白受体 LOX-1 表达[J]. 高血压杂志, 2005, 13(7): 422-426.

[5] Inflammation HG. Atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. New Engl J Med, 2005, 352(16): 1685-1695.

[6] Hollestelle SC, De Vries MR, Van Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling [J]. Circulation, 2004, 109(3): 393-398.

[7] Convergence VA, amplification of Toll-like receptor. (TLR) and receptor for advanced glycation end products(RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. Angiogenesis, 2008, 11(3): 91-99.

[8] Spirig R, van Kooten C, Obregon C, et al. The complement inhibitor low molecular weight dextran sulfate prevents TLR4-induced phenotypic and functional maturation of

human dendritic cells[J]. J Immunol, 2008, 181(2): 878-890.

[9] Schoneveld AH, Hoefer I, Sluijter JP, et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness[J]. Atherosclerosis, 2008, 197(1): 95-104.

[10] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling[J]. J Allergy Clin Immunol, 2006, 117(5): 979-987.

[11] Kaushal V, Schlichter LC. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra [J]. J Neurosci, 2008, 28(9): 2221-2230.

[12] Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins[J]. Circulation, 2004, 109(23 Suppl 1): 39-43.

[13] Hoffmann R, Haager P, Suliman H, et al. Effect of statin therapy before Q-wave myocardial infarction on myocardial perfusion[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(2): 139-143.

(收稿日期: 2011-11-21 修回日期: 2011-12-23)