

阿托伐他汀抵抗吸烟相关性血管内皮损伤的实验研究

郭 轶¹, 卢小刚^{1△}, 代远斌²

(1. 重庆市中医院普外科 400021; 2. 重庆医科大学附属第一医院血管外科 400016)

[摘要] **目的** 探讨阿托伐他汀对吸烟相关性血管内皮损伤的保护作用。**方法** 将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)分为对照组、香烟提取物处理组和阿托伐他汀联合香烟提取物处理组。观察不同组细胞的形态学变化,并检测不同组细胞中血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和 E-选择素(E-selectin)的蛋白表达。**结果** 香烟提取物处理组 HUVECs 的细胞形态发生了剧烈的变化,失去了基本形态;而阿托伐他汀联合香烟提取物处理组 HUVECs 的细胞形态仅发生了轻微的改变,保留了基本形态。同时 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在香烟提取物处理组细胞中表达明显高于对照组和阿托伐他汀联合香烟提取物处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$);VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在阿托伐他汀联合香烟提取物处理组细胞中的表达稍高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 阿托伐他汀可以抵抗吸烟导致的血管内皮损伤,具有血管内皮保护作用,可用于治疗吸烟相关性血管疾病。

[关键词] 血管细胞黏附分子-1;E-选择素;吸烟;阿托伐他汀;人脐静脉内皮细胞**[中图分类号]** R329.2+8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)19-2616-02

Investigation about atorvastatin resist to tobacco smoking inducing endothelial inflammation

Guo Yi¹, Lu Xiaogang^{1△}, Dai Yuanbin²

(1. Department of General Surgery, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China;

2. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of atorvastatin resist to tobacco smoking inducing endothelial inflammation. **Methods** HUVECs were divided into normal control group, cigarette smoking extract(CSE) group and atorvastatin(AS)+CSE group. The cellular morphology of HUVECs in three group were observed, then the expressions of VCAM-1 and E selectin in HUVECs in three group were detected by western blot assay. **Results** In CES group, drastic morphological change of HUVECs were observed. In AS+CSE group, minor morphological change of HUVECs were observed. Also, the protein levels of VCAM-1 and E selectin were much higher in CSE group than that of in other two groups($P < 0.05$), and the protein levels of VCAM-1 and E-selectin in AS+CSE group were a little higher than that of in control group, but much lower than that of in CSE group($P < 0.05$). **Conclusion** Our results showed that atorvastatin might partly resist to tobacco smoking inducing endothelial inflammation.

[Key words] vascular cell adhesion molecule-1; E-selectin; smoking; atorvastatin; human umbilical vein endothelial cells

许多研究指出吸烟与多种血管疾病密切相关^[1-2],并且吸烟相关性血管内皮炎症在血管疾病的发生发展过程中起非常重要的作用^[3-4]。因此,减少血管内皮炎症的药物可能在治疗吸烟导致的血管疾病中起重要作用。阿托伐他汀是一种广泛运用的降脂药物,有实验指出其有降低炎性反应的作用^[5]。本实验中,笔者检测重要的血管炎症因子在不同实验组中的蛋白表达,拟探讨阿托伐他汀对吸烟相关性血管内皮损伤的抵抗作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)购自中国科学院上海细胞研究所,采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。阿托伐他汀由美国辉瑞制药公司提供。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和 E-选择素(E-selectin)抗体(Santa Cruz), GAPDH(Gen Script 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 香烟提取物的制备 宏声牌香烟(重庆烟草工业有限责任公司生产)参照美国联邦委员会^[6]推荐的香烟烟雾标准采气速率,每 2 秒抽气 35 mL,间隔 58 s 抽气 1 次,直至靠近烟蒂 2.0~3.0 mm 处。连续抽取 5 支香烟,使香烟烟雾提取物的浓

度为 1 支/mL。以 5 mL DMEM 为吸收液,用 50 mL 注射器抽取。最后用 0.22 μL 孔径的滤膜过滤待用。

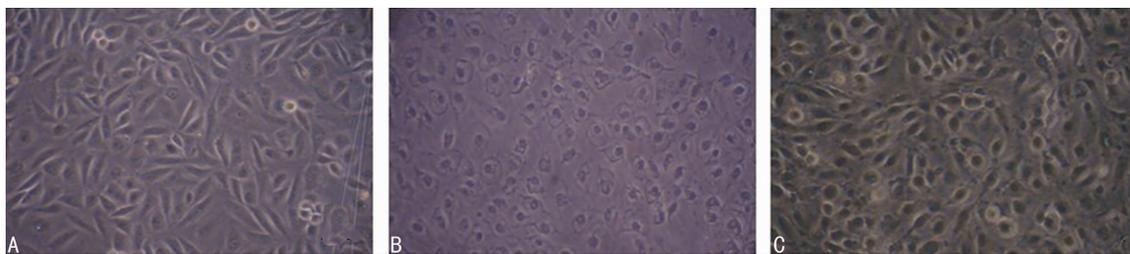
1.2.2 实验分组及处理 实验分为 3 组:对照组(NC 组)、香烟提取物处理(cigarette smoking extract, CES)组和阿托伐他汀联合香烟提取物处理(atorvastatin and cigarette smoking extract, AS+CES)组。NC 组为常规 HUVECs,进行常规培养,不接受任何处理;CES 组为常规 HUVECs,用 10% 的香烟提取物的培养基进行培养;AS+CES 组为常规 HUVECs,先用 10 μmol/L 的阿托伐他汀的培养基进行培养 4 h,再更换含 10% 的香烟提取物的培养基进行培养。所有细胞处理后培养 12 h,再用显微镜进行细胞形态学观察并收集细胞提取总蛋白进行蛋白检测。

1.2.3 Western blot 检测 收集转染前后的细胞,提取总蛋白。50 μg 蛋白裂解液经 12% 丙烯酰胺凝胶电泳后,行 PVDF 转膜,并用 5% BSA 封闭 1 h。封闭后的膜加 PDGF-B 一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜,次日用 HRP 标记的二抗孵育 1 h, ECL 显色曝光。GAPDH 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

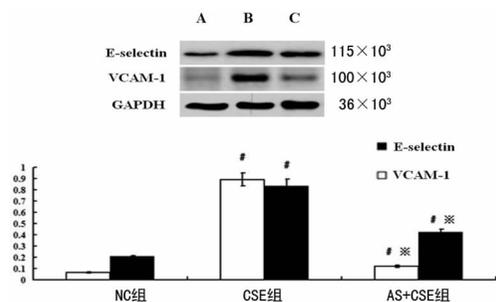
2.1 不同组 HUVECs 的形态观察 NC 组为正常的 HUVECs, 为长梭形, 核浆比正常。在 CES 组中, HUVECs 的细胞形态发生了剧烈的变化, 由长梭形变为了球形, 并有许多空泡



A: NC 组; B: CES 组; C: AS+CES 组。

图 1 显微镜观察不同组中 HUVECs 的细胞形态 (×200)

2.1 不同组 HUVECs 的 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白表达 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在 CES 组 HUVECs 中的表达 (0.901±0.036, 0.833±0.031) 明显高于 NC 组 (0.008±0.002, 0.189±0.002) 和 AS+CES 组 (0.176±0.005, 0.422±0.017), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。同时 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在 AS+CES 组 HUVECs 中的表达虽稍高于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 但 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在 AS+CES 组 HUVECs 中的表达却明显低于 CES 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2。



A: NC 组; B: CSE 组; C: AS+CSE 组。#: $P<0.05$, 与 NC 组比较; *: $P<0.05$, 与 CES 组比较。

图 2 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白在不同组 HUVECs 中的表达

3 讨 论

全球范围内, 吸烟导致的血管疾病的发病率及死亡率均呈现逐年增高的趋势^[7]。血管舒缩功能障碍、凝血及纤溶系统异常、脂质代谢异常、血管内皮细胞炎症、氧化应激等多种因素均参与了吸烟相关性血管疾病的发病; 其中血管内皮细胞炎症和氧化应激的作用尤为突出^[8]。虽然吸烟相关性血管疾病的发病机制尚未完全阐明, 但血管内皮细胞炎症已被广泛证实为导致吸烟相关性血管疾病发病的主要因素^[2]。阿托伐他汀是一种运用广泛的降血脂药物, 并且其被证实有明确的抗炎作用^[5,9]。因此, 笔者推断阿托伐他汀可以通过抑制血管内皮炎症进而抵抗吸烟相关性血管疾病的发生、发展。本实验采用阿托伐他汀作为血管内皮细胞保护剂, 对比使用阿托伐他汀组与常规组 HUVECs 的抗香烟提取物损伤能力, 进而探讨阿托伐他汀作为抵抗吸烟相关性血管疾病的应用价值。

本实验结果显示, CSE 组中 HUVECs 的形态发生了剧烈的变化, 出现了大量的细胞坏死。而 AS+CSE 组中 HUVECs 的形态仅发生了轻微的变化, 并且没有出现细胞坏死。证实阿

托伐他汀可以明显抵抗香烟诱发的血管内皮细胞损伤, 保护血管内皮功能。同时本实验中, 进一步检测了两种血管内皮细胞黏附因子 VCAM-1 和 E-selectin 的表达。结果发现, CSE 组 HUVECs 中的 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白的表达明显高于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 同时发现 AS+CSE 组 HUVECs 中的 VCAM-1 和 E-selectin 蛋白的表达虽稍高于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但却明显低于 CSE 组。VCAM-1 是重要的免疫球蛋白超家族成员之一, 是一种重要的细胞黏附分子, 广泛表达在活化内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞等表面, 其生物学作用十分广泛。其最主要的作用为诱导细胞黏附, 血管内皮细胞中 VCAM-1 的高表达可诱导白细胞和炎症因子的黏附进而促进血管内皮炎症^[10-11]。E-selectin 是选择素家族中的主要成员之一, 其主要表达于内皮细胞, 当内皮细胞活化后可合成 E-selectin 并转运至细胞表面, 诱导白细胞黏附于血管内皮细胞进而导致血管内皮炎症^[12]。结果证实阿托伐他汀可以降低吸烟导致的血管内皮细胞相关炎症黏附分子的表达, 进而抵抗吸烟相关性血管炎的发生。

综上所述, 吸烟是诱发血管疾病的重要病因, 其不仅可以诱导血管内皮细胞的损伤, 还可以介导多种细胞黏附分子的高表达, 进而促进血管炎症。阿托伐他汀是常用的降脂药物, 实验结果显示阿托伐他汀可以保护血管内皮细胞抵抗吸烟相关性损伤, 并降低血管内皮细胞中相关细胞黏附分子的表达, 减少血管炎症, 值得临床推广。但阿托伐他汀抵抗吸烟相关性血管疾病的具体机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Perlstein TS, Lee RT. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2): 250-256.
- [2] Piazza G, Creager MA. Thromboangiitis obliterans [J]. *Circulation*, 2010, 121(16): 1858-1861.
- [3] Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(6): 539-552.
- [4] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135-1143.
- [5] Yin Z, Fang Y, Ren L, et al. Atorvastatin attenuates NF- κ B activation in trigeminal nucleus caudalis in a rat model of migraine [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 465(1): 61-65. (下转第 2620 页)

还原,且有研究表明无硝基咪唑的核心配基复合体具有更高的乏氧选择性。

而本研究中乏氧显像剂 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 在监测放疗后肿瘤内乏氧状态变化方面效果相近,但在腹部 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 全腹均见放射性浓集,而 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 仅见肾脏和膀胱显像,这可能与两种显像剂的排泄方式有关: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 主要通过肾脏排泄,而 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 主要由肝胆、肠道与肾脏排泄。因此,在腹部肿瘤显像方面 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 乏氧显像可能有更大的发展前途。

3.2 HIF-1 α 表达与肿瘤乏氧程度的相关性 HIF-1 α 是肿瘤组织在乏氧环境下对乏氧产生应答的最基本的调控因子,与肿瘤的发生、转移、治疗及预后密切相关^[10-12],反映肿瘤内乏氧状态的变化。研究显示,大部分肿瘤乏氧组织中都有不同程度的 HIF-1 α 表达,且其表达量乏氧程度的不同有明显的变化明显不同,乏氧程度越重,HIF-1 α 表达量越高^[13];HIF-1 α 表达量与肿瘤乏氧显像结果有很好的相关性^[14]。HIF-1 α 的乏氧特性可应用于分子靶向核医学领域以研制新型的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 HIF-1 α 相关分子探针探测肿瘤乏氧,也可应用于肿瘤放、化疗领域靶向治疗肿瘤,有待进一步研究。

本实验利用 HIF-1 α 免疫组织化学从组织学角度反映放疗后肿瘤内乏氧状态的变化,且 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 乏氧显像所示的肿瘤部位的乏氧状态的变化与 HIF-1 α 免疫组织化学结果相符,说明 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 乏氧显像能真实地反映肿瘤内组织乏氧状态的变化。

综上所述, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS、 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 肿瘤乏氧显像均能真实地反映肿瘤内乏氧状态的变化,适用于肿瘤乏氧的检测及监测肿瘤放疗后其乏氧状态的变化,有望成为无创性检测肿瘤组织乏氧程度及范围最有效的手段,并为肿瘤分割照射时间的确定提供有力依据,尤其是在腹部肿瘤方面, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 有较大的优势,有可能成为 SPECT/CT 腹部肿瘤显像的乏氧显像剂,解决腹部肿瘤难以鉴别的难题,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Voss MJ, Niggemann B, Zanker KS, et al. Tumour reactions to hypoxia[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4):381-386.
- [2] 杨佳,王真真,岳金波,等. 放疗过程中肿瘤再增值及检测研究进展[J]. *中国肿瘤防治杂志*, 2014, 21(4):316-320.
- [3] 全安娜,汪延明. 功能影像技术在肿瘤乏氧评价方面的进展[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2011, 22(11):796-799.
- [4] 陈刚,王荣福,张春丽,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 乏氧显像在非小细胞肺癌放疗中的初步临床应用研究[J]. *中国医学影像技术*, 2007, 23(8):1233-1236.
- [5] Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, et al. Monitoring of response to radiation therapy for human tumor xenografts using $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldecan-2, 11-dione dioxime)[J]. *Ann Nucl Med*, 2003, 17(2):131-138.
- [6] 边艳珠,胡玉敬,吴大勇,等. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MNLS 乏氧显像评估肿瘤放疗后乏氧状态变化的实验研究[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2013, 33(5):367-371.
- [7] 蔡莉,张川,李彦生,等. 人脑胶质瘤 18F-FDG 摄取与乏氧诱导因子-1 α 表达及微血管密度的相关性[J]. *中华核医学杂志*, 2010, 30(1):10-14.
- [8] Chu TW, Li ZJ, Wang XY. Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2 NUBTA as a cerebral ischemia marker[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(3):658-661.
- [9] Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular imaging of hypoxia[J]. *Nucl Med*, 2008(49):129S-148S.
- [10] Guan Y, Reddy KR, Zhu Q, et al. G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1 alpha and HIF-2 alpha and block tumor growth[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(1):188-197.
- [11] 李巧,冉海涛,王志刚,等. 超声微泡联合 Ad-EGFP/HIF-1 α 介导 EPCs 归巢大鼠缺血心肌[J]. *中国医学影像技术*, 2010, 26(11):2030-2033.
- [12] Sandoel A, Koher I, Fellmann C, et al. HIF-1 antagonizes p53 mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase[J]. *Nature*, 2010, 465(7298):577-583.
- [13] Ding JY, Kreipke CW, Schafer P, et al. Synapse loss regulated by matrix metalloproteinases in traumatic brain injury is associated with hypoxia inducible factor-1alpha expression[J]. *Brain Res*, 2009(1268):125-134.
- [14] 田艳,李佳,丁重阳,等. ^{99}mTc -HL91 乏氧显像监测放疗后荷 H22 肝癌 KM 小鼠肿瘤再氧合状态[J]. *中国医学影像技术*, 2009, 25(4):559-561.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-03-10)

(上接第 2617 页)

- [6] Chepiga TA, Morton MJ, Murphy PA, et al. A comparison of the mainstream smoke chemistry and mutagenicity of a representative sample of the US cigarette market with two Kentucky reference cigarettes (K1R4F and K1R5F)[J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(10):949-962.
- [7] M Ezzati, SJ Henley, MiJ Thun, et al. Role of Smoking in Global and Regional Cardiovascular Mortality[J]. *Circulation*, 2005(112):489-497.
- [8] Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease; an update[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004(43):1731-1737.
- [9] Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan L, et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF- κ B and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is Inhibited by atorvastatin[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(22):15099-

15109.

- [10] Kowalski PS, Lintermans LL, Morselt HWM, et al. Anti-VCAM-1 and Anti-E-selectin SAINT-O-Somes for selective delivery of siRNA into inflammation-activated primary endothelial cells[J]. *Mol Pharm*, 2013, 10(8):3033-3044.
- [11] Bryant J, Ahern DJ, Brennan FM. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(7):2137-2146.
- [12] Tanigawa N, Hagiwara M, Tada H, et al. Acacetin inhibits expression of E-selectin on endothelial cells through regulation of the MAP kinase signaling pathway and activation of NF- κ B[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(4):471-477.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-02-26)