

氧化型低密度脂蛋白和普伐他汀对人脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子- 1 表达的影响

张新超, 徐成斌, 张 彤

(北京大学人民医院心内科, 北京 100044)

[主题词] 脂蛋白, 低密度; 内皮; 细胞间粘附分子- 1; 动脉粥样硬化

[摘 要] 观察氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子- 1 表达的诱导及普伐他汀对它的抑制影响, 以期探讨氧化型低密度脂蛋白致动脉粥样硬化的机制及普伐他汀可能的非调脂抗动脉粥样硬化作用。体外培养人脐静脉内皮细胞, 分别加氧化型低密度脂蛋白 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 及氧化型低密度脂蛋白(100 mg/L) + 普伐他汀($10^{-4} \sim 10^{-6}$ mol/L), 孵育 12 h、24 h 和 36 h, 采用细胞酶联免疫吸附试验、流式细胞技术和反转录聚合酶链反应分别测定细胞间粘附分子- 1 蛋白水平及 mRNA 水平。结果发现, 氧化型低密度脂蛋白呈浓度依赖性和时间依赖性诱导细胞间粘附分子- 1 蛋白表达及 mRNA 表达, 而普伐他汀对其诱导作用有浓度依赖性和时间依赖性的抑制影响。研究表明, 氧化型低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞细胞间粘附分子- 1 的表达, 可能代表了其在动脉粥样硬化形成与发展的一个关键环节致动脉粥样硬化的又一机制; 普伐他汀抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞细胞间粘附分子- 1 表达, 可能是其独立于调脂之外的另一抗动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Influence of Oxidized Low Density Lipoprotein and Pravastatin on Expression of Intercellular Adhesion Molecule- 1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZHANG Xin- Chao, XU Cheng- Bin, and ZHANG Tong

(Department of Cardiology, People's Hospital, Beijing University, Beijing 100044, China)

MeSH Lipoprotein, LDL; Endothelium; Intercellular Adhesion Molecule- 1; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To investigate the influence of oxidized low density lipoprotein (ox- LDL) and pravastatin on expression of intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM- 1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in order to elucidate one of the molecular mechanisms of ox- LDL on pro- atherosclerosis and to explore non- lipid mechanism of pravastatin on anti- atherosclerosis. **Methods** HUVEC was incubated in vitro. Ox- LDL of 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L and pravastatin of $10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L were co- incubated with HUVEC for 12 h, 24 h and 36 h respectively. The expression of ICAM- 1 in protein level and mRNA level was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), flow cytometric technique and reverse transcription- polymerase chain reaction (RT- PCR). **Results** Ox- LDL induced ICAM- 1 expression in HUVEC in concentration- dependent and time- dependent manner. Pravastatin exerted inhibitory effect on ox- LDL- induced ICAM- 1 expression, which was also dosage- dependent and time- dependent. **Conclusions** Ox- LDL could induce or up- regulate ICAM- 1 expression in HUVEC, which probably reflected a new mechanism of ox- LDL to atherogenesis. Pravastatin inhibited ox- LDL- induced ICAM- 1 expression, which may crucially contribute to the clinical benefits of HMG- CoA reductase inhibitors on coronary artery disease, beyond the cholesterol- lowering effects.

细胞粘附分子介导的单核细胞与血管内皮细胞粘附及其相互作用是贯穿于动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 形成与发展不同环节中的重要事件之一。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density

lipoprotein, ox- LDL) 虽可通过多种途径加速 As 病变形和进展, 但能否诱导或上调内皮细胞表达 As 相关粘附分子的研究报告甚多^[1~6]。HMG- CoA 还原酶抑制剂他汀类药调脂以外的抗 As 作用近年来愈益受到重视^[7]。有报道认为一些他汀类药具有抗氧化效应及抑制高胆固醇血症患者增高的单核细胞与血管内皮细胞的粘附^[8~10]。本文观察 ox- LDL 对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial

[作者简介] 张新超, 男, 1962 年出生。医学博士研究生, 副主任医师。现阶段研究: 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生与发展中的意义及进展; ④HMG- CoA 还原酶抑制剂的非调脂抗动脉粥样硬化作用; ④LDL 和 ox- LDL 对细胞粘附分子表达的影响。

cells, HUVEC) 细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达的影响及普伐他汀可能的抑制作用, 探讨 ox-LDL 致 As 作用和普伐他汀的非调脂抗 As 机制。

1 材料与方法

1.1 氧化型低密度脂蛋白的制备及鉴定

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的制备采用密度梯度超速离心法。终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 氧化修饰 LDL (37°C , 16 h)。电泳显示, 氧化修饰后的 LDL 即 ox-LDL 较 LDL 有更快的泳动率; LDL 和 ox-LDL 的硫代巴比妥酸反应物质的值分别为 1.81 mol/g 蛋白和 11.21 mol/g 蛋白。蛋白定量采用考马斯亮蓝比色法。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定

人新鲜脐带由本院产房提供。0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司) 消化脐静脉内皮, 消化下的内皮细胞以 20% FCS 的 M199 (Gibco 公司) 培养基、置 5% CO_2 孵箱 (Heraeus 公司)、 37°C 培养至融合状态, 用含有内皮细胞生长因子 20 mg/L (Boehringer Mannheim 公司)、肝素 50 mg/L 的 20% FCS 的 M199 传代培养。培养的内皮细胞形态学符合内皮细胞特征, 抗 VIII 因子抗体 (Zymed 公司) 染色阳性。细胞毒性试验采用 Trypan Blue 染色及细胞记数法。ox-LDL 和普伐他汀的浓度和剂量对 HUVEC 生长无任何毒性, 细胞存活率在 93.0% 以上。

1.3 酶联免疫吸附试验

生长良好的内皮细胞用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化, 以 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个细胞/孔接种于 96 孔板 (Costar 公司), 待细胞融合生长, 换 2% FCS 的 M199 过夜, 然后用 5% FCS 的 M199 培养, 分别加 50、100、200 mg/L ox-LDL 及 ox-LDL (100 mg/L) + 普伐他汀 ($10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mol/L}$) 共孵育, 作用时间分别为 12 h、24 h 及 36 h。

0.05% Tween-PBS、PBS 洗; 0.25% 戊二醛固定 20 min, 2% 脱脂奶粉 37°C 封闭 2 h, PBS 清洗; 1:1 000 鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体 (100 mg/L , Santa Cruz 公司) 50 μL 、 4°C 过夜, PBS 洗; 1:500 生物素标记抗鼠 IgG (1.5 g/L , Vector 公司) 50 μL 、 37°C 孵育 1 h, PBS 洗; 1:500 亲和素标记辣根酶 (1.0 g/L , Vector 公司) 50 μL 、 37°C 孵育 1 h, PBS 洗; 0.06% DAB (含 0.03% H_2O_2) 60 μL 、室温 30 min, 2 mol/L H_2SO_4 40 μL 中止反应, 492 nm 酶标仪读数 (OD 值)。试验重复两次, 每个观察值设 4 个复孔。

1.4 流式细胞技术

生长良好的内皮细胞用 2% FCS M199 过夜, 再用 5% FCS M199 培养, 并加 ox-LDL 100 mg/L 或 ox-LDL 100 mg/L + 普伐他汀 10^{-4} mol/L 孵育 24 h。0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化, PBS 收集细胞, $1\ 200 \sim 1\ 600 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清; 1:200 ICAM-1 单克隆抗体重悬细胞, 4°C 孵育 1 h, 10 倍 PBS 重悬, 离心弃上清; 1:100 荧光素标记抗鼠 IgG (1.4 g/L , Jackson 公司) 重悬细胞, 4°C 孵育 1 h, 10 倍 PBS 重悬, 离心弃上清; 0.5 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪 (FACSort BD) 检测相对荧光强度。

1.5 反转录聚合酶链反应

生长良好的内皮细胞换液后加 ox-LDL 100 mg/L 或 ox-LDL 100 mg/L + 普伐他汀 10^{-4} mol/L 孵育 24 h。细胞总 RNA 提取采用异硫氰酸胍-酚-氯仿 (Gibco 公司) 一步抽提法, 紫外分光光度计测 260 nm、280 nm 的 OD 值和 1% 甲醛变性琼脂糖电泳分析 RNA 质量。RT: AMV ($10\ 000 \text{ u/L}$, Promega 公司) 1 μL 、 $5 \times \text{RT}$ 缓冲液 4 μL 、RNasin ($40\ 000 \text{ u/L}$, Sabc 公司) 0.5 μL 、随机引物 (500 mg/L , Promega 公司) 1 μL 、dNTP (10 mmol/L , Sigma 公司) 2 μL 、RNA 1 μg 、补水至 20 μL , 37°C 反应 1 h, 95°C 、灭活 AMV 5 min。PCR: PCR 反应体系为 cDNA 2 μL 、Taq 酶 ($5\ 000 \text{ u/L}$, Sabc 公司) 0.5 μL 、 $10 \times \text{buffer}$ 3 μL 、dNTP 1.5 μL 、 Mg^{2+} 1.5 μL 、上游引物和下游引物 (美国赛百盛公司合成) 各 0.5 μL 、补水至 30 μL 。PCR 反应条件为预变性 94°C 3 min、变性 94°C 40 s、退火 57°C 60 s、延伸 72°C 60 s, 循环 35 轮后延伸 5 min。ICAM-1 引物序列^[11] 正义: $5' - \text{GTCCCCCTCAAAAGTCATCC} - 3'$ (105 ~ 124), 反义: $5' - \text{AACCCCATTCAGCGTCA-CCT} - 3'$ (1028 ~ 1047); GAPDH 引物序列 正义: $5' - \text{CGGAGTCAACGGATTTGGTGGTAT} - 3'$, 反义: $5' - \text{AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC} - 3'$ 。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下照片, PCR Marker 购自 Sabc 公司。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 细胞间粘附分子-1 的表达

不同浓度 ox-LDL 与 HUVEC 作用不同时间所表达的 ICAM-1 水平皆明显增高 ($P < 0.001$), 并呈浓度和时间依赖性。HUVEC 基础表达的 ICAM-1 水平不随时间延长而明显改变。普伐他汀明显抑制

ox- LDL 诱导的 HUVEC ICAM- 1 表达($P < 0.001$), 也呈浓度和时间依赖性(表 1, Table 1)。

表 1 氧化型低密度脂蛋白对人静脉内皮细胞粘附分子- 1 表达的诱导和普伐他汀的抑制影响

Table 1 Inducible influence of ox- LDL on ICAM- 1 expression in HUVEC and inhibitory effect of pravastatin (OD value, $n = 8$)

Groups	12 h	24 h	36 h
Control	0.133 ± 0.017	0.130 ± 0.012	0.138 ± 0.023
Ox- LDL			
50 mg/L	0.465 ± 0.020 ^a	0.483 ± 0.032 ^a	0.514 ± 0.037 ^a
100 mg/L	0.493 ± 0.038 ^a	0.542 ± 0.011 ^a	0.665 ± 0.042 ^a
200 mg/L	0.585 ± 0.036 ^a	0.636 ± 0.053 ^a	0.786 ± 0.074 ^a
Ox- LDL+ pravastatin			
100 mg/L+ 10 ⁻⁴ mol/L	0.318 ± 0.043 ^b (35.50)	0.343 ± 0.034 ^b (36.72)	0.357 ± 0.040 ^b (46.32)
100 mg/L+ 10 ⁻⁵ mol/L	0.381 ± 0.043 ^b (22.72)	0.384 ± 0.034 ^b (29.15)	0.412 ± 0.049 ^b (38.05)
100 mg/L+ 10 ⁻⁶ mol/L	0.389 ± 0.030 ^b (21.09)	0.401 ± 0.036 ^b (26.01)	0.418 ± 0.045 ^b (37.14)

Inhibitory rate (in brackets) = [(OD value of ox- LDL- OD value of pravastatin)/OD value of ox- LDL] × 100%. a: $P < 0.001$, Compared with control group, b: $P < 0.001$, Compared with 100 mg/L ox- LDL group.

2.2 流式细胞检测结果

100 mg/L ox- LDL 诱导的 HUVEC ICAM- 1 表达的平均荧光强度为 37.61 ± 3.12 ($n = 3$), 加 10⁻⁴ mol/L 普伐他汀作用后 ICAM- 1 表达的平均荧光强度为 16.46 ± 1.67 ($n = 3$)。ox- LDL 明显上调 ICAM- 1 表达, 普伐他汀则显示明显的抑制效应。

2.3 细胞粘附分子- 1 mRNA 的表达

RT- PCR 结果显示, ox- LDL 明显诱导 HUVEC ICAM- 1 mRNA 的表达, 普伐他汀则抑制 ox- LDL 对 HUVEC ICAM- 1 表达的诱导(图 1, Figure 1)。



图 1 氧化型低密度脂蛋白对人静脉内皮细胞细胞间粘附分子- 1 mRNA 表达的诱导及普伐他汀的抑制影响

Figure 1 ox- LDL induced ICAM- 1 expression in HUVEC and inhibitory effect of pravastatin. 1: Marker; 2, 3: Ox- LDL; 4, 5: Ox- LDL+ Pravastatin; 6, 7: Control.

3 讨论

1992 年, 研究人员首先发现人冠状动脉慢性增厚的内膜内皮细胞和粥样斑块的內皮细胞、巨噬细胞以及有明显 T 细胞和巨噬细胞浸润的邻近病变内皮下区域的內皮细胞均表达 ICAM- 1, 正常动脉

內皮及没有炎性细胞浸润区域的內皮细胞不表达 ICAM- 1, 并认为 ICAM- 1 在內皮细胞表达的作用涉及单核细胞、淋巴细胞向內皮的粘附及迁移^[12-15]。最近, Patel 等^[16]采用载脂蛋白缺陷自发性 As 小鼠模型直接在体观察了 ICAM- 1 介导巨噬细胞归巢到 As 斑块中的作用。许多研究都已证明, ox- LDL 通过多重途径参与或促进 As 的发生、发展, 但能否诱导 As 相关粘附分子 ICAM- 1 表达近几年的报道结果各异。本文结果显示, ox- LDL 呈浓度和时间依赖性诱导 HUVEC ICAM- 1 表达。

Nie 等^[1]发现, 正常饮食饲养的鼠动脉壁罕有 ICAM- 1 表达, 富胆固醇饲养 4 周鼠动脉内膜內皮细胞表达 ICAM- 1 增加, 尤以病损区域突出, 且与粘附到病损区的巨噬细胞、T 细胞增加相一致, 该病变部位 85% 以上的巨噬细胞在膜表面表达 LFA- 1。如果给高胆固醇饲养 2 周的鼠抗 ICAM- 1 单克隆抗体或抗 LFA- 1 单克隆抗体治疗 2 周, 粘附到内膜的巨噬细胞则明显受抑, 这种巨噬细胞几乎是 LFA- 1 阳性巨噬细胞。研究证明, LDL 增加 ICAM- 1 表达并通过 ICAM- 1/LFA- 1 机制促进单核细胞向內皮粘附、迁移^[1,2]。Weber 等^[3]研究显示, ox- LDL 和轻微修饰的 LDL 增加单核细胞向 HUVEC 粘附也是通过 ICAM- 1/CD11b 途径所介导。Kume 等^[4]认为, ox- LDL 的重要组成成分溶血磷脂胆碱诱导 ICAM- 1 表达的意义较 ox- LDL 本身更为重要。然而, Amberger 等^[5]研究认为, 仅人主动脉內皮细胞非人静脉內皮细胞受 ox- LDL 刺激可表达 ICAM- 1, 提示不同来源的血管內皮细胞对炎性因子刺激表达

ICAM-1可能是不同的。Khan等^[6]则发现,虽然天然LDL、ox-LDL及糖基化LDL皆不能诱导内皮细胞表达ICAM-1,但ox-LDL确实增加肿瘤坏死因子 α (TNF α)诱导人主动脉内皮细胞ICAM-1表达。最近,Calara等^[17]研究证实,ox-LDL可激活血管内皮细胞核转录因子(NF- κ B),诱导或上调ICAM-1表达。研究发现,高胆固醇血症患者血单核细胞与内皮细胞的粘附明显增加,洛伐他汀和辛伐他汀可明显降低增高的粘附状态;给高胆固醇血症大鼠服用氟伐他汀,其白细胞对血小板激活因子和白三烯B4刺激的粘附及迁移反应明显受抑^[8,9]。Niwa等^[10]发现,氟伐他汀抑制人单核细胞系-U937膜上LFA-1和ICAM-1表达。最近的动物实验显示,HMG-CoA还原酶抑制剂可减少内膜和中膜的巨噬细胞,有益于防止As并使斑块趋于稳定^[18]。本研究首次证实,普伐他汀可抑制ox-LDL对血管内皮细胞ICAM-1表达的诱导,从而从细胞和分子水平为他汀类药物降低临床心血管病事件提供了又一可能的基础机制。由于普伐他汀等HMG-CoA还原酶抑制剂可改善LDL总的耐氧化能力^[7],其对ox-LDL诱导的内皮细胞ICAM-1表达的抑制可能与此有关。

本研究表明,ox-LDL诱导或上调内皮细胞ICAM-1表达,进而介导血单核细胞-内皮细胞间粘附及其相互作用,是其致As的新的机制,普伐他汀抑制ox-LDL对血管内皮细胞ICAM-1表达的诱导,是其独立于调脂以外的又一抗As作用。

参考文献

- [1] Nie Q, Fan JL, Haraoka S, et al. Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis [J]. *Lab Invest*, 1997, **77**: 469-482
- [2] Smalley DM, Li JH, Italiano ML, et al. Native low density lipoprotein increases endothelial cell adhesiveness by inducing ICAM-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 585-590
- [3] Weber C, Erl W, Weber PC. Enhancement of monocyte adhesion to endothelial cells by oxidatively modified low-density lipoprotein is mediated by activation of CD11b [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1995, **206**: 621-628
- [4] Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1138-144
- [5] Amberger A, Maczek C, Jurgens G, et al. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoprotein [J]. *Cell Stress Chaperones*, 1997, **2**: 94-104
- [6] Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, et al. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 1262-270
- [7] Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction [J]. *JAMA*, 1998, **279**: 1643-650
- [8] Kimura M, Kurose I, Russell J, et al. Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1521-526
- [9] Weber C, Erl W, Weber KSC, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30**: 1212-217
- [10] Niwa S, Totsuka T, Hayashi S. Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, **18**: 669-675
- [11] Couffignal T, Duplaa C, Moreau C, et al. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1994, **74**: 225-234
- [12] Poston RN, Haskard DO, Couchier JR, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol*, 1992, **140**: 665-673
- [13] Printseva OY, Peclo MM, Gown AM. Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1: Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3 [J]. *Am J Pathol*, 1992, **140**: 889-896
- [14] van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions [J]. *Am J Pathol*, 1992, **141**: 1427-433
- [15] Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, et al. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis [J]. *Histopathology*, 1993, **22**: 437-444
- [16] Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, et al. Inhibition of α 4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 75-81
- [17] Calara F, Dimayuga P, Niemann A, et al. An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 884-893
- [18] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31**: 684-691

(此文2000-02-17收到,2000-07-22修回)

(此文编辑 文玉珊)