

拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白损伤 血管内皮细胞的影响

陈临溪 余麟 廖端芳 李立新 朱炳阳

(衡阳医学院心肺药理研究室, 衡阳 421001)

Effects of Ramiprilat on Vascular Endothelial Cells Damage by Oxidized Low Density Lipoproteins

CHEN Lin-Xi, YU Lin, LIAO Duan-Fang, LI Li-Xin and ZHU Bing-Yang

(Department of Pharmacology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effects and mechanism of ramiprilat on *c-myc* expression induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in vascular endothelial cells.

Method After endothelial cells incubated with ox-LDL (250 mg/L), ox-LDL+ramiprilat (20 μ mol/L), ox-LDL+ramiprilat (40 μ mol/L)+N-Arg (100 μ mol/L), ox-LDL+N-Arg for 4 h *in vitro*. Reverse transcription PCR technique was employed to measure *c-myc* mRNA of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Nitric oxide (NO) and cGMP were assayed by means of Griess reaction and radioimmunoassay respectively.

Results In response to ox-LDL (250 mg/L) for 4 h, *c-myc* mRNA transcription of endothelial cells significantly increase ($P < 0.05$). In contrast, NO release and cGMP contents markedly decreased ($P < 0.05$).

Ramiprilat (20, 40 μ mol/L) inhibited ox-LDL-induced *c-myc* expression and increased NO, cGMP levels of HUVEC. The effects of ramiprilat was partly abolished by nitro-L-Arginine, a competitive inhibitor of NO synthetase.

Conclusion Ramiprilat suppresses ox-LDL-induced *c-myc* overexpression of endothelial cells by enhancing NO release.

KEY WORDS Ramiprilat; Low density lipoprotein; Endothelial cell; *c-myc*; Nitric oxide; cGMP

摘要 为探讨血管紧张素转化酶抑制剂拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞是否具有保护作用,采用反转录多聚酶链反应技术来观察拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白诱导培养的人脐静脉内皮细胞 *c-myc* mRNA 的影响,并用 Griess 法和放射免疫法分别测定拉米普利酸作用前后培养的脐静脉内皮细胞一氧化氮和 cGMP 的含量。结果发现,氧化型低密度脂蛋白促进人脐静脉内皮细胞 *c-myc* 表达 ($P < 0.05$),明显降低一氧化氮和 cGMP 含量 ($P < 0.05$)。拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞 *c-myc* 表达具有抑制作用,并能增加一氧化氮和 cGMP 水平。拉米普利酸的效应可被一氧化氮合成酶抑制剂硝基-L-左旋精氨酸部分取消。此结果提示拉米普利酸可促进一氧化氮释放而抑制氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞 *c-myc* 过度表达。

关键词 拉米普利酸; 低密度脂蛋白; 内皮细胞; *c-myc*; 一氧化氮; cGMP

氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, 氧化型 LDL)在发生动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)早期事件中起重要作用。其原因与损伤内皮细胞、促进单核细胞/巨噬细胞聚积过量脂质形成泡沫细胞等有关^[1]。*c-myc* 癌基因是早期反应基因,其过度表达与 As 斑块形成有关^[2~4]。

血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)已常规用

于高血压等治疗,近年证实 ACEI 可防治 As^[3,6],但机理不明。我们曾报道 ACEI 能保护内皮细胞免受氧自由基损伤^[7]。在此基础上本文研究 ACEI 拉米普利酸(ramiprilat, Ram)对氧化型 LDL 损伤人脐静脉内皮细胞后诱导的一氧化氮(nitric oxide, NO)、环一磷酸鸟苷(cGMP)和 *c-myc* 癌基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

参照文献[8]方法获取人脐静脉进行内皮细胞原代培养,用含 20% 胎牛血清 M199 培养至细胞基本融合时即开始实验。

1.2 氧化型低密度脂蛋白制备^[9]

取正常人新鲜血,加 0.2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA),离心取血浆,119 000 × g 超速离心,提取 LDL, PBS 4℃ 透析 24 h, 然后与 5 μmol/L 硫酸铜溶液 37℃ 孵育 24 h。

1.3 *c-myc* mRNA 提取和分析

人脐静脉内皮细胞在 6 孔培养板中培养。实验共分 6 组:第 1 组为对照组,仅加入 PBS;第 2 组为氧化型 LDL(250 mg/L);第 3 组为氧化型 LDL(250 mg/L) + 拉米普利酸(20 μmol/L);第 4 组为氧化型 LDL(250 mg/L) + 拉米普利酸(40 μmol/L);第 5 组为氧化型 LDL(250 mg/L) + 硝基-L-精氨酸(100 μmol/L);第 6 组为氧化型 LDL(250 mg/L) + 拉米普利酸(40 μmol/L) + 硝基-L-精氨酸(100 μmol/L)。第 3~6 组预先加入拉米普利酸或硝基 L-精氨酸孵育 10 min, 然后各组同步加入氧化型 LDL, 37℃, 共处理 4 h, 之后收集条件培养液用于测定 NO 和 cGMP。每孔加入 1 mL 溶液 D [4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 醋酸钠, pH 7.0, 0.1% (W/V) N-十二烷基肌氨酸钠, 0.1 mol/L β-巯基乙醇, 均为 sigma 公司产品], 裂解细胞, 然后转移至 Eppendorf 离心管, 再加入 1/10 体积 0.2 mol/L 醋酸钠, 0.2 体积氯仿/异戊醇混合液(49:1), 混匀, 0℃ 放 15 min 后离心, 水相加入等体积异丙醇, 在 -20℃ 沉淀。RNA 沉淀加 0.3 mL 溶液 D, 再加等体积异丙醇 -20℃ 再沉淀, 75% 乙醇洗, 真空干燥, 溶于 5 μL 0.5% SDS 内。再进行 *c-myc* 多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。*c-myc* 的 PCR 引物设计参照文献[10]。用 PE 公司生产的 DNA 合成仪合成上游引物:

5'-TACGGGAGTTGCACTCGAAG-3'

和下游引物:

5'-GCTGGTGGTCGTCGCTGAGA-3'。互补 DNA 在 *c-myc* 引物下用 1 μg RNA 经反义多聚酶链反应(RT-PCR)合成, 反应是在总体积为 20 μL 的 MLV-反转录酶反应缓冲液(加有 20 μmol/L dNTP 和 1 μmol/L oligo-dT 引物)中进行, 65℃ 孵育 5 min, 冷却至 37℃ 10 min, 然后加入 20 U RNA 酶和 200 U 反转录酶, 37℃ 孵育 60 min 后加热至 95℃ 5 min, 每一步 PCR 都加入 20 μL 逆转录混合物。然后取 2 μL 逆转录混合物, 20 μL 总体积含 2 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L 镁离子, *c-myc* 上下游引物各 1 μmol, 1 U Taq DNA 多聚酶和 1x Taq DNA 多聚酶缓冲液。PCR 共进行 20 个循环(94℃ 30 s → 40℃ 2 min → 72℃ 30 s)。*c-myc* 产物电泳后分析。

1.4 一氧化氮测定^[11]

用 Griess 法测定, 标本与 Griess 试剂(1% 对氨基苯磺酰胺(sulfanilamide), 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺[N-(1-naphthyl)-ethylenediamine], 2.5% 磷酸)反应, 在酶联免疫仪 570 nm 波长处测样品吸收值, 从亚硝酸钠标准曲线上换算得出 NO 值, 以 mmol/L 表示。

1.5 cGMP 测定

用放射免疫法测定条件培养液中 cGMP 含量^[12](药盒购于上海第二医科大学同位素室), 结果以 nmol/L 表示。

1.6 数据的统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较 *F* 检验, $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。

2 结果

2.1 拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞 *c-myc* 癌基因表达的影响

各组经处理后, 内皮细胞经 RT-PCR 扩增, 其 *c-myc* mRNA 扩增产物电泳结果经图像扫描仪扫描以灰度表示。结果见表 1(Table 1)。可见氧化型 LDL(250 mg/L)刺激培养的人脐静脉内皮细胞 *c-myc* 癌基因表达, 为对照组的 2 倍。拉米普利酸明显抑制氧化型 LDL 诱导的内皮细胞 *c-myc* 表达, 并随剂量增加抑制效应加强。拉米普利酸的效应可被硝基-L-左旋精氨酸取消。

2.2 拉米普利酸对氧化型低密度脂蛋白处理的内皮细胞一氧化氮和 cGMP 的影响

经测定, 用氧化型 LDL 处理的内皮细胞

NO 和 cGMP 含量降低 ($P < 0.05$)。拉米普利酸呈剂量依赖性增加内皮细胞 NO 释放和提高 cGMP 水平。反之, N-精氨酸 (100 $\mu\text{mol/L}$) 加

强氧化型 LDL 效应, 却部分取消拉米普利酸的效应 (表 2, Table 2)。

Table 1. Effect of ramiprilat on *c-myc* expression in HUVEC ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	<i>c-myc</i> mRNA
Control	6	10.0 $\pm$ 0.3
ox-LDL (250 mg/L)	6	21.6 $\pm$ 0.2 ^a
ox-LDL (250 mg/L) + Ramiprilat (20 $\mu\text{mol/L}$)	6	15.5 $\pm$ 0.6 ^b
ox-LDL (250 mg/L) + Ramiprilat (40 $\mu\text{mol/L}$)	6	10.2 $\pm$ 0.2 ^b
ox-LDL (250 mg/L) + N-Arg (100 $\mu\text{mol/L}$)	6	27.1 $\pm$ 1.0 ^a
ox-LDL (250 mg/L) + Ramiprilat (40 $\mu\text{mol/L}$) + N-Arg (100 $\mu\text{mol/L}$)	6	17.5 $\pm$ 0.4 ^c

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with ox-LDL group; c: $P < 0.05$, compared with ramiprilat group (40 $\mu\text{mol/L}$).

Table 2. Effect of ramiprilat on the levels of NO and cGMP in the HUVEC treated by ox-LDL ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	NO products (mmol/L)	cGMP (nmol/L)
Control	6	3.12 $\pm$ 0.58	1.15 $\pm$ 0.07
ox-LDL (250 mg/L)	6	2.20 $\pm$ 0.31 ^a	0.54 $\pm$ 0.03 ^a
ox-LDL + ramiprilat (20 $\mu\text{mol/L}$)	6	2.96 $\pm$ 0.41 ^b	0.88 $\pm$ 0.13 ^b
ox-LDL + ramiprilat (40 $\mu\text{mol/L}$)	6	3.20 $\pm$ 0.58 ^b	1.44 $\pm$ 0.23 ^b
ox-LDL + N-Arg (100 $\mu\text{mol/L}$)	6	0.96 $\pm$ 0.22 ^a	0.30 $\pm$ 0.06 ^a
ox-LDL + ramiprilat (40 $\mu\text{mol/L}$) + N-Arg	6	1.49 $\pm$ 0.28 ^c	0.36 $\pm$ 0.06 ^c

a: $P < 0.05$, compared with control; b: $P < 0.05$, compared with ox-LDL; c: $P < 0.05$, compared with ramiprilat (40 $\mu\text{mol/L}$).

3 讨论

c-myc 表达是多种细胞受到刺激分裂时的一种早期反应。许多因素如氧自由基、氧化型低密度脂蛋白等可增加内皮细胞和血管平滑肌细胞内 *c-myc* 水平^[2,3,13,14], 而这些因素与 As 形成有关。现已证实 ACE 抑制剂有抗动脉粥样硬化效应, 可减少受累的动脉表面积和动脉胆固醇含量^[15], 有效保护内皮细胞释放 NO 功能和减轻血管壁增厚^[6], 但其抗 As 效应机制仍未完全清楚。本实验发现 ACE 抑制剂拉米普利酸可抑制氧化型 LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 *c-myc* 过度表达。

血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂调节 *c-myc* 表达的机制仍不清楚。NO 作为细胞内信

使分子不仅具有神经信息传递、免疫调节和血管张力调控的功能, 而且具有介导如 *c-myc* 和 *c-myb* 癌基因表达的作用^[15], NO 与超氧阴离子结合形成过氧亚硝酸盐, NO 和过氧亚硝酸盐都可刺激细胞, 使 cGMP 含量增加^[17], 后者可抑制人淋巴细胞和血管平滑肌细胞等 *c-myc* 表达^[18]和细胞增殖^[19]。本实验结果证实拉米普利酸在刺激人脐静脉内皮细胞 NO 合成和增加 cGMP 时抑制了氧化型 LDL 介导的内皮细胞 *c-myc* 过度表达。预先用 NO 合成酶抑制剂 N-精氨酸 (100 $\mu\text{mol/L}$) 可抑制拉米普利酸的效应, 提示 NO 在拉米普利酸调节 *c-myc* 表达中起重要作用。总之, 拉米普利酸增加 NO 合成和 cGMP 水平而抑制由氧化型 LDL 诱导的内皮

细胞 *c-myc* 过度表达。

致谢 湖南医科大学药理学教研室陈修教授赠送拉米普利酸, 本院分子生物学研究中心杨和平博士精心指导 RT-PCR 技术。

参考文献

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- Lampugnani MG, Polentarutti N, Pedenivi M, et al. *C-fos* and *c-myc* expression in human endothelial cells as a function of different culture conditions. *Exp Cell Res*, 1990, **186** (2): 381~384.
- Muller-Wieland D, Lochow P, Banskota N, et al. Increase of protooncogene *c-myc* mRNA levels by low density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **35** (6): 1 169~173.
- Toda T, Tamamoto T, Shimajiri S, et al. Expression of PDGF and *c-myc* in atherosclerotic lesions in cholesterol-fed chicken. Immunohistochemical and in situ hybridization study. *Ann NY Acad Sci*, 1995, **748**: 514~516.
- Chobanian-A-V. The effects of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs on cardiovascular risk factors and atherogenesis. *Clin Cardiol*, 1990, **13** (Suppl 7): VI 43~48.
- Dusting GJ, Hyland R, Hickey H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce neointimal thickening and maintain endothelial nitric oxide function in rabbit carotid arteries. *Am J Cardiol*, 1995, **76** (15): 24E~27E.
- Liao DF, Chen X. Prostacyclin-mediated protection by angiotensin-converting enzyme inhibitors against injury of aortic endothelium by free radicals. *Cardioscience*, 1992, **3** (2): 79~84.
- Gimbrone MA Jr. Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb*, 1976, **3**: 1~28.
- Pritchard KA Jr, Wony PYK, Stemerman MB. Atherogenic concentrations of low density lipoprotein enhance endothelial cells generation of epoxyeicosatrienoic acid products. *Am J Pathol*, 1990, **136**: 1 383~391.
- Batley J, Moulding C, Taub R, et al. The human *c-myc* oncogene: structural consequences of translocation into the LgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell*, 1983; **34** (3): 779~787.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131.
- Schini VB, Boulanger C, Regoli D, et al. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B-2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, **252** (2): 581~585.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*, 1992, **70**: 593~599.
- Hahn AW, Ferracin F, Buhler FR, et al. Modulation of gene expression by high and low density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **178** (3): 1 465~471.
- Pepine CJ. Angiotensin converting enzyme inhibition and coronary artery disease. *J Hypertens*, 1994, **12** (4): S65~71.
- Magrinat G, Mason SN, Shami PJ, et al. Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression. *Blood*, 1992, **80** (8): 1 880~884.
- Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, et al. Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Letters*, 1995, **364**: 314~318.
- Schwartz EL, Chamberlin H, Brechbuhl AB. Regulation of *c-myc* expression by granulocytemacrophage colony-stimulating factor in human leukemia cells. *Blood*, 1991, **77** (12): 2 716~723.
- Bennett MR, Littlewood TD, Hancock DC, et al. Down-regulation of the *c-myc* proto-oncogene in inhibition of vascular smooth-muscle cell proliferation: a signal for growth arrest? *Biochem J*, 1994, **302**(Pt 3): 701~708.

(1997-06-16 收到, 1998-01-13 修回)