

· 基础研究 ·

阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 表达的影响*

姜玉姬, 姜 华

(延边大学附属医院肾内科, 吉林延吉 133000)

摘要:目的 研究阿托伐他汀(ATV)对脂多糖(LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及细胞间黏附分子(ICAM-1)表达的影响,探讨 ATV 防治动脉粥样硬化的机制及其抗炎作用。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞,用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞后,加入 ATV 干预 24 h,收集细胞,用荧光定量 PCR 方法测定 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 mRNA 的表达;用 Western blotting 法测定 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 蛋白表达。结果 用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞后,引起 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 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 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 的表达,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 ATV 可抑制 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 的表达,这可能是其发挥抗动脉粥样硬化作用及抗炎作用的机制之一。

关键词: ATV; 内皮细胞; LOX-1; TNF- α ; ICAM-1; 动脉粥样硬化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)17-1708-02

Effect of atorvastatin on expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1 in human umbilical vein endothelial cells*

Jiang Yuji, Jiang Hua

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

Abstract: Objective To investigate the influence of atorvastatin on the expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and to study its possible anti-atherosclerotic mechanism. Methods HUVECs were cultured in vitro and stimulated with LPS, then treated with atorvastatin for 24 h, finally measured the expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1 mRNA with real-time PCR. Western blotting method was used to analyze the expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1 protein. Results LPS enhanced the expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1, with statistical difference compared with the normal control group ($P < 0.01$). Atorvastatin decreased the high expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1, showing statistical difference compared with the model group ($P < 0.01$) which were stimulated by LPS. Conclusion Atorvastatin can block the high expression of LOX-1, TNF- α and ICAM-1, which may be one of the mechanisms to play the anti-atherosclerosis and anti-inflammation role.

Key words: atorvastatin; HUVECs; LOX-1; TNF- α ; ICAM-1; atherosclerosis

动脉粥样硬化(AS)以血管壁内脂质、炎症细胞聚集为特征^[1]。研究表明炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及细胞间黏附分子(ICAM-1)在 AS 的发生和发展起着重要的作用,同时脂多糖(LPS)通过激活 TLR 4/NF- κ B 信号转导途径来上调血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)的表达,从而增加氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)对内皮细胞的损伤,最终加速 AS 的进程^[2]。因此,本实验应用 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞,诱导 TLR4/NF- κ B 信号转导通路的激活,从而激活下游 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 等炎症因子,并用阿托伐他汀(ATV)进行干预,观察其对 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 表达的影响,探讨 ATV 的抗炎及防治 AS 的机制。

1 材料与方

1.1 试剂 胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物研究所;第 VIII 因子相关抗原购于北京中杉金桥生物技术有限公司产品;DMEM 培养基、胰蛋白酶为美国 GIBCO 公司产品;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和 LOX-1、ICAM-1 及 TNF- α 单克隆抗体和二抗为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定 参考人脐静脉内皮细胞的培养方法^[3],取健康婴儿新鲜脐带,在无菌条件下,用胰蛋白酶消化法分离人脐静脉内皮细胞并静止培养,用第 VIII 因子相关抗原免疫荧光染色鉴定人脐静脉内皮细胞。实验时采用第 2~5 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 °C、5% CO₂ 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,随机分为 3 组:即空白对照组、模型组、ATV(ATV)组,各组分用下列方法进行干预,(1)空白对照组:仅含 10% FBS 的 DMEM 培养液;(2)模型组:含 10% FBS 的 DMEM 培养液 + LPS(1 μ g/mL);(3)ATV 组:含 10% FBS 的 DMEM 培养液 + LPS(1 μ g/mL) + ATV(10 μ mol/L)。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 mRNA 的表达。扩增条件:94 °C 变性 5 min(94 °C 变性 1 min,60 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min) \times 55 个循环,72 °C 延伸 5 min。本实验以 GAPDH 为内参照。引物由大连宝生物工程有限公司合成。LOX-1 上游引物:5'-ATC CAT CAT CCC TCA AC-3',下游引物:5'-GAA

AGA AGC CAG ACA AA-3', 扩增片段为 142 bp; TNF- α 上游引物: 5'-CCA TGT CTT TCT ACC CTA ATC-3', 下游引物: 5'-AGC TGC TCT GTC GGA TGA GCA-3', 扩增片段为 157 bp; ICAM-1 上游引物: 5'-GTA GCA GCA GCA GTC ATA-3', 下游引物: 5'-CGG GAT AGT TTC AGG GAG-3', 扩增片段为 151 bp. GAPDH 上游引物: 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT AGC-3', 下游引物: 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC GAC-3', 扩增产物长度为 211 bp. 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算.

1.2.4 Western blot 收集人脐静脉内皮细胞后加入预冷的细胞裂解液, 收集蛋白, 用 BCA 法检测蛋白浓度. 每条泳道以 60 μ g 蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳, 然后转膜. 加入 1:200 的兔抗人 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 一抗稀释液, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 再加入过氧化物酶标记的羊抗兔二抗稀释液 (1:1000), 置室温 2 h 显色, 使用光密度分析软件处理分析.

1.3 统计学处理 数据均应用 SPSS15.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

结果见表 1、2 和图 1~3.

表 1 ATV 对人脐静脉内皮细胞 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

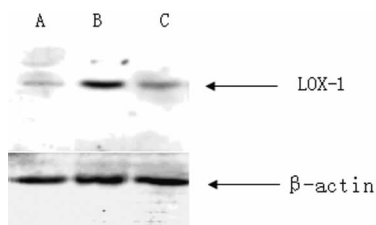
组别	LOX-1	TNF- α	ICAM-1
空白对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
模型组	2.94 \pm 0.48*	3.26 \pm 0.52*	2.91 \pm 0.54*
ATV 组	1.58 \pm 0.27 Δ	1.78 \pm 0.43 Δ	1.65 \pm 0.26 Δ

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

表 2 ATV 对人脐静脉内皮细胞 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

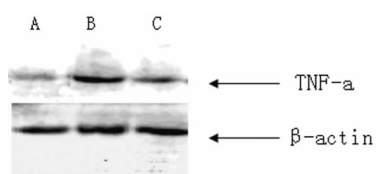
组别	LOX-1	TNF- α	ICAM-1
空白对照组	0.259 \pm 0.014	0.471 \pm 0.026	0.253 \pm 0.027
模型组	0.726 \pm 0.048*	0.971 \pm 0.066*	0.94 \pm 0.023*
ATV 组	0.437 \pm 0.072 Δ	0.607 \pm 0.034 Δ	0.415 \pm 0.008 Δ

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



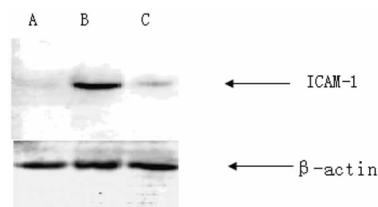
A: 为空白对照组; B: 为模型组; C: 为 ATV 组.

图 1 LOX-1 蛋白表达



A: 为空白对照组; B: 为模型组; C: 为 ATV 组.

图 2 TNF- α 蛋白表达



A: 为空白对照组; B: 为模型组; C: 为 ATV 组.

图 3 ICAM-1 蛋白表达

3 讨论

在 AS 的早期, 白细胞和单核细胞与血管内皮细胞的黏附、迁移是 AS 最重要的始动环节^[4]. 单核细胞与血管内皮细胞黏附、跨内皮迁移、内膜巨噬细胞聚集等多个环节均依赖于黏附分子 (如 ICAM-1) 的作用. ICAM-1 能促进免疫细胞浸润, 使单核细胞和淋巴细胞黏附于内皮, 然后迁移入内皮下, 单核细胞分化为巨噬细胞, 形成泡沫细胞进而促进 AS 的发生^[5]. 黏附分子的表达同时受转录因子 NF- κ B 的调节. 研究表明脂多糖可以通过内皮细胞中的 Toll 样受体 4 激活 NF- κ B, 上调 ICAM-1 等黏附分子, 参与单核细胞聚集, 启动进一步炎症反应. TNF- α 是促炎症反应的细胞因子, 能直接作用于血管内皮细胞, 最终导致血管内皮细胞损伤, 这可能也是 TNF- α 促进 AS 发生、发展的一个途径. 而且 TNF- α 还通过促进黏附分子的表达来促进白细胞、单核细胞、淋巴细胞等与血管内皮细胞的黏附及迁移, 加速 AS 的进程^[6]. ox-LDL 作为致 AS 的独立危险因素, 经 LOX-1 介导使内皮细胞活化, 形成正反馈促进脂质氧化, 诱导核转录因子如 NF- κ B 的活化, 从而引发促炎因子和黏附分子 (如: TNF- α 、ICAM-1) 的表达升高^[7]; LOX-1 本身也可作为内皮黏附分子, 促进 ox-LDL 和细胞聚集于血管壁, 进一步导致斑块的炎症反应, 增加斑块的不稳定性^[8].

目前, 在 AS 治疗方面, 主要以降血脂为主, 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. 他汀类药物是调脂治疗的一线药物, 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. 他汀类药物除有效降低血脂外, 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. 如今他汀类药物的非降脂效应尤其是抗炎作用越来越受到心血管及其相关领域专家的关注, 其抗炎效应被认为在降低心血管事件发生率上也扮演着极为重要的角色, 而且该效应可能独立于其降脂效应^[9].

本研究结果表明, 用 LPS 刺激 24 h 后, LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 基因和蛋白表达明显升高, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其可能机制是 LPS 通过 TLR4/NF- κ B 信号转导通路激活下游 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1. 用 ATV 干预之后, LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 的基因及蛋白表达明显下调, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 ATV 对 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 有明显的抑制作用. 通过抑制 LOX-1、TNF- α 及 ICAM-1 的表达, ATV 可减少单核细胞与血管内皮细胞黏附以及内皮细胞的损伤, 从而达到抗 AS 的作用. 这可能是其抗 AS 的作用机制之一.

(下转第 1712 页)

现明显变性、坏死表现。提示脂质体、反义核酸对于裸鼠是安全的,这可能由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织^[11-12],而 survivinASODN 治疗具有良好的靶向性、特异性,其对正常组织影响较小。

survivinASODN 处理宣威肺腺癌细胞裸鼠肺癌细胞 XWLC-05 移植瘤后,肿瘤的生长明显受到抑制,未出现明显不良反应,提示在宣威肺腺癌中采用反义核苷酸治疗是安全、可行的^[13-15],为下一步临床治疗提供了思路和实验室资料。

参考文献:

- [1] Wang WW, Li GF, Hong ZP. The effect of the expression of Survivin antioligonucleotide on the apoptosis of Xuanwei lung adenocarcinoma cell[J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2011, 10(5): 252-255.
- [2] 王巍炜, 李高峰, 洪志鹏, 等. 宣威昆明两地区肺腺癌中 survivin 表达的比较研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(7): 61-62.
- [3] Isaka T, Maruno M, Nakata H, et al. Effectiveness of spray application of ACNU in the local of malignant gliomas: report of two case[J]. Neurol Res, 2002, 22(2): 181-184.
- [4] 邓开, 王洪林. survivin 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(10): 1111-1113.
- [5] 刘敏, 李萍, 兰显国, 等. Survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2010, 39(10): 1231-1232.
- [6] Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1[J]. Physiology, 2009, 24(2): 97-106.
- [7] 李玉华, 宫向前, 邢建华, 等. Survivin 反义核酸对大肠癌 HT29 细胞化疗的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13

(21): 1620-1622.

- [8] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting Survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(5): 403-410.
- [9] 王志成, 王海霞, 郭德玉, 等. survivin 反义核酸抑制胶质瘤细胞增殖的实验研究[J]. 重庆医学, 2008, 37(22): 2570-2574.
- [10] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting Survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(5): 403-410.
- [11] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1): 127.
- [12] Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, et al. Survivin gene expression in early stage non small cell lung cancer[J]. J Pathol, 2003, 200(5): 620-626.
- [13] Lehner R, Bobak J, Kim NW, et al. Localization of telomerase protein and Survivin in placenta: relation to placental development and hydatidiform mole[J]. Obstet Gynecol, 2001, 97(6): 965-970.
- [14] 孙顶, 蔡建明, 祝宝让, 等. STAT3 反义寡核苷酸对人肺腺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(1): 76-79.
- [15] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural functional and therapeutic biology of Survivin[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2): 164-171.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-12-09)

(上接第 1709 页)

参考文献:

- [1] Hansson GK. Atherosclerosis an immune disease: The Anitschkov Lecture 2007[J]. Atherosclerosis, 2009, 202(1): 2-10.
- [2] 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.
- [3] 姜华, 张艳, 王辰. 益气活血复方对内皮细胞 ToLL 样受体 4 及其下游 MyD88、TRAF-6 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 519-522.
- [4] Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T cell adhesion to human aortic endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2002, 161(2): 365-374.
- [5] Papa A, Danese S, Kondeatis, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2004, 8(5): 187-191.

- [6] Meroni PL, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: Effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44: 2870-2878.
- [7] Reiss A B, Anwar K, Wirkowski P. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis: a brief review [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(21): 2641-2652.
- [8] Mehta JL, Chen J, Yu F, et al. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(2): 243-249.
- [9] Hoffmann R, Haager P, Suliman H, et al. Effect of statin therapy before Q-wave myocardial infarction on myocardial perfusion [J]. American J Cardiology, 2008, 101: 139-143.

(收稿日期: 2011-10-09 修回日期: 2011-11-22)