

· 论 著 ·

## 辛伐他汀对 ApoA5 表达的影响\*

李全忠, 王杨阳, 阳跃忠<sup>△</sup>, 夏中华, 孙 婧

(桂林医学院附属医院心血管内科, 广西桂林 541001)

**摘要:**目的 研究辛伐他汀在体外对载脂蛋白 A5(ApoA5)表达的调节,从而更好地理解辛伐他汀对血脂的影响。方法 以含不同浓度辛伐他汀(1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ )的培养液体外培养人肝癌细胞株 G2(HepG2)细胞 48 h,并以 0  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀作为对照组,提取各组细胞总 RNA 和蛋白质,分别采用聚合酶链反应(PCR)和蛋白质印迹法(Western Blot)检测 ApoA5 的 mRNA 和蛋白的表达。结果 随着辛伐他汀浓度的不断增加,ApoA5 的表达也不断增强( $P < 0.05$ ),直至辛伐他汀浓度达到 25  $\mu\text{mol/L}$  时,ApoA5 的表达达到最大限度,再增加辛伐他汀的浓度时(50  $\mu\text{mol/L}$ ),ApoA5 表达不再增强,反而较前一浓度(25  $\mu\text{mol/L}$ )时的表达有所下降( $P < 0.05$ ),表明辛伐他汀呈剂量依赖性上调 ApoA5 基因和蛋白的表达,但存在着一个最高上限浓度。结论 辛伐他汀上调 ApoA5 基因和蛋白的表达。

**关键词:**辛伐他汀;载脂蛋白 A5;人肝癌细胞株 G2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0376-03

## The influence of simvastatin on ApoA5 expression\*

Li Quanzhong, Wang Yangyang, Yang Yuezhong<sup>△</sup>, Xia Zhonghua, Sun Jing

(Department of Vasculocardiology, Affiliated Hospital, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

**Abstract:** Objective To investigate the regulation of simvastatin on the expression of ApoA5 in vitro, and detect the influence of simvastatin on lipids. **Methods** HEPG2 cells were cultured with solution containing simvastatin of different concentrations(1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 hours, with 0  $\mu\text{mol/L}$  simvastatin as blank control group. Total RNA and protein from each group of cells were collected. PCR and Western Blot were used to detect the expression of apolipoprotein A5 mRNA and protein. **Results** The expression of ApoA5 increased along with the increase of the concentration of simvastatin (1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) until the concentration reached 25  $\mu\text{mol/L}$ , when the expression of ApoA5 was the maximum. Then as the concentration of simvastatin continued to increase (50  $\mu\text{mol/L}$ ), there was no more increase in the expression of ApoA5. On the contrary, the expression of ApoA5 declined compared with the former one concentration(25  $\mu\text{mol/L}$ ) ( $P < 0.05$ ). It proved that there was an influence of dose-dependent up-regulation of simvastatin on the expression of ApoA5 and protein, and there was a maximum concentration. **Conclusion** Simvastatin raised the expression of genes and proteins of apolipoprotein A5 in hepatic cell line.

**Key words:** simvastatin; apolipoprotein A5; human hepatic cancer cell line G2

血脂的高低与冠心病的发生率和死亡率直接相关。血浆高密度脂蛋白(HDL)水平与动脉粥样硬化性心血管疾病的发病率呈负相关。血浆三酰甘油(TG)浓度升高也被证实是冠心病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。目前临床上应特别重视血浆总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高,同时也应关注高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)低下和 TG 升高。

载脂蛋白 A5(apolipoprotein A5, ApoA5)是迄今为止第一个过度表达引起血浆 TG 下降的载脂蛋白。与相同剂量的洛伐他汀、普伐他汀、氟伐他汀等其他  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲戊二酸单酰辅酶 a(HMG-CoA)还原酶抑制剂相比,辛伐他汀可以更有效地降低血清中的 TC 和 LDL-C<sup>[2]</sup>。除此之外,辛伐他汀升高 HDL-C 及降低 TG 的总有效率分别为 48.1% 及 58.2%<sup>[3]</sup>。结合 ApoA5 与 HDL-C 正相关且血清中 TG 增高和 ApoA5 下降有一定关系的研究结果,推测辛伐他汀可能通过影响 ApoA5 的表达从而起到升高 HDL-C 及降低 TG 的作用。作者以人肝癌细胞株 G2(human hepatic cancer cell line G2, HepG2)为模型,观察辛伐他汀对 ApoA5 的影响,从而更好地阐述辛伐他汀对血脂代谢影响的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** (1)细胞: HepG2 由桂林医学院实验中心提供; (2)试剂:辛伐他汀原药粉、兔抗人载脂蛋白 A5 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 均购自美国 Sigma 公司,胎牛血清、细胞培养基(DMEM)均购自美国 Gibco 公司,聚合酶链式反应(PCR)试剂盒购自上海易利生物科技有限公司; (3)主要仪器:CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Precision 公司,超净工作台购自江苏苏净集团安康公司,德国 Eppendorf 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,北京六一电泳仪购自北京沃德生物医学仪器公司,捷达 801 凝胶成像分析系统购自江苏省捷达科技发展有限公司,ABI9700 基因扩增仪购自上海天呈科技有限公司,达晖 DHB-30 恒温金属浴购自广州达晖生物技术有限公司。

**1.2 细胞的培养** HepG2 细胞培养于 DMEM(含 12% 胎牛血清、100  $\mu\text{g/mL}$  青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素)。细胞种在 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱,每隔 2 d 换液一次,视细胞生长状态扩大培养,然后取对数生长期的细胞,在细胞计数板上计数后将其接种到 6 孔培养板(接种细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/孔,每孔 3 mL 培养液),待细胞融合生长到

\* 基金项目:广西医疗卫生重点科研课题资助项目(重 200979);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目[教外司留(2010)1174 号];广西自然科学基金资助项目(桂科回 0832023);2009 年广西教育厅科研资助项目(200911LX293);2009 年度留学回国人员科技活动资助项目(200914)。作者简介:李全忠(1968~),副主任医师,副教授,博士,主要从事冠心病、血脂代谢异常的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel:13607737890; E-mail: yyzmail@163.com。

50%~70%。开始实验前,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 2 次,然后加入含有不同浓度(0、1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ )辛伐他汀的 DMEM,3 毫升/孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h。收集 HepG2 细胞,分别吸取每孔培养液平均分配至两个 1.5 mL 离心管中,冻存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。吸弃剩余的培養液。然后每孔加入细胞裂解液 500  $\mu\text{L}$ ,室温放置 5 min 后转移到 1.5 mL 离心管中,冻存于 -80  $^{\circ}\text{C}$ ,备用。

**1.3 PCR 检测** 根据 Trizol 总 RNA 提取试剂盒中的说明书提取细胞内 RNA,合成 cDNA,然后用 ABI9700 基因扩增仪扩增 cDNA,ApoA5 与作为内参的磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物序列为:ApoA5 引物序列:上游 5'-AGC AGA TAA TGG CAA GCA TGG CTG C-3';下游 5'-GCA GCC ATG CTT GCC ATT ATC TGC T-3'。产物大小为 280 bp。为保证各 RNA 样本量的均一性,采用 GAPDH 作为内参。GAPDH 引物序列:上游 5'-AAC GTG TCA GTG GTG GAC CT-3';下游 5'-AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG-3'。产物大小为 400 bp。PCR 产物加载药缓冲液混匀,2% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min。用捷达 801 凝胶成像分析系统中进行灰度扫描,目的基因 mRNA 表达量用每例标本目的基因的平均灰度值/同一标本 GAPDH 的平均灰度值来表示。

**1.4 蛋白质印迹法(Western Blot)检测** 在收集好的细胞中加入细胞裂解液裂解细胞,4  $^{\circ}\text{C}$  冰浴 10 min,15 000 r/min 离心 5 min,弃除沉淀,二辛可酸(BCA)法蛋白定量。取 50  $\mu\text{g}$  蛋白加入 2 倍浓度十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶加样缓冲液中,100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,立刻置于冰上备用。6% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转 PDVF 膜。置膜于 5% 脱脂奶粉。封闭缓冲液 1 h,室温缓慢摇动,按 1 : 500 加入 ApoA5 一抗,室温孵育 1 h,缓慢摇动,1 倍浓度洗涤缓冲液(TBST)洗膜 5 次,每次 5 min。按 1 : 4 000 加入辣根过氧化物酶标记(HRP)的二抗,室温孵育 1 h,缓慢摇动,1 倍浓度 TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。在暗室中与化学发光剂免疫印迹化学发光(ECL)反应,X 线胶片曝光显影,观察分析。

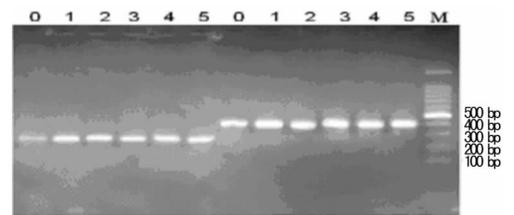
**1.5 统计学处理** 实验所得数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA 分析)来进行多组间比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 辛伐他汀对 HepG2 细胞 ApoA5 mRNA 表达的影响** 各组 ApoA5 分别为对照组 0.222  $\pm$  0.022、1  $\mu\text{mol/L}$  组 0.348  $\pm$  0.031、5  $\mu\text{mol/L}$  组 0.42  $\pm$  0.027、10  $\mu\text{mol/L}$  组 0.47  $\pm$  0.025、25  $\mu\text{mol/L}$  组 0.61  $\pm$  0.013、50  $\mu\text{mol/L}$  组 0.56  $\pm$  0.022。与对照组比较,不同浓度的辛伐他汀(1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ )组 ApoA5 mRNA 均显著上调,并且升高程度随辛伐他汀干预浓度的增加而增加( $P < 0.05$ )。各组间两两比较,其水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。至浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时,辛伐他汀对 ApoA5 mRNA 上调作用较 25  $\mu\text{mol/L}$  组反而有所下降,这说明辛伐他汀对 ApoA5 mRNA 的上调作用呈剂量依赖性,但却有最高上限浓度。见图 1。

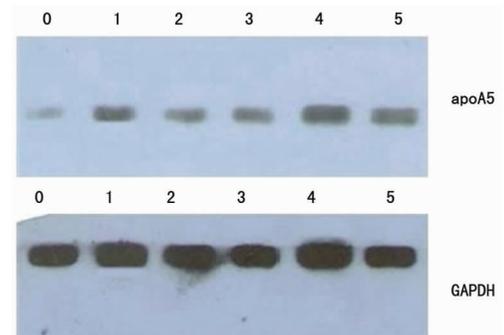
**2.2 辛伐他汀对 HepG2 细胞 ApoA5 蛋白表达的影响** Western Blot 检测 ApoA5 蛋白表达与对照组比较,不同浓度的辛伐他汀(1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ )组 ApoA5 蛋白表达亦显著上调,并且升高程度随辛伐他汀干预浓度的增加而增加( $P < 0.05$ );各组间两两比较,其水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ );当辛伐他汀浓度达 50  $\mu\text{mol/L}$  时,辛伐他汀对 ApoA5 mRNA 上调作用较 25  $\mu\text{mol/L}$  组反而有所下降,与 PCR 所得结果一致,再次证明辛伐他汀对 ApoA5 mRNA 的上调作用呈

剂量依赖性,但却有最高上限浓度这一观点。见图 2、3。



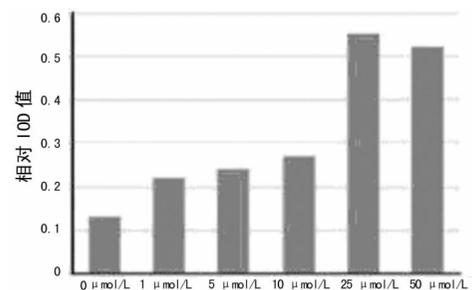
0:对照组;1:1  $\mu\text{mol/L}$  组;2:5  $\mu\text{mol/L}$  组;3:10  $\mu\text{mol/L}$  组;4:25  $\mu\text{mol/L}$  组;5:50  $\mu\text{mol/L}$  组。

**图 1 不同浓度的辛伐他汀作用后,用 PCR 法扩增的 ApoA5 mRNA 及 GAPDH 的表达**



0:对照组;1:1  $\mu\text{mol/L}$  组;2:5  $\mu\text{mol/L}$  组;3:10  $\mu\text{mol/L}$  组;4:25  $\mu\text{mol/L}$  组;5:50  $\mu\text{mol/L}$  组。

**图 2 不同浓度辛伐他汀作用后,Western Blot 检测 ApoA5 蛋白及 GAPDH 表达**



IOD:相对灰度。

**图 3 不同浓度辛伐他汀作用后,检测的各 ApoA5 蛋白相对 IOD 值**

**3 讨 论**

冠心病由于其发生率、死亡率均很高,一直是国内外医学研究的热点。目前研究认为,冠心病的发生、发展与多种遗传和环境因素有关<sup>[4]</sup>。而血脂异常是冠心病的主要独立危险因素。在形成动脉粥样硬化的各因素中,血脂代谢异常起着重要的作用,除高 TC 血症外,血清 TG 浓度升高在冠心病发生、发展中的作用也逐渐得到肯定,HDL 则是冠心病的保护因子,HDL-C 代表 HDL 中胆固醇的含量,在血脂中起的作用是参与胆固醇的逆转录,是一种抗动脉粥样硬化的血浆脂蛋白,是冠心病的保护因子。当 HDL-C 含量过低时,即使 TC 在合适水平,也会显著增加冠心病的危险。

Pennacchio 等<sup>[5]</sup>和 van der Vliet 等<sup>[6]</sup>通过比较小鼠与人的基因组 DNA 发现了一种新的载脂蛋白基因——ApoA5,它与已知的 ApoA1/C3/A4 基因簇相距约 30 kb。基因全长 1 889 bp,由 4 个外显子,3 个内含子构成,编码 366 个氨基酸<sup>[7]</sup>,主要分布在极低密度脂蛋白(VLDL)、HDL 和乳糜微粒中<sup>[8]</sup>。它能与血浆脂质结合,构成脂蛋白的主要成分,是决定脂蛋白结构、功能和代谢的核心组分,其结构和合成异常将影响血脂

代谢。有学者推测 ApoA5 可能具有脂质转运功能<sup>[9]</sup>,能清除组织中的脂质和抗动脉粥样硬化。在后续的实验中发现,ApoA5 主要影响血浆 TG 代谢,ApoA5 基因变异与血浆 TG 水平增高及家族性混合型高脂血症有关,血浆 ApoA5 浓度与 TG 浓度呈负相关,提示 ApoA5 有降 TG 的作用。带 ApoA5 腺病毒载体小鼠的血浆 TG 和 TC 浓度分别降低了 70% 和 40%,原因是 ApoA5 过度表达后极大地降低了 VLDL 的比例,从而降低 TG 水平,也使脂蛋白中的胆固醇减少,其中 HDL 中的胆固醇降低幅度最大,从而使血浆 TC 浓度降低<sup>[10]</sup>。在老年人群中,血清 ApoA5 水平与血清 TG 水平呈显著负相关,这也支持 ApoA5 是 TG 代谢的一个重要决定因素<sup>[11]</sup>。何成毓等<sup>[12]</sup>和 Grosskopf 等<sup>[13]</sup>的研究均显示,ApoA5 与 TG 呈负相关,与 HDL-C 呈正相关,多元回归分析显示,TG、HDL 与 ApoA5 有关。

辛伐他汀不仅可以有效地降低血清中的 TC 和 LDL-C,而且也有增高 HDL-C 及降低 TG 的作用,曾群英等<sup>[14]</sup>在一项关于辛伐他汀治疗 69 岁以上老年高脂血症患者的安全性及临床疗效的报道中指出,辛伐他汀治疗 24 周后 TC、TG、LDL-C 均较治疗前明显下降( $P < 0.01$ ),HDL-C 则较治疗前显著上升( $P < 0.01$ ),与安慰剂比较,辛伐他汀显著降低 TC、TG、LDL-C ( $P < 0.01$ ),显著升高 HDL-C 水平( $P < 0.01$ )。

李琰<sup>[15]</sup>调查 78 例患者经 16 周口服辛伐他汀治疗后,与治疗前相比,TG、TC、LDL-C 值均显著下降( $P < 0.05$ ),HDL-C 值显著上升( $P < 0.05$ )。

在本实验中,作者以不同浓度的辛伐他汀(1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ )作用于 HepG2 细胞,体外培养 48 h 后,以 PCR 和 Western Blot 法,于基因水平及蛋白水平分别检测 ApoA5,结果发现,随着辛伐他汀浓度的增加(1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ),ApoA5 的表达明显增加,通过单因素方差分析检验,各组间水平差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),通过实验所得 IOD 值,可以直观地看到当辛伐他汀达到一定浓度时(50  $\mu\text{mol/L}$ ),载脂蛋白的表达量反而较前一组(25  $\mu\text{mol/L}$ )有所下降,推测辛伐他汀上 ApoA5 的表达有一定的浓度上限,两种方法测量所得结果一致。由此推测辛伐他汀可通过上调 ApoA5 而达到影响血脂水平的作用,这为进一步研究辛伐他汀的调脂机制提供又一个新的思路,并为其提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

[1] Fruchart JC, Duriez P. HDL and triglyceride as therapeutic targets. [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13(6): 605-616.  
 [2] Plosker GL, Tavish D. Simvastatin: a reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia[J]. *Drugs*, 1995, 50(2): 334-363.  
 [3] 戚慧,戚晶,李广军,等. 氟伐他汀与辛伐他汀对冠心病患者调脂疗效的观察[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2005, 3

(4): 299-300.

[4] Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease; the framing-ham study[J]. *Am J Med*, 1984, 27(4): 4-6.  
 [5] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing[J]. *Science*, 2001, 294(5540): 169-173.  
 [6] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(48): 44512-44520.  
 [7] Pennacchio LA, Rubin EM. Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome[J]. *Clin Invest*, 2003, 111(8): 1099-1106.  
 [8] O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins[J]. *Clin Chem*, 2005, 51(2): 351-355.  
 [9] Endo K, Yanagi H, Araki J, et al. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren[J]. *Hum Genet*, 2002, 111(6): 570-572.  
 [10] van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295(5): 1156-1159.  
 [11] 孙秀芳,陈焕芹,李保应,等. 老年人载脂蛋白 A5 与血脂、脂蛋白及血糖的相关性[J]. *山东大学学报:医学版*, 2008, 46(7): 729-732.  
 [12] 何成毓,李洁琪. 血清载脂蛋白 A5 与冠心病的关系[J]. *临床心血管病杂志*, 2008, 24(12): 948-949.  
 [13] Grosskopf I, Baroukh N, Lee SJ, et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(12): 2573-2579.  
 [14] 曾群英,麦炜颐. 辛伐他汀治疗 69 岁以上老年高脂血症患者的安全性及临床疗效[J]. *新医学*, 2002, 33(4): 209-210.  
 [15] 李琰. 辛伐他汀对高脂血症患者疗效及安全性的观察[J]. *中国临床实用医学*, 2010, 4(9): 162-163.

(收稿日期: 2012-09-03 修回日期: 2012-10-05)

(上接第 375 页)

factor kappa B-regulated signaling in rat hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2009, 49(3): 887-889.  
 [12] Son G, Iimuro Y, Seki E, et al. Selective inactivation of NF- $\kappa$ B in the liver using NF- $\kappa$ B decoy suppresses CCL4-induced liver injury and fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(3): G631-G639.  
 [13] 吴义春,吴强,杨雁,等. 肝组织中 NF- $\kappa$ B、TGF- $\beta$ 1 及其 I

型受体 mRNA 和 HSC 在肝纤维化中的改变及护肝片对其的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2011, 20(3): 212-219.

[14] 宋维芳,徐军全,许瑞玲,等. 核转录因子- $\kappa$ B 在实验性肝纤维化中的表达、分布及意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(1): 12-16.

(收稿日期: 2012-09-11 修回日期: 2012-10-13)