

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.007

MEK1/2 抑制剂 PD98059 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤的保护机制及对 LOX-1 表达影响*

孙 珊, 胡红玲, 段晓宇, 吴钦钦, 贺映侠, 卜晓芬, 明小燕, 严凤琴, 朱 虹[△]
(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院综合二科, 武汉 430022)

[摘要] 目的 探讨 MEK1/2 抑制剂 PD98059 对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤的保护机制及对低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)表达的影响。方法 使用 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤模型并进行 PD98059 处理,分阴性对照组、ox-LDL 组、阳性对照组和 PD98059+ox-LDL 组;检测抑制 MEK1/2 对 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤的影响。结果 与阴性对照组比较,ox-LDL 组 LOX-1、pMEK1/2、RhoA、ROCK1、ROCK2、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的释放增多,细胞增殖能力及培养液中一氧化氮(NO)水平降低($P<0.05$);与 ox-LDL 组比较,阳性对照组和 PD98059+ox-LDL 组 LOX-1、pMEK1/2、RhoA、ROCK1、ROCK2、TNF- α 和 IL-6 的释放减少,细胞增殖能力及 NO 水平增高($P<0.05$)。结论 PD98059 抑制 MEK1/2 信号通路可降低 HUVEC 中 LOX-1 的表达以减轻 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤。

[关键词] 脂蛋白类, LDL;受体, LDL;PD98059;MEK1/2;RhoA/ROCK

[中图分类号] R310.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1727-04

The protective mechanisms of MEK1/2 inhibitor PD98059 on ox-LDL induced injury of HUVEC and the influence on the expression of LOX-1*

SUN Shan, HU Hongling, DUAN Xiaoyu, WU Qinqin, HE Yingxia, BU Xiaofen, MING Xiaoyan, YAN Fengqin, ZHU Hong[△]

(Department of Second Integrated, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective mechanism of MEK1/2 inhibitor PD98059 on ox-LDL induced injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and its influence on the expression of LOX-1. **Methods** HUVEC damage models were established by using ox-LDL and were treated with PD98059 later, divided into the negative control group, the ox-LDL group, the positive control group and the PD98059+ox-LDL group. The effect of inhibition of MEK1/2 on ox-LDL induced HUVEC damage was measured. **Results**

Compared with the negative control group, the levels in the ox-LDL group of LOX-1, pMEK1/2, RhoA, ROCK1, ROCK2, TNF- α and IL-6 were increased significantly, the proliferations of HUVEC and the productions of NO were decreased ($P<0.05$). Compared with the ox-LDL group, the levels in the positive control group and the PD98059+ox-LDL group of pMEK1/2, RhoA, ROCK1, ROCK2, TNF- α and IL-6 were decreased, the proliferation of HUVEC and the production of NO were increased ($P<0.05$). **Conclusion** PD98059 inhibit the MEK1/2 signaling pathway to suppress the ox-LDL induced damage of HUVEC by decreasing the expression of LOX-1.

[Key words] lipoproteins, LDL; receptors, LDL; PD98059; MEK1/2; RhoA/ROCK

氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)对内皮细胞、平滑肌细胞等有毒性作用,能够破坏细胞完整性,损坏内皮细胞的屏障保护功能^[1-4]。低密度脂蛋白受体-1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)能够与 ox-LDL 特异性结合促进一系列信号通路的激活,诱导内皮细胞发生炎性损伤^[5]。干扰 LOX-1 的表达可以通过激活 RhoA/Rho 信号来抑制 ox-LDL 引起的内皮细胞损伤^[6]。在人脐静脉内皮细胞(human um-

bilical vein endothelial cells, HUVEC)中抑制 MEK1/2 信号通路可以显著降低脂多糖诱导的细胞损伤^[7-8]。本研究应用 ox-LDL 诱导 HUVEC 产生损伤,探究 PD98059 抑制 MEK1/2 信号通路是否可以通过调节 LOX-1 的表达以抑制 ox-LDL 对 HUVEC 产生的损伤,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 人 HUVEC 株购自美国典型菌种保藏中心(ATCC),DMEM 高糖培养基及胎牛血清

* 基金项目:湖北省武汉市卫生计生科研重点项目(WX16B06);湖北省武汉市中心医院博士基金(YB16A04)。 作者简介:孙珊(1987-),住院医师,博士,主要从事动脉粥样硬化研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhuhong99@21cn.com。

(fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 干粉和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司, MEK 抑制剂 PD98059 购自美国 Invivogon 公司, MEK1/2 抗体购自美国 Cell signaling technology 公司, LOX-1 抗体 (ab126538)、RhoA 抗体 (ab54835)、ROCK1 抗体 (ab45171) 和 ROCK2 抗体 (ab71598) 购自英国 Abcam 公司, RNA 提取试剂 Trizol 裂解液和反转试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 购自中国大连 Takara 生物公司, 蛋白浓度测定 BCA 试剂盒购自武汉 Bio-swamp 公司, RIPA 蛋白裂解试剂盒购自中国碧云天生物公司, 聚肌苷酸购自中国辰玺生物科技有限公司; 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒购自碧云天生物公司, ELISA 试剂盒购自武汉 Bio-swamp 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 HUVEC 培养于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中孵育; 然后使用 0.3% 的胰酶消化并进行传代培养, 以对数生长期细胞作为实验材料分为阴性对照组 (普通培养基培养)、ox-LDL 组 (培养基中加入终浓度为 50 μg/mL 的 ox-LDL)、阳性对照组 (培养基中加入终浓度为 250 μg/mL 的聚肌苷酸及终浓度为 50 μg/mL 的 ox-LDL) 和 PD98059+ox-LDL 组 (培养基中加入终浓度为 50 μmol/L PD98059 和终浓度为 50 μg/mL 的 ox-LDL), 所有细胞均培养 72 h。

1.2.2 反转录 PCR 检测 LOX-1 mRNA 水平 采用 Trizol 裂解液提取细胞 RNA, 并测定 RNA 的质量和浓度。取 1 μg RNA 使用反转录试剂盒进行 cDNA 合成。LOX-1 上游引物: 5'-ACT CTC CAT GCT GCT GCC TGG-3', 下游引物: 5'-CAT TCA GCT TCC GAA CAA GGG-3'; β-actin 上游引物: 5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC-3', 下游引物 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'。反转录 PCR 反应体系为 20 μL (2×SYBR Premix Ex Taq™ 9 μL, 模板 1 μL, 上游引物和下游引物各 0.5 μL, H₂O 9 μL), 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基将培养 24、48 和 72 h 后的 HUVEC 重悬成单个细胞悬液, 将细胞密度调整为 1×10⁴ 个/mL, 并将细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 4 h 后, 离心并去除上清液。每孔加入 100 μL DMSO, 充分震荡至使晶体充分溶解; 酶标仪检测波长为 490 nm 时各组的吸光度 (OD) 值, 并以时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 Western blot 检测 MEK1/2、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白水平 使用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗细胞 2 次并用细胞裂解液裂解。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。各组取等量蛋白 (30 μg) 进行十二烷

基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳, 随后将表达产物电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上室温环境反应 2 h; 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h 后在 4 °C 环境中加一抗孵育过夜; 用 PBS-Tween 洗涤 3 次, 加二抗室温孵育 1 h。以 β-actin 作为内参, 使用 Band-Scan5.0 软件进行图像的分析。

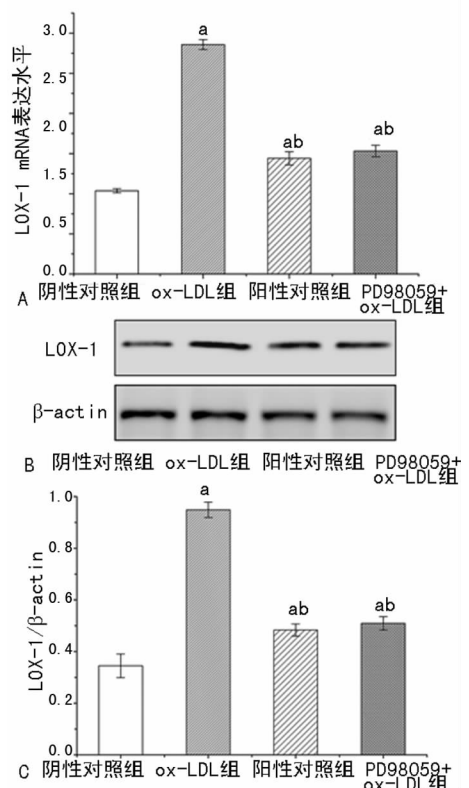
1.2.5 ELISA 检测细胞培养液中炎症因子肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平 收集各组细胞培养液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测培养液中的 TNF-α 和 IL-6 水平。

1.2.6 硝酸还原法检测细胞培养液中 NO 水平 收集细胞培养液, 严格按照试剂盒说明书进行 HUVEC 培养液中 NO 水平的检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 对数据进行方差齐性检测, 方差齐时使用 LSD 法, 方差不齐时选择 Dunnett T3 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HUVEC 中 LOX-1 表达的变化 ox-LDL 组 LOX-1 mRNA 表达水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 阳性对照组和 PD98059+ox-LDL 组 LOX-1 的 mRNA 水平与 ox-LDL 组比较显著降低 ($P < 0.05$)。使用 Western blot 进行 LOX-1 的蛋白表达分析, ox-LDL 组显著高于阴性对照组, 且 PD98059+ox-LDL 组的 LOX-1 蛋白水平显著低于 ox-LDL 组 ($P < 0.05$), 见图 1。



A: 各组 LOX-1 mRNA 表达情况; B: Western blot 结果; C: 各组 LOX-1 蛋白表达情况; a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较

图 1 各组 LOX-1 表达变化

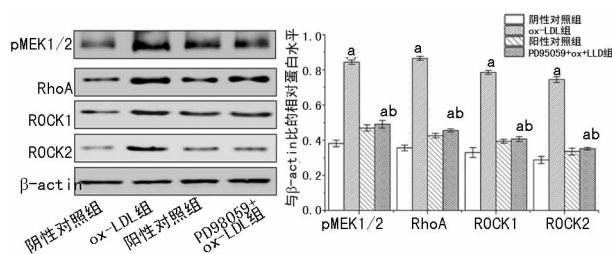
表 1 各组 HUVEC 增殖活性变化 ($\bar{x} \pm s, OD$ 值)

组别	24 h	48 h	72 h
阴性对照组	2.510 ± 0.024	2.750 ± 0.041	2.620 ± 0.057
ox-LDL 组	1.670 ± 0.024 ^a	1.750 ± 0.050 ^a	1.720 ± 0.018 ^a
阳性对照组	2.350 ± 0.020 ^{ab}	2.390 ± 0.013 ^{ab}	2.490 ± 0.033 ^{ab}
PD98059 + ox-LDL 组	2.270 ± 0.021 ^{ab}	2.300 ± 0.021 ^{ab}	2.420 ± 0.020 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较

2.2 各组 HUVEC 增殖能力变化 与阴性对照组比较, 各组增殖能力受到显著抑制 ($P < 0.05$)。与 ox-LDL 组比较, 阳性对照组和 PD98059 + ox-LDL 组增殖能力得到显著提高 ($P < 0.05$), 见表 1。

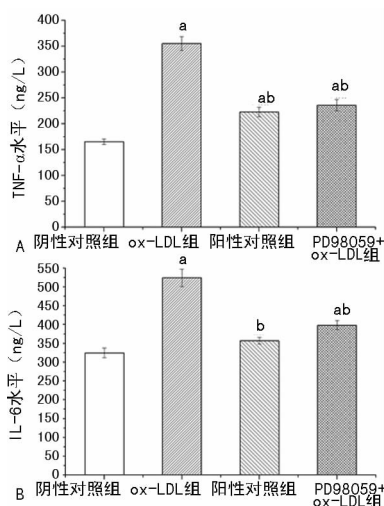
2.3 各组 HUVEC 中 MEK1/2、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达水平 与阴性对照组比较, ox-LDL 组 MEK1/2、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 阳性对照组和 PD98059 + ox-LDL 组中 MEK1/2、RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2。



^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较

图 2 各组信号通路相关蛋白的变化

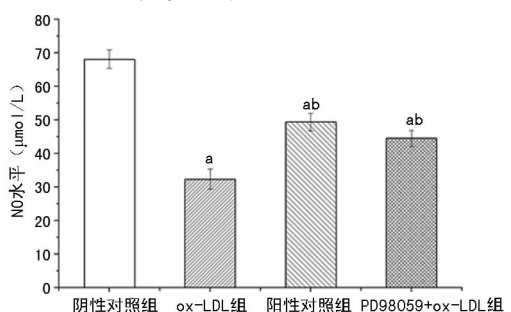
2.4 各组 HUVEC 中 TNF- α 和 IL-6 水平变化 与阴性对照组比较, ox-LDL 组 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 阳性对照组和 PD98059 + ox-LDL 组 HUVEC 中的 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3。



^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较

图 3 各组 TNF- α (A) 和 IL-6(B) 水平变化

2.5 各组 HUVEC 培养液中 NO 水平变化 与阴性对照组比较, ox-LDL 组 NO 水平显著下降 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 阳性对照组和 PD98059 + ox-LDL 组 NO 水平上升 ($P < 0.05$), 见图 4。



^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较

图 4 各组 NO 水平变化

3 讨论

LOX-1 是一种在内皮细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞中大量表达的 ox-LDL 受体, 属于 C 型凝集素家族 II 型膜蛋白^[9]。LOX-1 可以通过与 ox-LDL 特异性结合诱导内皮细胞分泌和释放大量细胞黏附分子, 促进单核细胞与活化的内皮细胞之间黏附和聚集, 这是诱发动脉粥样硬化的主要因素^[10-11]。本研究发现 ox-LDL 可以诱导 HUVEC 中 MEK1/2 和 RhoA/ROCK 信号通路活化, 促进炎症因子的释放^[12-13]。HUANG 等^[14]研究表明四甲基吡嗪可以通过抑制 ox-LDL 诱导的 MAPK 信号通路激活, 保护 ox-LDL 引起的内皮细胞损伤从而达到缓解动脉粥样硬化的发展。MAPK 是细胞内重要的信号传递和转导通路, 可以通过信号转导将细胞外刺激转移到细胞内, 在细胞的生长、分化和增殖中发挥重要调节作用^[14]。MEK1/2 是 MAPK 信号通路中的重要家族之一, 在细胞应激和炎症反应中具有重要作用^[15]。已有多项研究证明 PD98059 能够与 MEK1/2 的非活化形式特异性结合阻止其磷酸化的发生, 从而阻断 ERK1/2 信号转导^[16-17]。RhoA/Rho 激酶信号通路在内皮功能障碍、炎症、氧化应激、血管张力异常和血管重塑等多种血管疾病中具有重要作用^[6]。本研究发现抑制 MEK1/2 信号通路能够通过降低 LOX-1 的表达抑制 ox-LDL 诱导的 MEK1/2 和 RhoA/ROCK 信号通路激活。黄起壬等^[8]在探究脂多糖对 HU-

VEC 作用的研究中也证实抑制 MEK1/2 信号通路可以降低脂多糖诱导的 HUVEC 中 ICAM-1 的上升,从而抑制脂多糖诱导的 HUVEC 损伤。

NO 具有舒张血管的作用,可以通过抑制平滑肌细胞增殖及血小板的聚集,降低白细胞的黏附作用,具有减轻动脉粥样硬化的作用^[18]。研究表明氨氯地平可以抑制 ox-LDL 诱导的 NO 合酶下调,从而促进 NO 的合成,降低 ox-LDL 引起的内皮细胞损伤^[19]。本研究中抑制 MEK1/2 信号通路可以通过降低 NO 和炎症因子的释放抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤。姜华等^[20]研究中药对脂多糖诱导 HUVEC 中炎症因子表达,表明降低 HUVEC 中的 LOX-1 和 TNF- α 可以有效缓解 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤。

综上所述,本研究通过体外细胞实验证实 PD98059 抑制 MEK1/2 信号通路可以降低 ox-LDL 特异性受体 LOX-1 的表达,从而抑制 RhoA/ROCK 信号通路及降低炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的释放,促进 HUVEC 的增殖及 NO 的合成,从而抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞损伤,为临床治疗动脉粥样硬化提供理论基础。

参考文献

[1] XU L, WANG S, LI B, et al. A protective role of ciglitazone in ox-LDL-induced rat microvascular endothelial cells via modulating PPAR γ -dependent AMPK/eNOS pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(1): 92-102.

[2] CHEN X, PANG S, LIN J, et al. Allicin prevents oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cell injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress pathway [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 1-6.

[3] CHANA R S, WHEELER D C. Fibronectin augments monocyte adhesion to low-density lipoprotein-stimulated mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 1999, 55(1): 179-188.

[4] 何平平, 欧阳新平, 唐艳艳, 等. 甘油三酯水平升高与动脉粥样硬化性心血管疾病的联系的研究新进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(10): 951-954.

[5] 薛莉, 单江, 陈乃云, 等. 氧化型低密度脂蛋白诱导 LOX-1 在基因和蛋白水平表达 [J]. *科技通报*, 2004, 20(6): 552-559.

[6] 刘洪光, 陶贵周, 李俊, 等. RNA 干扰 LOX-1 表达对氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 891-896.

[7] NISHIMOTO S, NISHIDA E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2 [J]. *Embo Rep*, 2006, 7(8): 782-786.

[8] 黄起壬, 陈和平, 刘丹, 等. MEK1/2 在脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 表达中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(12): 2320-2323.

[9] 李萍, 盛志业, 马小峰, 等. LOX-1 在 ox-LDL 诱导人肾小球系膜细胞表达 TGF- β 1 中的作用 [J]. *沈阳部队医药*, 2006, 19(3): 160-172.

[10] SMIRNOVA I V, SAWAMURA T, GOLIGORSKY M S. Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287(1): 25-32.

[11] UJIHARA N, SAKKA Y, TAKEDA M, et al. Association between plasma oxidized low-density lipoprotein and diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002, 58(2): 109-114.

[12] ZHANG Y, MU Q, ZHOU Z, et al. Protective effect of irisin on atherosclerosis via suppressing oxidized low density lipoprotein induced vascular inflammation and endothelial dysfunction [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0158038.

[13] ZHANG Z, ZHANG D, DU B, et al. Hyperoside inhibits the effects induced by oxidized low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells via oxLDL-LOX-1-ERK pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 433(1): 169-176.

[14] HUANG W C, TU R S, CHEN Y L, et al. Conjugated linoleic acids suppress inflammatory response and ICAM-1 expression through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling in human bronchial epithelial cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7(4): 2025-2033.

[15] MISALE S, ARENA S, LAMBA S, et al. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra26.

[16] WU J, WONG W L, KHOSRAVI F, et al. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6461-6468.

[17] 郑继军, 王阁, 邓婧, 等. PD98059 对肝癌 HepG2 细胞 Tec 信号转导作用的初步研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(2): 136-139.

[18] 吴淳淳, 杜心清. 内皮型一氧化氮合酶与冠心病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(10): 1756-1758.

[19] 刘慧婷, 杨简, 童海, 等. 氨氯地平对 ox-LDL 致大鼠骨髓 EPCs 损伤的保护作用与上调一氧化氮合酶表达有关 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(2): 139-143.

[20] 姜华, 姜玉姬. 3 种中药复方血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子 LOX-1、TNF- α 、VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(10): 985-988.