

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.30.019

辛伐他汀对高糖损伤血管内皮细胞的保护作用研究

李 华,李玉东,杨守忠  
(河南省南阳市中心医院心内一科 473009)

**摘 要:****目的** 观察辛伐他汀对高糖损伤血管内皮细胞的保护作用,并探讨其作用的机制。**方法** 实验分为 4 组:对照组(健康体检者,A 组),高血糖组(B 组,33.3 mmol/L 葡萄糖),高血糖+低浓度辛伐他汀组(C 组,33.3 mmol/L 葡萄糖+1.0 μmol/L 辛伐他汀),高血糖+高浓度辛伐他汀组(D 组,33.3mmol/L 葡萄糖+10.0 μmol/L 辛伐他汀)。细胞增殖使用 CCK-8 实验检测,细胞凋亡使用 TUNEL 检测法,蛋白表达使用 Western blot 方法检测,基因检测采用实时荧光定量 PCR(real time PCR)。**结果** B、C、D 组的内皮细胞存活率分别为(42.5±6.4)%、(58.6±7.8)%和(71.3±11.7)%,各组之间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。A、B、C、D 组内皮细胞的凋亡率分别为(1.8±0.6)%、(45.8±8.9)%、(22.7±6.4)%和(12.6±4.2)%,各组之间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。B 组(0.13±0.03)内皮细胞 Bcl-2 蛋白的表达明显低于 A 组(1.02±0.16),C 组(0.28±0.04)明显高于 B 组,D 组(0.68±0.11)又明显高于 C 组( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。B 组内皮细胞 bax 基因的表达明显高于 A 组,C 组明显低于 B 组,D 组又明显低于 C 组( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。**结论** 辛伐他汀可以明显抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡,上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 bax 基因表达可能是其主要的作用机制。

**关键词:**辛伐他汀;糖尿病;内皮血管;细胞凋亡  
中图分类号:R541.4      文献标识码:A      文章编号:1671-8348(2014)30-4037-03

The effect of simvastatin on high glucose induced vascular endothelial cells injury  
Li Hua ,Li Yudong ,Yang Shouzhong  
(Department of Cardiology ,the Central Hospital of Nanyang city ,Nanyang ,Henan 473009 ,China)

**Abstract:****Objective** To study the effect of simvastatin on high glucose induced vascular endothelial cells injury and explore its action mechanism. **Methods** Endothelial cells were devided into four group:control group(A),high glucose(33.3 mmol/L)group(B),high glucose(33.3 mmol/L)+simvastatin(1.0 μmol/L)group(C),and high glucose(33.3 mmol/L)+simvastatin(10.0 μmol/L)group(D). The inhibition of cells was detected by CCK-8 assay. The apoptosis was determined by TUNEL assay. The protein expression was detected by Western blot analysis. **Results** The cells survival rates were (42.5±6.4%), (58.6±7.8%), and (71.3±11.7%) in B,C, and D group respectively. There was significant difference among the three groups( $P<0.05$ ). The percents of apoptosis were (1.8±0.6%), (45.8±8.9%), (22.7±6.4%) and (12.6±4.2%) in A,B,C and D group, respectively. There was significant difference among the four groups( $P<0.05$ ). The protein expression of Bcl-2 was lower in B group(0.13±0.03)than that in A group(1.02±0.16). The Bcl-2 expression was higher in C group(0.28±0.04)than that in B group, and in D group(0.68±0.11)than that in C group( $P<0.05$ , $P<0.01$ ). The gene expression of bax was higher in B group than that in A group. The bax expression was lower in C group than that in B group, and the bax expression was lower in D group than that in C groups( $P<0.05$ , $P<0.01$ ). **Conclusion** Simvastatin can inhibit high glucose induced vascular endothelial cells apoptosis. Upregulation of Bcl-2 and downregulation of bax may be its action mechanism.

**Key words:**simvastatin;diabetes;vascular endothelial;apoptosis

糖尿病(diabetes)是一种常见的老年慢性疾病,人群发病率为 3%~5%,糖尿病患者血糖的异常会诱发一系列的并发症,例如大血管及微血管损害导致的心血管系统的并发症<sup>[1]</sup>,血管内皮细胞是一层连续被覆在全身血管内膜的细胞群,对于维持血管的正常生理功能起到重要的作用<sup>[2]</sup>。实验研究已经显示了高糖可以促进血管内皮细胞的凋亡,导致血管内皮细胞功能紊乱,成为诱发血管并发症的始动和加重因素<sup>[3]</sup>。他汀类药物是新一代的调脂药,通过选择性、竞争性的抑制羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶,来抑制胆固醇的合成,主要用于临床降脂治疗,预防心脑血管疾病的发生,但近期的研究显示他汀类药物还具有保护血管内皮的功能<sup>[4]</sup>。因此本研究观察了辛伐他汀对高糖损伤血管内皮细胞的保护作用,并探讨其相关的作用机制,为糖尿病心血管并发症的防止提供新的治

疗思路。

**1 材料与方法**

**1.1 试剂和仪器** 人脐静脉内皮细胞购自上海信然生物科技有限公司,辛伐他汀和葡萄糖购自美国 Merk 公司,DMEM 低糖培养基购自 Promega 公司,CCK-8 细胞增殖试剂盒购自美国分子探针公司,TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购自联科生物科技有限公司,Bcl-2 和 GAPDH 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。细胞培养箱为美国热电技术公司产品,全自动生化分析仪为日立 HICTHI-7080,荧光显微镜为日本奥林帕斯公司产品。

**1.2 实验分组** 对照组(健康体检者,A 组),高血糖组(B 组,33.3 mmol/L 葡萄糖),高血糖+低浓度辛伐他汀组(C 组,33.3 mmol/L 葡萄糖+1.0 μmol/L 辛伐他汀),高血糖+高浓度辛伐他汀组(D 组,33.3 mmol/L 葡萄糖+10.0 μmol/L 辛

伐他汀)。

**1.3 内皮细胞增殖的检测** 将人脐静脉内皮细胞接种到 96 孔板,每孔 3 000 个细胞,培养于 DMEM 低糖培养液,按照 A、B、C、D 分组加如相应的试剂,每个分组 4 个复孔,5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养箱培养 48 h,每孔加入 20 μL CCK-8,全自动生化分析仪 540 nm 波长处测定吸光度值的变化。细胞存活率=B、C、D 各组的吸光度值/A 组的吸光度值×100%。

**1.4 内皮细胞凋亡的检测** 将人脐静脉内皮细胞接种到 6 孔板,培养于 DMEM 低糖培养液,制备细胞爬片,按照 A、B、C、D 分组加入相应的试剂,每个分组 4 个复孔,5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养箱培养 48 h,细胞凋亡的检测使用原位末端标记法(TUNEL),严格按照试剂盒说明书操作,培养结束后各组细胞爬片 4% 的多聚甲醛固定,TdT 酶和荧光素标记的 dUTP 37℃ 孵育 45 min,4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色 10 min,荧光显微镜下计数凋亡的细胞个数,凋亡细胞的百分比=凋亡细胞/所有细胞×100%,每张爬片选取 5 个视野,计算各组的平均凋亡率。

**1.5 Bcl-2 蛋白表达的检测** 将人脐静脉内皮细胞接种到 6 孔板,培养于 DMEM 低糖培养液,按照 A、B、C、D 分组加入相应的试剂,每个分组 4 个复孔,5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养箱培养 48 h。Bcl-2 蛋白表达的检测使用蛋白免疫印记(Western blot)方法,培养结束后收集细胞,加入 100 μL 细胞裂解液,提

取总蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶电泳,电转移蛋白至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,按照抗体说明书加入特异性的 Bcl-2 一抗和 HRP 标记的二抗,分别孵育 8 h 和 2 h,电泳条带使用化学发光和 X 线曝光显示。

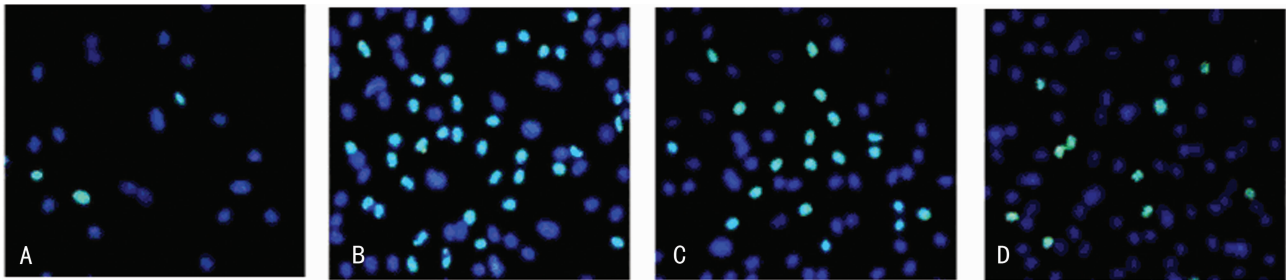
**1.6 bax 基因表达的检测** bax 基因表达的检测使用实时荧光定量 PCR(real time-PCR)检测,检测试剂盒购自大连宝生物科技有限公司,严格按照试剂盒说明书操作。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS12.0 统计软件处理数据,实验数据计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析,以 *P* < 0.05 为差异统计学意义。

2 结 果

**2.1 辛伐他汀对高糖抑制内皮细胞增殖的保护作用** 与 A 组对照计算出的 B、C、D 组的细胞存活率分别为(42.5 ± 6.4)%、(58.6 ± 7.8)%和(71.3 ± 11.7)%,各组间差异有统计学意义(*P* < 0.05)。其中 C 组内皮细胞存活率明显高于 B 组(*P* < 0.01),D 组又明显高于 C 组(*P* < 0.05)。

**2.2 辛伐他汀对高糖诱导的内皮细胞凋亡的抑制作用** A、B、C、D 组内皮细胞的凋亡率分别为(1.8 ± 0.6)%、(45.8 ± 8.9)%、(22.7 ± 6.4)%和(12.6 ± 4.2)%,各组之间具有明显性差异有统计学意义(*P* < 0.05)。其中 C 组内皮细胞存活率明显低于 B 组(*P* < 0.01),D 组又明显低于 C 组(*P* < 0.05),见图 1。



A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组

图 1 内皮细胞凋亡的 TUNEL 检测(×400)

**2.3 辛伐他汀对高糖下调内皮细胞 Bcl-2 蛋白的抑制作用** 从图 2 可见 B 组内皮细胞 Bcl-2 蛋白的表达明显低于 A 组,C 组明显高于 B 组,D 组又明显高于 C 组(*P* < 0.05, *P* < 0.01),见图 2。

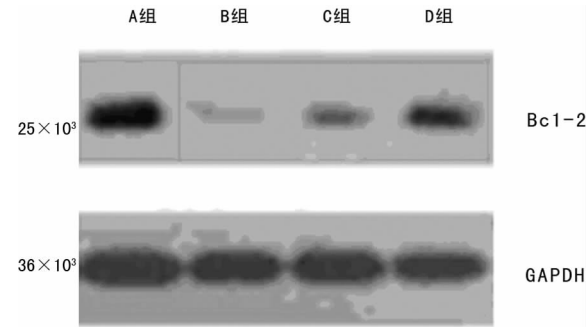


图 2 Bcl-2 蛋白表达的 Western blot 检测

**2.4 辛伐他汀对高糖上调了内皮细胞 bax 基因的表达** A、B、C、D 组内皮细胞 bax 基因的表达分别为 0.141 ± 0.026、0.448 ± 0.116、0.337 ± 0.081 和 0.201 ± 0.032,各组之间差异有统计学意义(*P* < 0.05),其中 B 组内皮细胞 bax 基因的表达明显高于 A 组,C 组明显低于 B 组,D 组又明显低于 C 组(*P* <

0.05, *P* < 0.01)。

3 讨 论

越来越多的证据表明,血管的损伤在糖尿病并发症中起重要作用,慢性高血糖症和炎症因子引起血管内皮细胞损伤、功能紊乱和细胞凋亡,从而导致血管病变,是糖尿病心脑血管疾病的病理生理基础<sup>[5]</sup>。他汀类药物具有诸多不依赖于调脂作用的心血管保护作用已被大多数的实验所证实<sup>[6]</sup>,目前他汀类药物已用于冠心病的一、二级预防,并且已成为冠心病的常规用药<sup>[7]</sup>,实验研究显示他汀类药物可以促进血管的新生,而血管的新生必定有内皮细胞增殖、迁移过程的发生<sup>[8]</sup>,因此可以推测他汀类药物可以促进内皮细胞的增殖,本研究观察到在高糖的环境中内皮细胞的存活率明显低于对照组,加用辛伐他汀后内皮细胞的存活率得到明显的提高,而且加用高浓度辛伐他汀的细胞内皮细胞的存活率明显高于加用低浓度辛伐他汀的细胞,说明了辛伐他汀可以剂量依赖性的抑制高糖导致的内皮细胞死亡。进一步的凋亡检测也得到了相一致的结果,说明了高糖环境中内皮细胞主要是通过凋亡途径死亡,而辛伐他汀可以剂量依赖性的抑制高糖导致的内皮细胞凋亡。

细胞的凋亡受到多种因素的影响,Bcl-2 蛋白是凋亡抑制蛋白家族的成员,其可以与一些因子结合抑制凋亡终末效应酶

Caspase-3 等的活性,阻止细胞的凋亡<sup>[9]</sup>,本研究发现高糖的环境中内皮细胞 Bcl-2 蛋白的表达较对照组明显降低,Bcl-2 表达下调,抗凋亡能力下降,细胞凋亡增加,但是加用辛伐他汀后高糖诱导的 Bcl-2 表达下调得到了有效的抑制,这样细胞的凋亡也相应地减少。bax 基因是一个促凋亡基因,本研究显示辛伐他汀可以抑制高糖诱导的 bax 基因表达上调,说明了辛伐他汀是通过上调 Bcl-2 蛋白和下调 bax 基因表达来阻止内皮细胞凋亡的,其具体的作用机制还有待进一步的研究。但是也有研究显示辛伐他汀可以激活 JNK 信号通路,而 JNK 信号通路的激活可以磷酸化 Bcl-2,阻止 Bcl-2 的降解<sup>[10]</sup>,这也可能是辛伐他汀抑制高糖下调 Bcl-2 表达的机制。

综上所述,本研究显示了辛伐他汀可以明显抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡,上调 Bcl-2 蛋白表达可能是其主要的作用机制。

参考文献:

[1] Hilbert T,Poth J,Frede S,et al. Anti-atherogenic effects of statins;impact on angiopoietin-2 release from endothelial cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86 (10): 1452-1460.

[2] 王法斌,李京波,朱伟,等.瑞舒伐他汀对高糖导致的血管形成障碍的影响[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2013, 33(1):19-24.

[3] Qi XF,Li YJ,Chen ZY,et al. Involvement of the FoxO3a pathway in the ischemia/reperfusion injury of cardiac mi-

crovascular endothelial cells[J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 95 (2):242-247.

[4] 廖清池.他汀类药物与血管新生研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2013, 34(2):276-279.

[5] Burgazli KM,Bui KL,Mericililer M,et al. The effects of different types of statins on proliferation and migration of HGF-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVECs)[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(21):2874-2883.

[6] 程向阳.阿托伐他汀对高血压合并高血脂患者血管内皮功能的干预作用[J]. *临床医学*, 2013, 33(6):12-14.

[7] 庞宇,谭毅.他汀类药物治疗急性脑梗死作用机制的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2013, 6(8):818-821,822.

[8] Cheng WH,Ho WY,Chang CF,et al. Simvastatin induces a central hypotensive effect via Ras-mediated signalling to cause eNOS up-regulation[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170 (4):847-858.

[9] 杜岗,周丽,常青,李自成.辛伐他汀对血管内皮祖细胞复制性衰老的抑制作用及其机制[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2013, 39(5):913-918.

[10] Liu M,Yu Y,Jiang H,et al. Simvastatin suppresses vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice by downregulating the HMGB1-RAGE axis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(6):830-836.

(收稿日期:2014-06-15 修回日期:2014-07-29)

(上接第 4036 页)

[2] Cardot V,Chardon K,Tourneux P,et al. Ventilatory response to a hyperoxic test is related to the frequency of short apneic episodes in late preterm neonates[J]. *Pediatr Res*, 2007, 62(5):591-596.

[3] Netea MG,Brown GD,Kullberg BJ,et al. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(1):67-78.

[4] Plato A,Willment JA,Brown GD. C-type lectin-like receptors of the dectin-1 cluster:ligands and signaling pathways[J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(2):134-156.

[5] Kawai T,Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity[J]. *Immunity*, 2011, 34(5):637-650.

[6] Kaur R,Domergue R,Zupancic ML,et al. A yeast by any other Name;*Candida glabrata* and its interaction with the host[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(4):378-384.

[7] 陈青,李岷,唐荣才,等.白念珠菌磷脂甘露聚糖对单核细胞产生白介素-6、白介素-8 的影响[J]. *中国医学科学院学报*, 2011, 33(4):371-374.

[8] 林莉,王莉,周洋洋,等.白念珠菌支气管肺炎感染大鼠肺组织 Toll 样受体 2 和 IL-10 的表达及意义[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(3):224-227,240.

[9] Negrini Tde C,Ferreira LS,Alegranci P,et al. Role of TLR-2 and fungal surface antigens on innate immune re-

sponse against *Sporothrix schenckii*[J]. *Immunol Invest*, 2013, 42(1):36-48.

[10] Ifrim DC,Joosten LA,Kullberg BJ,et al. *Candida albicans* primes TLR cytokine responses through a Dectin-1/Raf-1-mediated pathway[J]. *J Immunol*, 2013, 190(8):4129-4135.

[11] Hontelez S,Sanecka A,Netea MG,et al. Molecular view on PRR cross-talk in antifungal immunity[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(4):467-474.

[12] Jan B,Tan W,Deng X,et al. Innate immunity and inflammation in sepsis:mechanisms by which acute ethanol exposure alters the course of sepsis and the effect to TLR4 signaling[J]. *Critical Care*, 2010, 14(Suppl 2):17-23.

[13] Guerrero AT,Cunha TM,Verri WA,et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice;participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(1):51-57.

[14] Jain SK,Rains J,Croad J,et al. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2):241-249.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-05-22)