

阿托伐他汀对内皮细胞增殖和内脂酶 mRNA 表达的影响

马天容¹, 潘其兴², 朱清², 任蓓蓓³, 鹿庆华¹, 岳欣²

(山东大学 1. 第二医院心内科, 山东省济南市 250033; 2. 齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012;

3. 济南市中心医院, 山东省济南市 250013)

[关键词] 病理学与病理生理学; 阿托伐他汀抑制内脂酶 mRNA 的表达; 半定量逆转录聚合酶链反应; 阿托伐他汀; 内脂酶; 细胞增殖; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 探讨阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞增殖和内脂酶 mRNA 表达的影响。方法 不同浓度阿托伐他汀(2、4、6、8 及 10 μmol/L) 与人脐静脉内皮细胞分别孵育 2、4、8、12 及 24 h 后, 用半定量逆转录聚合酶链反应法检测人脐静脉内皮细胞内脂酶 mRNA 的表达, 用嗜银蛋白分析法观察人脐静脉内皮细胞的增殖情况。结果 阿托伐他汀抑制人脐静脉内皮细胞内脂酶 mRNA 表达, 该作用呈剂量依赖性和时间依赖性。阿托伐他汀作用下, 人脐静脉内皮细胞内嗜银蛋白颗粒随浓度的增加和作用时间的延长减少趋势越明显。两因素直线相关分析显示, 内脂酶 mRNA 表达与嗜银蛋白颗粒数呈正相关关系($r = 0.963, P < 0.01$)。结论 阿托伐他汀抑制人脐静脉内皮细胞的增殖, 抑制人脐静脉内皮细胞内脂酶 mRNA 的表达, 且呈时间—剂量依赖性。人脐静脉内皮细胞的增殖与人脐静脉内皮细胞内脂酶 mRNA 的表达呈正相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Proliferation and mRNA Expression of Endothelial Lipase in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

MA Tianrong¹, PAN Qixing², ZHU Qing², REN Beibe³, LU Qinghua¹, and YUE Xin²

(1. Department of Cardiology, Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China; 2. Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 3. Department of Thoracic Surgery, Jinan Central Hospital, Jinan 250013, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Endothelial lipase; Cell Proliferation; Human Umbilical Vein Endothelial cells; Quantitative Competitive Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; AgNORs Analytical Method

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of atorvastatin on proliferation and mRNA expression of endothelial lipase (EL) in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). **Methods** Each group of cultured hUVEC was incubated with atorvastatin of 2, 4, 6, 8 and 10 μmol/L for 2, 4, 8, 12 and 24 h separately. The expression of EL mRNA in hUVEC was detected by quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The proliferation of hUVEC was observed by AgNORs analytical method. **Results** Atorvastatin markedly restrained the expression of EL mRNA in hUVEC.

The effect appeared dose dependence and time dependence. With the effect of atorvastatin, the quantity of AgNORs were decreased. The downtrend was evident along with the increased concentration and the prolonged time. There was positive correlativity between the expression of EL mRNA and the quantity of AgNORs ($r = 0.963, P < 0.01$). **Conclusions** Atorvastatin dose dependently and time dependently restrained the proliferation of hUVEC. As a result, the expression of EL mRNA was decreased too. There was a positive correlativity between them.

内脂酶(endothelial lipase, EL)是新近发现的甘油三酯脂肪酶家族的新成员^[1],由血管内皮细胞合成^[2,3],与脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)、肝脂酶有较高的基因同源性,可能与LPL、肝脂酶一样在血浆脂质代谢中起重要作用。EL基因敲除鼠血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平升高,提示EL参与高密度脂蛋白

(high density lipoprotein, HDL)代谢的调节。他汀类药物是重要的调脂和抗动脉粥样硬化药物。本研究旨在观察阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)增殖和EL mRNA表达的影响,为EL的研究和阿托伐他汀在临床的应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 干粉培养基、胰蛋白酶和总 RNA 抽提试剂盒购自美国 Gibco 公司。小牛血清为杭州四季青

[收稿日期] 2005-04-04 [修回日期] 2006-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30500519)资助

[作者简介] 马天容, 博士, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化防治和血脂代谢紊乱的研究, E-mail 为 matianrong@tom.com。潘其兴, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化防治和血脂代谢紊乱的研究。朱清, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病防治研究。

公司产品。PCR 逆转录试剂盒为日本 Takara 公司产品。硝酸银、甲酸、明胶购自济南爱博经贸有限公司。阿托伐他汀原药粉(商品名阿乐)由北京红惠制药有限公司提供。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

人脐静脉内皮细胞系由山东医学科学院基础医学研究所提供。含 10% 小牛血清和 100 kIU/L 青-链霉素的 DMEM, 37 °C、5% CO₂ 培养。待细胞长成单层达 80% 后,用 0.25% 胰酶消化、传代。

1.3 药物的配制

将阿托伐他汀溶于二甲基亚砜(DMSO)中配成 1×10^{-1} mol/L 的母液,然后加入 PBS 稀释成 1×10^{-4} mol/L,最后加入培养液使阿托伐他汀的终浓度分别为 2、4、6、8 和 10 μ mol/L。

1.4 半定量逆转录聚合酶链反应检测内皮脂酶 mRNA

将 hUVEC 培养在 100 mL 玻璃培养瓶中,待细胞长至 70%~80% 时加入药物。实验分组: 对照组为培养基+0.1% DMSO; ④阿托伐他汀组分别加入 2、4、6、8 和 10 μ mol/L 阿托伐他汀,在作用 2、4、8、12 和 24 h 后收取 5×10^6 个细胞做半定量 RT-PCR 检测。用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,最后溶于 50 μ L 无 Rnase 的去离子水中;取 1 μ g 总 RNA 用下游引物和 M-MLV 逆转录成 cDNA;取 cDNA 20 μ L 加入 PCR 反应体系 19 μ L、上游引物 1 μ L、超纯水 58 μ L 在 0.5 mL Eppendorf 管中快速离心混匀;95 °C 冰浴冷却 5 min 后快速离心。加入 2 μ L Taq DNA 聚合酶,快速离心混匀,加入 60 μ L 液体石蜡。以 β -actin 为内对照。循环条件:94 °C 变性 1 min \rightarrow 58 °C 退火 1 min \rightarrow 72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延长 7 min。EL 引物正义为 5'-CGC AAG AAC CGT TGT AAT A-3',反义为 5'-GGT CTC CCA AGT CCT CCT C-3',产物 292 bp; β -actin 引物正义为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3',反义为 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3',产物 539 bp;引物均由上

海博亚生物技术有限公司合成。取扩增 PCR 产物 10 μ L,2% 琼脂糖凝胶电泳后,经数码凝胶图像定量分析系统(捷达 801 专业凝胶图像分析软件 4.0 版)成像、条带密度扫描,以 β -actin 为内参照,测定各样本 EL mRNA 的相对表达量。相对系数为 EL 表达强度与 β -actin 表达强度之比,根据相对系数进行统计学分析。

1.5 人脐静脉内皮细胞嗜银蛋白分析

将 1×10^4 个细胞接种于含盖玻片的 6 孔板上,待细胞长到 70% 汇合时加入阿托伐他汀使其终浓度分别为 2、6 和 10 μ mol/L。对照孔加入终浓度为 0.1% DMSO,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱继续培养 2、12 和 24 h,取出盖玻片,95% 酒精固定。将细胞铺片浸入去离子水中使其水化,滴加新鲜配制的应用染色液(在暗室内将 2% 明胶甲酸溶液和 50% 硝酸银溶液按 1:2 的容积比混合)室温下染色 1 h。用去离子水反复冲洗,95%~100% 系列酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。选取 10 个视野,每个视野至少包括 30 个细胞,计数细胞核仁形成区相关嗜银蛋白颗粒数,取其平均值加以比较。

1.6 统计学方法

使用 SPSS10.0 统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 *t* 检验,多组间比较采用双因素方差分析。EL mRNA 表达量和嗜银蛋白颗粒数的 Normal Q-Q Plots 图显示两组数据均为近似正态分布。嗜银蛋白颗粒数与 EL mRNA 表达间的关系采用两变量相关分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞内皮脂酶 mRNA 表达的影响

阿托伐他汀抑制 hUVEC EL mRNA 的表达,且该作用呈剂量依赖性和时间依赖性(表 1 和图 1)。

表 1. 不同浓度阿托伐他汀作用不同时间人脐静脉内皮细胞内皮脂酶 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
对照组	0.64 \pm 0.10	0.65 \pm 0.07	0.64 \pm 0.14	0.65 \pm 0.06	0.66 \pm 0.11	0.67 \pm 0.12
阿托伐他汀 (μ mol/L)						
2	0.61 \pm 0.09	0.62 \pm 0.13	0.56 \pm 0.11	0.52 \pm 0.15 ^a	0.44 \pm 0.12 ^a	0.36 \pm 0.07 ^b
4	0.63 \pm 0.11	0.59 \pm 0.10	0.53 \pm 0.09 ^a	0.49 \pm 0.09 ^a	0.40 \pm 0.10 ^b	0.35 \pm 0.09 ^b
6	0.62 \pm 0.08	0.58 \pm 0.11 ^a	0.54 \pm 0.10 ^a	0.47 \pm 0.11 ^a	0.35 \pm 0.07 ^b	0.30 \pm 0.08 ^b
8	0.64 \pm 0.10	0.51 \pm 0.09 ^a	0.46 \pm 0.08 ^a	0.40 \pm 0.08 ^b	0.33 \pm 0.09 ^b	0.26 \pm 0.06 ^b
10	0.63 \pm 0.07	0.42 \pm 0.12 ^a	0.43 \pm 0.10 ^a	0.39 \pm 0.07 ^b	0.32 \pm 0.06 ^b	0.23 \pm 0.05 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

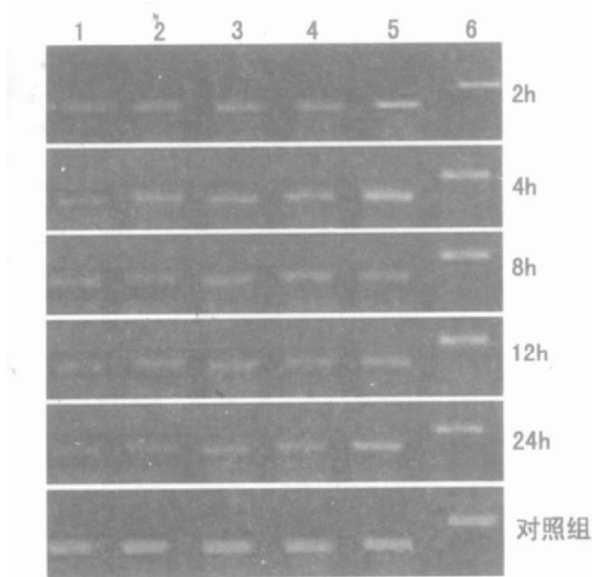


图 1. 不同浓度阿托伐他汀作用不同时间人脐静脉内皮细胞内皮脂酶 mRNA 的表达 1 为 10 $\mu\text{mol/L}$, 2 为 8 $\mu\text{mol/L}$, 3 为 6 $\mu\text{mol/L}$, 4 为 4 $\mu\text{mol/L}$, 5 为 2 $\mu\text{mol/L}$, 6 为 β -actin。

2.2 阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞增殖活性的影响

阿托伐他汀显著减少内皮细胞嗜银蛋白颗粒数, 该作用呈时间依赖性和浓度依赖性(表 2 和图 2)。

表 2. 不同浓度阿托伐他汀作用不同时间人脐静脉内皮细胞嗜银蛋白颗粒数

分 组	0 h	2 h	12 h	24 h
对照组	140.6 \pm 7.85	139.2 \pm 10.02	142.8 \pm 9.37	144.7 \pm 12.24
阿托伐他汀 ($\mu\text{mol/L}$)				
2	139.2 \pm 10.17	130.3 \pm 9.23	126.5 \pm 11.06 ^a	116.2 \pm 10.25 ^a
6	143.8 \pm 12.05	125.4 \pm 7.16 ^a	112.1 \pm 8.71 ^a	98.5 \pm 8.36 ^b
10	142.2 \pm 9.78	110.9 \pm 8.35 ^a	107.2 \pm 7.64 ^a	90.3 \pm 6.72 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

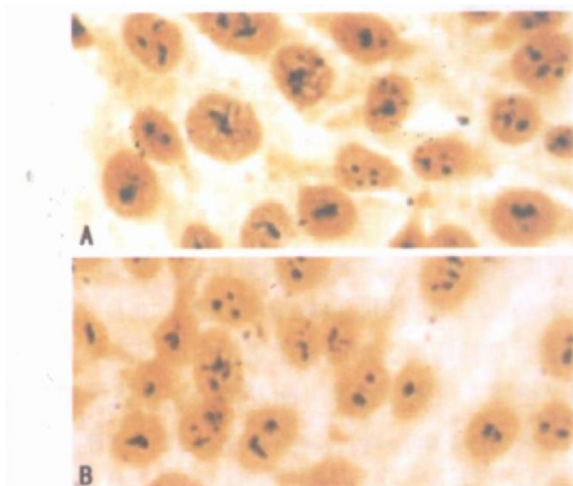


图 2. 人脐静脉内皮细胞嗜银蛋白分析 (20 \times 10) A 为对照组, B 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀作用 24 h。

2.3 直线相关性分析

相关系数 $r = 0.963$, 表示嗜银蛋白颗粒数与 EL mRNA 表达呈正相关关系, 对相关系数的假设检验表明相关系数在 $\alpha = 0.01$ 水平上(双侧)有显著意义。嗜银蛋白颗粒数为自变量 X, EL mRNA 表达量为因变量, 常数 0.3125 与 X 项的 P 值均为 0.000, 即 $P < 0.01$, 说明回归方程有显著性意义, 得回归方程为: $Y = 0.3125 + 0.0024X$ 。

3 讨论

内皮脂酶是新近发现的一种脂肪酶, 其结构与肝脂酶、LPL 分别有 41% 和 44% 的同源性, 均参与体内脂质代谢, 同属于甘油三酯脂肪酶家族^[2]。研究显示, 通过向低密度脂蛋白受体缺陷鼠尾静脉注射含有人 EL cDNA 的腺病毒使 EL 过度表达时, 血浆 HDLC 水平显著降低^[4], 而 EL 基因敲除小鼠的血浆 HDLC 水平显著升高^[5], 提示 EL 可能在高密度脂蛋白代谢中起重要作用。HDLC 浓度与冠状动脉粥样硬化发生的危险性呈负相关^[6,7]。目前, 尚无特异性升高 HDLC 水平的药物。EL 的发现为该类药物研制提供了新的思路。

细胞内 EL mRNA 的表达受许多因素的影响^[8], 其中包括与动脉粥样硬化的发生密切相关的细胞因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β , 可使 hUVEC 和 EL 表达分别增加 6.5 倍和 4.8 倍。另外, 与动脉粥样硬化形成有关的循环压力和血管壁的剪切力也使内皮细胞 EL 表达增加。但药物对 EL 表达的影响目前尚未见报道。阿托伐他汀是一种新型的 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 主要降低血清总胆固醇水平, 还可升高 HDLC 水平, 但其升高 HDLC 水平的机制不清楚。本研究结果发现, 阿托伐他汀抑制 hUVEC EL mRNA 表达, 随着作用时间的延长和浓度的增大, EL mRNA 表达量减少越明显, 呈时间和浓度依赖性。由此推测阿托伐他汀抑制血管内皮细胞分泌 EL, 可能是其升高血浆 HDLC 水平的机制之一。

本研究发现, 在阿托伐他汀的作用下, hUVEC 核仁形成区相关嗜银蛋白颗粒减少, 并随着剂量的加大和作用时间的延长, 嗜银蛋白颗粒呈逐渐减少的趋势。核仁形成区是位于某些近端着丝粒染色体短臂上含编码核蛋白体 RNA (rRNA) 基因 rDNA 片段的环状 DNA。嗜银蛋白颗粒是核仁内高度磷酸化对银有亲和作用的酸性非组蛋白, 对 rDNA 的转录, rRNA 合成、加工和装配起着重要的作用。嗜银蛋白颗粒的含量是反映细胞增殖活性的一种指标, 其含

量越高,表明细胞增殖越快。由此可见,阿托伐他汀具有抑制 hUVEC 增殖的作用。

直线相关分析发现, hUVEC 内 EL mRNA 表达与嗜银蛋白颗粒数呈正相关关系 ($r = 0.963, P < 0.01$)。进一步说明阿托伐他汀对 hUVEC 内 EL mRNA 表达的抑制是其抑制内皮细胞增殖的结果,细胞增殖越慢, EL mRNA 表达越少, EL 合成减少,从而可能使 HDLC 水平升高。

本研究所用的阿托伐他汀浓度从 2 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$, 相当于临床患者每日服用 10 ~ 80 mg 阿托伐他汀^[9]。阿托伐他汀的临床常规剂量为 10 ~ 20 mg/d, 最大允许用量为 80 mg/d。本研究结果表明, 随着药物浓度的加大, 对 hUVEC 增殖的抑制越明显, EL mRNA 表达量越少, 10 $\mu\text{mol/L}$ 时作用最强, 为强化降脂治疗提供了新的实验依据。

[参考文献]

[1] Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. The role of hepatic lipase in li-

poprotein metabolism and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 1998, **9**: 211-219

- [2] Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism[J]. *Nat Genet*, 1999, **21** (4): 424-428
- [3] Jin WJ, Marchadier D, Rader DJ. Lipase and HDL metabolism[J]. *Trends in Endocrinol and Metab*, 2002, **13** (4): 174-178
- [4] Cohen JC. Endothelial lipase: Direct evidence for a role in HDL metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2003, **111** (3): 318-321
- [5] Ma k, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high density lipoprotein concentration, structure, and metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (5): 2 748-753
- [6] 彭扬, 张锦, 李莉, 孟馨, 王涤非, 周一军, 等. 糖基化终产物促进 U937 巨噬细胞高密度脂蛋白受体表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (2): 151-154
- [7] 江渝, 刘红, 彭家和, 叶治家, 何凤田, 董燕麟. 培养的人动脉平滑肌细胞诱导高密度脂蛋白氧化修饰[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 17-19
- [8] Hirrata K, Ishida T, Matsushita H, Tsao PS, Quertemous T. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **272** (1): 90-93
- [9] Mohammadi A, Macri J, Newton R, Romain T, Dulay D, Adeli K. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells[J]. *Arterioscler Thomb Vasc Biol*, 1998, **18** (5): 783-793

(此文编辑 文玉珊)