[文章编号] 1007-3949(2006)14-07-0569-04

·实验研究·

脱氢表雄酮对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞中血管细胞粘附分子 1 表达的影响

胡晓静, 阮秋蓉, 朱 敏, 瞿智玲

(华中科技大学同济医学院基础医学院病理学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 脱氢表雄酮; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 血管细胞粘附分子 1

[摘 要] **目的** 探讨脱氢表雄酮对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞分泌血管细胞粘附分子 1 的影响。**方法** 用脱氢表雄酮(5 μmol/L)作用于氧化型低密度脂蛋白(50 mg/L)诱导的体外培养的 SD 大鼠血管平滑肌细胞, 采用免疫细胞化学、免疫蛋白印迹法、逆转录聚合酶链反应检测其血管细胞粘附分子 1 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 当细胞培养基中加入氧化型低密度脂蛋白后, 血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 的分泌明显升高($P<0.05$), 而同时加入脱氢表雄酮可使血管细胞粘附分子 1 的分泌降低($P<0.05$)。**结论** 脱氢表雄酮能够抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 的分泌, 而且可能是脱氢表雄酮抗动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of Dehydroepiandrosterone on Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein in Vascular Smooth Muscle Cells

HU Xiao-Jing, RUAN Qiu-Rong, ZHU Min, and QU Zhi-Ling

(*Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*)

[**KEY WORDS**] Atherosclerosis; Dehydroepiandrosterone; Oxidized Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cells; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the effects of dehydroepiandrosterone (DHA) on expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** In vitro cultured VSMC from sprague dawley rat induced by ox-LDL (50 mg/L) were effected by DHA (5 μmol/L). The expressions of VCAM-1 protein and mRNA were determined by immunocytochemistry, Western blot analysis and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Ox-LDL stimulation significantly induced VCAM-1 expression in VSMC ($P<0.05$). When DHA was added into the medium simultaneously, ox-LDL inducing VCAM-1 expression was obviously decreased ($P<0.05$). **Conclusions** DHA showed inhibiting effects on ox-LDL-induced VCAM-1 expression in VSMC. That may be one of the mechanisms of antiatherosclerotic effect of DHA.

临床流行病学研究发现血浆脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHA)水平与男性冠心病发病呈负相关[1], 动物实验证实 DHA 可抑制高脂血症动物模型动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发展[2], 但关于 DHA 作用机制还不清楚。而血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)通过与其相应配体作用, 促使单核细胞在血管内皮下聚集, 吞噬脂质形成泡沫细胞, 从而在 As 发生发展过程中具有重要作用, DHA 能否通过抑制单核细胞局部募集过程中重要趋化因子 VCAM-1 表达来减少 As 脂纹的面积, 目前尚未见报道。本研究拟从细胞水平研究 DHA 对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)分泌 VCAM-1 的影响, 从而探讨其抗 As 可能机制。

[收稿日期] 2005-07-20 [修回日期] 2006-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30300135), 湖北省自然科学基金资助(2005ABA167)

[作者简介] 胡晓静, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 steffi4017@hotmail.com。**通信作者阮秋蓉**, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病机制及防治的研究, E-mail 为 ruanqiurong@sina.com。朱敏, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清、M199 培养基、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司; 低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)购自Sigma公司;DHA购自Fluka公司;羊抗大鼠VCAM-1多克隆抗体、SP法免疫组织化学试剂盒购自北京中山公司;VCAM-1引物和Trizol购自Invitrogen公司,M-MLV逆转录酶和Olig(dT)购自Promega公司。

1.2 血管平滑肌细胞的原代培养与分组

取4~6周龄雄性SD大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),断头处死后,无菌条件下打开胸腔,取出胸主动脉,于PBS中剥去外膜,刮下内膜,贴壁法培养VSMC。培养基为含10%胎牛血清、0.03%谷胺酰胺的1×M199培养基,光镜以及相差显微镜下观察细胞呈梭形,生长至汇合状态时呈现特有的峰与谷特点,同时,运用免疫组织化学特异抗α-actin单抗鉴定VSMC。细胞纯度达95%以上,第3~4代细胞用于实验。按实验设计将培养细胞分4个组:正常对照组换为无血清DMEM/F12培养基;④ox-LDL刺激组为无血清DMEM/F12培养基+50 mg/L ox-LDL;㈣ox-LDL+DHA组为无血清DMEM/F12培养基+50 mg/L ox-LDL+5 μmol/L DHA;DHA组为无血清DMEM/F12培养基+5 μmol/L DHA,以上各组均用药物作用24 h。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备与鉴定

Sigma公司购得的LDL粉剂用PBS溶为1.6 g/L浓度的溶液,LDL的体外氧化修饰采用Cu^{2+}介导法,制备本实验中的ox-LDL时所用Cu^{2+}浓度为10 μmol/L,37℃、5% CO_2孵箱中孵育24 h,并以0.5 mmol/L浓度的依地酸二钠透析24 h终止氧化,去除Cu^{2+}和可溶性的过氧化产物。用琼脂糖电泳和硫代巴比妥酸反应物质的量测定LDL的修饰程度。浓缩过滤后避光保存待用。用Lowry法进行蛋白质定量检测。

1.4 免疫细胞化学

在各组培养瓶内预先放置洗净的盖玻片,将生长至汇合状态的VSMC用胰酶消化法进行传代接种于内。待长满时,按上述分组加入不同药物,继续孵育24 h,用1∶1乙醇+丙酮固定,自然风干后-20℃保存备用。采用SP法,用山羊抗大鼠VCAM-1多克隆抗体和相应的免疫细胞化学检测试剂盒进行细胞化学染色,采用HPIAS-1000高清晰度图像处理系统,对各组细胞片进行图像分析,用细胞内棕黄色阳性颗粒的平均吸光度值(A值)代表各组细胞VCAM-1蛋白的含量。

1.5 免疫蛋白印迹法

提取各组VSMC的蛋白,用Lowery法测定样品蛋白的浓度,然后在7.5% SDS-PAGE凝胶上电泳分离,再将蛋白转移至硝酸纤维膜上,室温振荡封闭后,加入山羊抗大鼠VCAM-1多克隆抗体4℃孵育过夜。充分洗涤后,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育1 h。充分洗涤后,加入ECL反应体系,曝光,显影。用英国UVP公司GDS8000型凝胶成像系统及HPIAS-1000彩色图像分析系统检测硝酸纤维膜上蛋白质条带的积分吸光度值(A值)。

1.6 逆转录聚合酶链反应

用Trizol一步法提取各组VSMC的RNA,每组取4 μg总RNA逆转录成为cDNA后,取1 μL DNA产物进行PCR循环。反应体系为20 μL,10×Tag酶buffer 2 μL,DNTP 0.4 μL,上、下游引物各0.4 μL,$MgCl_2$ 1.2 μL,Tag酶0.2 μL,模板1 μL,剩余用无菌的三次蒸馏水补足。VCAM-1引物序列如下:正义为5' CGG TCA TGG TCA AGT GTT TG 3';反义为5' GAG ATC CAG GGG AGA TGT CA 3',预计扩增产物长度570 bp。内参照β-actin引物序列:正义为5' CGT TGA CAT CCG TAA AGA 3';反义为5' AGC CAC CAA TC2 CAC ACA G 3',预计扩增产物长度173 bp。反应参数:95℃预变性5 min后,95℃变性1 min→59℃退火1 min→72℃延伸1 min,32次循环,末次循环后72℃再延伸5 min。取10 μL扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外线下扫描记录电泳结果。继用SQ9636型扫描系统扫描,HPIAS-1000型图像分析系统检测各组目的基因及内参照的积分吸光度值(A值),并以两者比值作为各组mRNA的相对表达量。

1.7 统计学分析

实验数据使用SPSS v13.0软件处理,各组实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用t检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管细胞粘附分子1蛋白的表达

2.1.1 *免疫细胞化学法* 各组VSMC均有VCAM-1蛋白表达。阳性信号为细胞内棕黄色粗细不均匀的颗粒。与正常对照组(图1A)相比,ox-LDL刺激组VCAM-1蛋白表达明显增强($P<0.01$),表现为细胞着色明显加深(图1B);与ox-LDL刺激组相比,ox-LDL+DHA组VCAM-1蛋白表达明显受到抑制($P<0.01$),表现为着色明显变浅(图1C);DHA组(图1D)与正常对照组相比差异无显著性($P>0.05$,表1)。

2.1.2　免疫蛋白印迹法　各组 VSMC 均有 VCAM-1 蛋白的表达(图 2)。与正常对照组相比,ox-LDL 能明显诱导 VCAM-1 蛋白的表达($P<0.01$);与 ox-LDL 刺激组相比,ox-LDL+DHA 组 VCAM-1 蛋白表达明显受到抑制($P<0.01$);DHA 组与正常对照组差异无显著性($P>0.05$,表 2)。

表 1. 免疫细胞化学法检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

分　组	平均吸光度值
正常对照组	0.086 7±0.018 1
ox-LDL 刺激组	0.251 9±0.027 9[a]
ox-LDL+DHA 组	0.179 1±0.021 8[b]
DHA 组	0.096 1±0.013 4

a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.01$,与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

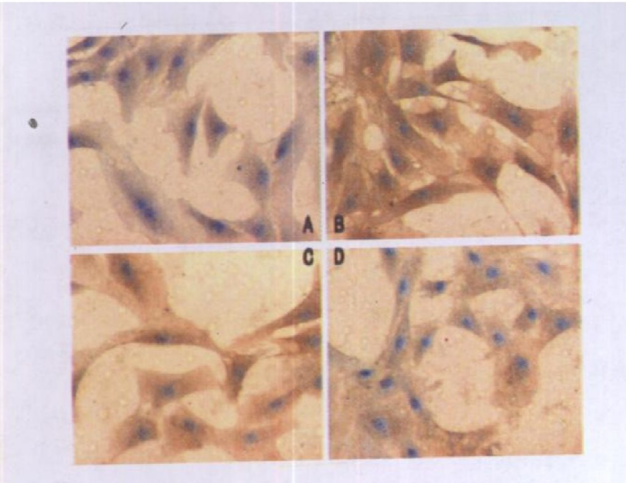

图 1. 免疫细胞化学法示各组血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的变化 (10×)

表 2. 免疫蛋白印迹法检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

分　组	积分吸光度值
正常对照组	1 105±71
ox-LDL 刺激组	1 920±97[a]
ox-LDL+DHA 组	1 148±71[b]
DHA 组	1 013±109

a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.01$,与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

2.2　血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

用美国 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取的各组平滑肌细胞总 RNA 经核酸蛋白仪纯度鉴定,OD_{260}/OD_{280} 比值范围在 1.6~2.0 之间,经琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色紫外灯下观察可见清晰的 RNA 条带(图 3),据 DNA Marker 显示为 570 bp 的 VCAM-1 条带和 173 bp 的内参照条带。根据电泳结果发现,各组细胞均表达 VCAM-1 mRNA,ox-LDL 刺激组 mRNA 表达明显高于正常对照组($P<0.01$),而 ox-LDL+DHA 组其 mRNA 表达则有所下降($P<0.05$),DHA 组与正常对照组 mRNA 表达差异无显著性($P>0.05$,表 3)。

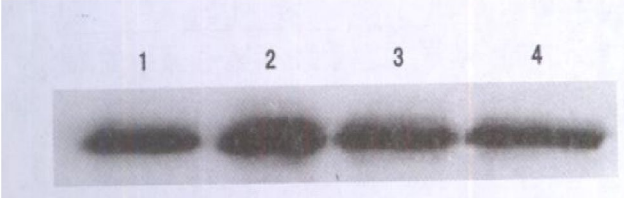

图 2. 免疫蛋白印迹法检测血管平滑肌细胞中血管细胞粘附分子 1 蛋白表达　1 为正常对照组;2 为氧化型低密度脂蛋白刺激组;3 为氧化型低密度脂蛋白+脱氢表雄酮组;4 为脱氢表雄酮组。

表 3. 逆转录聚合酶链反应检测各组血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

分　组	VCAM-1/β-actin
正常对照组	0.480 6±0.028 6
ox-LDL 刺激组	1.999 3±0.108 9[a]
ox-LDL+DHA 组	1.746 8±0.0514[b]
DHA 组	0.532 4±0.070 8

a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较。

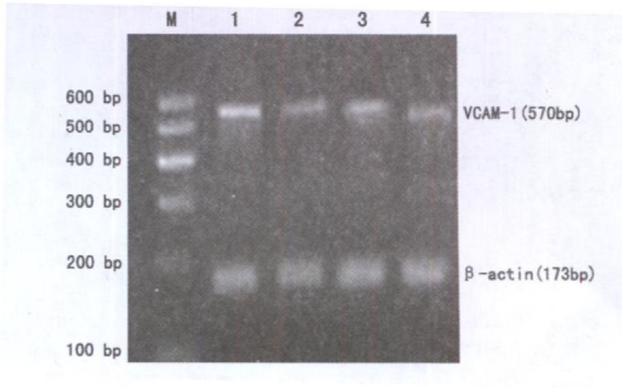

图 3. 逆转录聚合酶链反应产物电泳结果　M 为相对分子质量,1 为氧化型低密度脂蛋白组,2 为正常对照组,3 为氧化型低密度脂蛋白+脱氢表雄酮组,4 为脱氢表雄酮组。

3　讨 论

动脉粥样硬化(As)是引起心、脑血管疾病的重要因素,其发病率和病死率均位居前列,因此,其发病机制已越来越多地引起人们的关注。已有大量研究表明,As 是一种多因素、多基因引起的复杂的慢性炎症性疾病,涉及损伤的内皮细胞与单核巨噬细

胞、平滑肌细胞之间的相互作用,以及局部产生的大量细胞因子、生长因子的网络调控,其中粘附分子、趋化因子、生长因子等在As发生发展过程中具有重要作用。ox-LDL可能通过调节多种细胞因子和生长因子的分泌,而发挥促As形成的作用,是普遍承认的致As的重要因素。DHA的化学名称为3β-羟基雄甾-5-烯-17-酮,是由肾上腺皮质细胞合成的C19肾上腺甾类化合物。它是一种弱雄激素,是血清中含量最多的一类类固醇激素,其在血浆中的浓度在青春期达高峰,而后随年龄的增加而迅速递减。虽然体内许多激素水平都随年龄的增长而发生变化,但DHA水平的变化最为明显,因此被称为"青春激素"[3]。许多研究发现DHA与许多老年性疾病关系密切。另外,近年来研究发现DHA在抗As方面也发挥重要作用。临床流行病学研究显示,As以及由此引发的心、脑血管意外的发生与血浆中低水平的DHA有密切关系[4]。Furutama等[5]发现DHA可通过抗细胞分裂、抑制细胞增殖而达到抗As的作用。在培养的人脐静脉内皮细胞中加入不同浓度的DHA后,随着DHA浓度的增加,超氧化物歧化酶水平上升,而丙二醛含量降低,提示DHA可以减轻内皮细胞过氧化损伤,增加血管内皮细胞的抗氧化能力,从而抗As[6]。Bednarek等[7]也发现,DHA可减少高胆固醇喂饲兔的动脉壁脂纹的面积,而且这种作用并不依赖于血脂水平的改变,说明DHA可在体内抑制As的发生发展,但是关于它的作用机制尚不清楚。

本实验以ox-LDL作为刺激因素造成体外As模型,通过细胞水平来观察DHA对As发生过程中平滑肌细胞中VCAM-1水平表达的影响,来阐明DHA作用的可能机制。结果发现,50 mg/L的ox-LDL作用于VSMC 24 h后,可显著促进VCAM-1蛋白及mRNA的表达,而同时给予DHA可显著降低VCAM-1蛋白和mRNA的表达。另外,DHA组与正常对照组VCAM-1的表达差异无显著性,表明DHA单独存在时对VSMC中VCAM-1的表达无明显影响。由此我们推断DHA可能通过抑止VSMC中VCAM-1的表达而发挥抗As作用。

[参考文献]

[1] Herrington DM. DHEA and coronary atherosclerosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, **774** (2): 2 717-722

[2] Eich DM, Nestler JE, Johnson DE, Dworkin GH, Ko D, Wechsler AS, et al. Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the neterotopic rabbit model of cardial transplantation [J]. *Circulation*, 1993, **84** (1): 261-269

[3] Zdrojewicz Z, Ciszko B. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-structure, clinical importance and the role in human body [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2001, **55** (6): 835-854

[4] Vatalas IA, Diony-Asteriou A. Adrenal C19 steroids and lipoprotein levels in healthy men [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001, **1** (6): 388-393

[5] Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by DHEA sulfate [J]. *Biophys Acta*, 1998, **1403** (1): 107-114

[6] 赵志明, 黄志新, 王 晶, 郝亚荣, 李庚山. 去氢表雄酮对培养的人脐静脉血管内皮细胞抗氧化能力的影响[J]. 医学新知杂志, 2001, **11** (2): 76-77

[7] Bednarek-Tupikowska G, Gosk I, Szuba A, Bohdanowicz PA, Kosowska B, Bidzinska B, et al. Influence of dehydroepiandrosterone on platelet aggregation, superoxide dimutase activity and serum lipid peroxide concentration in rabbits with induced hypercholesterolemia [J]. *Med Sci Monit*, 2000, **6** (1): 40-45

(此文编辑 许雪梅)