

辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子表达的影响

张路¹, 吴宗贵¹, 黄越承², 杨平², 韩玲²

(中国人民解放军第二军医大学 1. 附属长征医院心内科, 上海市 200003; 2. 放射医学教研室, 上海市 200433)

[关键词] 药理学; 辛伐他汀的抗动脉粥样硬化作用; 逆转录聚合酶链反应; 血管内皮生长因子; 人脐静脉内皮细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1 β

[摘要] 采用逆转录聚合酶链反应和 Western Blot 方法, 观察促炎症因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 对体外培养人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子及其受体表达的影响, 并以辛伐他汀干预, 观察其对上述过程的影响。结果发现, 肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 显著促进人脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子及其受体的表达, 在不同水平辛伐他汀对促炎症因子的上述作用具有一定的抑制效应, 由此推断辛伐他汀可能具有一定的抗炎反应及抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Simvastatin on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

ZHANG Lu¹, WU Zong-Gui¹, HUANG Yue-Cheng², YANG Ping², and HAN Ling²

(1. Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, PLA, Shanghai 200003, China; 2. Department of Radiology Medicine, Second Military Medical University, PLA, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Growth Factor; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin 1 β ; Simvastatin; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of simvastatin on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor in cultured human umbilical vein endothelial cell. **Methods** The effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and simvastatin on the levels of VEGF and its receptor in human umbilical vein endothelial cell were studied by means of reverse transcription polymerase chain reaction and Western Blot. **Results** TNF- α and IL-1 β significantly increased the expression of VEGF and its receptor in human umbilical vein endothelial cell, which were decreased by Simvastatin at the different levels. **Conclusion** Simvastatin may have the effects of anti-inflammation and anti-atherosclerosis.

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 特异性促进血管内皮细胞增殖和血管新生^[1], 而促炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 等可促进 VEGF 的表达和血管新生^[2,3], 并可能进而影响粥样斑块的稳定性。本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞, 观察促炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 对 VEGF 及其受体血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2, Flk-1) 表达的影响, 并观察辛伐他汀对上述过程的干预作用, 探讨他汀类药物抗动脉粥样硬化作用的

机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器及药物

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中国科学院上海细胞研究所, TNF- α 和 IL-1 β 、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、细胞培养瓶和 6 孔细胞培养板均购自 Sigma 公司, 小鼠抗人 VEGF 单抗购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人 Flk-1 单抗购自武汉博士德生物工程公司, 一步法 RNA 聚合酶链反应试剂盒购自 Takara 公司, 其余试剂均为国产分析纯。721 型分光光度计由国营东方仪器厂出品, Simvastatin 原粉由默沙东制药有限公司提供, Smartscape 生物显微图像处理系统由上海复日公司出品。

1.2 细胞株的培养和鉴定

采用人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 37℃ 5%

[收稿日期] 2003-12-23

[修回日期] 2004-04-20

[作者简介] 张路, 博士研究生, 主要研究方向为冠心病不稳定斑块的发生机制及防治。吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病和高血压病的发生机制及防治, E-mail 为 zgwu@medmail.com.cn。黄越承, 博士研究生, 主要研究方向为放射致瘤的机制及防护。

CO₂ 条件下培养,胰蛋白酶消化、传代、计数,以 5×10^5 /L 的密度接种于 25 mL 培养瓶,加 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素、100 ku/L 链霉素和 2 mg 谷氨酰胺),再分别接种于其他培养瓶,37℃、5% CO₂ 条件下培养,隔天换液一次,培养 24 h 用于实验。待细胞铺满瓶底后,在倒置显微镜下观察,可见细胞呈铺路卵石样或星芒状排列,2% 台盼蓝染色估算细胞活力提示活细胞数大于 95%,可用于实验。

1.3 实验分组及处理

将培养板中的细胞随机分为下列各组,每组逆转录聚合酶链反应和 Western Blot 蛋白印迹分析,各重复 6 次。空白对照组:未加任何干预因素的人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 孵育 24 h。④辛伐他汀组:人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 与辛伐他汀 1 μ mol/L 共同孵育 24 h。④IL-1 β 组:人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 与 IL-1 β 10 μ g/L 共同孵育 24 h。辛伐他汀+ IL-1 β 组:人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 预先与辛伐他汀 1 μ mol/L 孵育 2 h,再加 IL-1 β 10 μ g/L 共同孵育 24 h。TNF- α 组:人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 与 TNF- α 10 μ g/L 共同孵育 24 h。辛伐他汀+ TNF- α 组:人脐静脉内皮细胞悬液 1.0 mL 预先与辛伐他汀 1 μ mol/L 孵育 2 h,再加 TNF- α 10 μ g/L 共同孵育 24 h。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测

采用专用试剂盒抽提各组细胞悬液中的 RNA 并定量,各样本均加入总 RNA 5 μ g,采用一步法 RNA 聚合酶链反应试剂盒,按相应组分别配制逆转录聚合酶链反应液,参照文献[4]设计一对 VEGF 扩增反应引物,由加拿大 Sangon 上海分公司合成,上下游特异性引物序列分别为 5'-GGACATCTTCCAG-GAGTA-3' 和 5'-TGCAACGCCGAGTCTGTGT-3',使用热循环仪,首先 42℃ 预反应 1 h,然后扩增反应按下列程序共 40 个循环:94℃ 变性 30 s \rightarrow 55℃ 退火 30 s \rightarrow

72℃ 延伸 1 min。各样本取 10 μ L 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,条带以溴乙锭染色,并采用 Smart-scape 生物电泳图像处理系统进一步分析。上述反应以 β -actin 作为内参照,以各组产物吸光度值与 β -actin 吸光度值的比值作为各组产物相对吸光度值。

1.5 Western Blot 蛋白印记分析

上述各组细胞悬液中加入蛋白裂解液,4℃ 高速离心 20 min,定量后各取等量样本行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,封闭液中封闭 1 h,将膜分别与 VEGF 和 Flk-1 单抗(第 1 抗体)共同孵育 90 min,接着与辣根过氧化物酶标记的第 2 抗体共同孵育 45 min,加等体积增强发光化学试剂孵育 1 min,在暗室将膜在感光胶片上曝光并用相纸显影洗像,调整曝光时间直至显影出电泳带,采用 Smartscape 生物电泳图像处理系统对免疫复合物进行摄像分析。上述反应以 β -actin 作为内参照,以各组产物吸光度值与 β -actin 吸光度值的比值作为各组产物相对吸光度值。

1.6 统计学分析

不同处理组的逆转录聚合酶链式反应和 Western blot 相对吸光度值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,不同处理组间比较采用单向方差分析(one-way ANOVA),*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血管内皮生长因子 mRNA 表达水平比较

空白对照组和辛伐他汀组无 VEGF 扩增产物表达,其它各组均可见不同密度产物表达(图 1, Figure 1)。辛伐他汀+ TNF- α 组、TNF- α 组、辛伐他汀+ IL-1 β 组和 IL-1 β 组 VEGF 扩增产物的相对吸光度值分别为 0.747 ± 0.313 、 1.638 ± 0.656 、 0.871 ± 0.437 和 1.559 ± 0.409 ,辛伐他汀+ TNF- α 组和辛伐他汀+ IL-1 β 组相对吸光度值分别明显弱于 TNF- α 组和 IL-1 β 组(*P* < 0.05)。

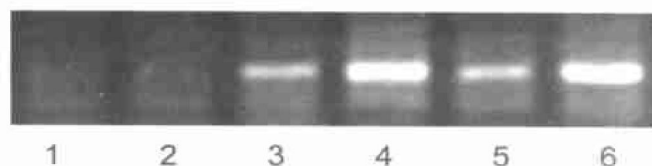


图 1. 血管内皮生长因子的逆转录聚合酶链反应分析

1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀组, 3 为辛伐他汀+ IL-1 β 组, 4 为 IL-1 β 组, 5 为辛伐他汀+ TNF- α 组, 6 为 TNF- α 组。

Figure 1. Expression of VEGF mRNA by RT-PCR

1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀组, 3 为辛伐他汀+ IL-1 β 组, 4 为 IL-1 β 组, 5

2.2 各组血管内皮生长因子和血管内皮生长因子受体 2 蛋白表达水平的比较

空白对照组和辛伐他汀组仅见微量模糊 VEGF 免疫复合物表达, 其它各组均可见不同程度免疫复合物表达(图 2A, Figure 2A)。TNF- α 组和 IL-1 β 组相对吸光度值显著高于空白对照组($P < 0.05$), 辛伐他汀+ IL-1 β 组的 VEGF 免疫复合物相对吸光度值明显低于 IL-1 β 组($P < 0.05$)(表 1, Table 1)。Flk-

1 的 Western Blot 蛋白印迹分析结果各组均可见不同程度免疫复合物表达(图 2B, Figure 2B)。辛伐他汀组相对吸光度值明显低于空白对照组($P < 0.05$), IL-1 β 组相对吸光度值明显高于空白对照组和辛伐他汀+ IL-1 β 组($P < 0.05$), 辛伐他汀+ TNF- α 组、TNF- α 组和空白对照组的 Flk-1 免疫复合物相对吸光度值无显著差异(表 1, Table 1)。

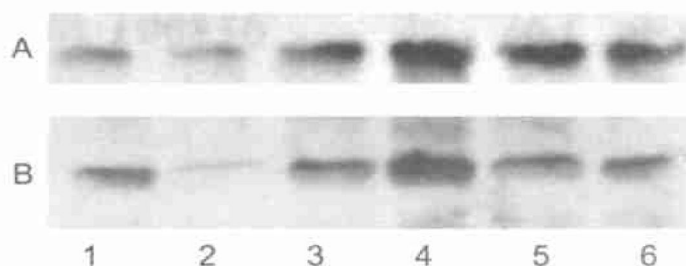


图 2. 血管内皮生长因子(A)和血管内皮生长因子受体 2(B)的 Western blot 分析 1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀组, 3 为辛伐他汀+ IL-1 β 组, 4 为 IL-1 β 组, 5 为辛伐他汀+ TNF- α 组, 6 为 TNF- α 组。

Figure 2. Expression of VEGF /Flk-1 protein by Westen blot

表 1. 各组血管内皮生长因子和血管内皮生长因子受体 2 的 Western Blot 产物相对吸光度值变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Relative Densitometric levels of VEGF and Flk-1 by Western Blot variety in the six groups

分 组	VEGF	Flk-1
空白对照组	0.158 \pm 0.057	0.941 \pm 0.407
辛伐他汀组	0.132 \pm 0.031	0.090 \pm 0.035 ^a
IL-1 β 组	1.838 \pm 0.318 ^a	1.979 \pm 0.731 ^a
辛伐他汀+ IL-1 β 组	0.762 \pm 0.273 ^b	0.911 \pm 0.537 ^b
TNF- α 组	1.537 \pm 0.165 ^a	0.933 \pm 0.272
辛伐他汀+ TNF- α 组	1.522 \pm 0.439	0.895 \pm 0.364

a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 IL-1 β 组比较。

3 讨论

血管新生是动脉粥样硬化的重要病理学特征, 血管内皮生长因子作为目前发现的唯一特异性促进血管内皮细胞有丝分裂的生长因子, 可通过调节血管新生及其它动脉粥样硬化危险因子的表达, 影响动脉粥样硬化的进程。血管内皮生长因子的生物学作用是通过配体和受体的结合产生的, 而其主要的生物学作用均是由其 2 型受体即 Flk-1 介导的。血管内皮生长因子和 Flk-1 的表达受多种因素调控, 研究显示部分炎症因子如 TNF- α 和 IL-1 β 对血管内皮生长因子和 Flk-1 的表达具有不同的调节作用^[5-7]。

本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞, 采用逆转录聚合酶链式反应和 Western Blot 方法, 从不同水平观察炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 对血管内皮生长因子和 Flk-1 在人脐静脉内皮细胞中表达的影响以及辛伐他汀对该过程的干预作用。研究结果显示在蛋白质水平和 mRNA 水平, 空白对照组和辛伐他汀组无或仅有微量血管内皮生长因子表达, TNF- α 组和 IL-1 β 组则呈现血管内皮生长因子强表达, 说明炎症因子可一定程度地促进血管内皮生长因子在内皮细胞中的表达。此外, 蛋白质水平研究提示辛伐他汀+ IL-1 β 组血管内皮生长因子信号强度显著低于 IL-1 β 组, mRNA 水平研究则提示辛伐他汀+ TNF- α 组和辛伐他汀+ IL-1 β 组的血管内皮生长因子信号强度分别显著低于 TNF- α 组和 IL-1 β 组, 且两种水平下辛伐他汀组信号强度与空白对照组均无显著差异。由此可推测正常生理状态下辛伐他汀对血管内皮生长因子表达无影响, 但在部分炎症因子促进血管内皮生长因子表达的情况下, 辛伐他汀可一定程度地抑制血管内皮生长因子的表达。相类似地, Flk-1 的 Western Blot 结果在蛋白质水平提示部分炎症因子如 IL-1 β 可一定程度地促进 Flk-1 在内皮细胞中的表达, 但和血管内皮生长因子的研究结果不同的是, 辛伐他汀不但可一定程度地抑制部分炎症因子引起的 Flk-1 表达增强, 还可一定程度地抑制正常生理状态下 Flk-1 的表达。炎症因子对动脉粥样

硬化发生 发展的影响是一个多因素调控的复杂过程, 本研究结果所显示的炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 对血管内皮生长因子及其受体 Flk-1 表达的影响, 可能是该过程的机制之一。

目前他汀类药物的调脂外作用是心血管病领域的研究热点, 而对其增加斑块稳定性和抗炎症反应方面的研究又是热中之热^[8,9]。由于血管内皮生长因子可促进血管新生(炎症反应是血管新生的重要内容)和其它动脉粥样硬化危险因子的表达, 降低斑块稳定性, 而根据本研究结果, 辛伐他汀可一定程度地抑制部分炎症因子所造成的血管内皮生长因子及其受体 Flk-1 的表达增加, 因此我们推测辛伐他汀可通过抑制血管内皮生长因子及其受体 Flk-1 的表达达到增加粥样斑块稳定性的作用, 这与部分他汀类药物抑制血管新生 增加斑块稳定性的报道是一致的^[10,11], 而辛伐他汀对炎症因子的这种拮抗作用也正是其抗炎症反应的具体表现。

总之, 本研究结果说明一定的病理生理状态下辛伐他汀可抑制血管内皮生长因子及其受体 Flk-1 在人脐静脉内皮细胞中的表达, 具有延缓动脉粥样硬化进程的作用, 这可能也属于他汀类药物的调脂外作用范畴。辛伐他汀对血管内皮生长因子及其受体表达的时间和剂量依赖性影响尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, et al. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 1994, **145** (4): 883-894

- [2] El-Awad B, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Burgel T, Metzen E, Fandrey J, et al. Hypoxia and interleukin-1 β stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int*, 2000, **58** (1): 43-50
- [3] Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt PJ, Freemont AJ, Brenchley PE. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumor necrosis factor- α (TNF- α) in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*, 1999, **117** (1): 171-176
- [4] Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation*, 1998, **98** (20): 2 108-116
- [5] Maruyama K, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Takahashi N, Tsutsumi Y, et al. Interleukin-1 β upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR/Flk-1 via activation of protein tyrosine kinases. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31** (3): 607-617
- [6] Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, et al. Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its coreceptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998, **273** (34): 22 128-135
- [7] Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor- α in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest*, 1996, **98** (2): 490-496
- [8] 张敏, 陈植月, 陆国平, 吴春芳. 辛伐他汀对内皮细胞株 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 234-237
- [9] 张园园, 张运, 张梅, 高月花, 李季昌, 方勇奇. 辛伐他汀、丙冰酚和卡托普利在动脉粥样硬化斑块消退中的作用及与金属蛋白酶 1 和组织抑制物 1 基因表达的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 401-404
- [10] Loë V, Claudine S, Farroch M, Paule O, Zohair M, Jéan-Pierre V, et al. Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in vivo models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (4): 623-629
- [11] Wilson SH, Hermann J, Lerman LO, Holmes DR, Napoli C, Ritman EL, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental Hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation*, 2002, **105** (4): 415-420

(此文编辑 朱雯霞)