

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0114-03

阿托伐他汀对同型半胱氨酸诱导的大鼠主动脉内皮细胞分泌前列腺素 I<sub>2</sub> 和单核细胞趋化蛋白 1 的影响

刘书文, 崔 林, 王 玥, 吴玉容, 于 波

(哈尔滨医科大学附属第二医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 内科学; 阿托伐他汀; 同型半胱氨酸; 前列腺素 I<sub>2</sub>; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 探讨不同浓度的阿托伐他汀对同型半胱氨酸损伤的大鼠主动脉内皮细胞分泌前列腺素 I<sub>2</sub>、单核细胞趋化蛋白 1 的影响。方法 体外培养大鼠动脉内皮细胞, 待细胞生长至汇合状态时加入含浓度为 50 mmol/L 同型半胱氨酸及不同浓度阿托伐他汀(5、15、30 及 50 mmol/L)的培养液, 孵育 8 h, 检测细胞培养液中前列腺素 I<sub>2</sub>、单核细胞趋化蛋白 1 水平。结果 同型半胱氨酸明显损伤内皮细胞, 使前列腺素 I<sub>2</sub> 水平明显降低, 单核细胞趋化蛋白 1 水平显著升高。不同浓度的阿托伐他汀均可促进前列腺素 I<sub>2</sub> 分泌, 抑制单核细胞趋化蛋白 1 分泌, 并呈浓度依赖性( $P < 0.05$ )。结论 阿托伐他汀可促进同型半胱氨酸损伤的大鼠动脉内皮细胞分泌前列腺素 I<sub>2</sub>, 抑制单核细胞趋化蛋白 1 的表达。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

# The Effects of Atorvastatin on Prostaglandin I<sub>2</sub> and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Excretion in Cultured Rat Artery Endothelial Cells Induced by Homocysteine

LIU ShuWen, CUI Lin, WANG Yue, WU YuRong, and YU Bo

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150068, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Homocysteine; Prostaglandin I<sub>2</sub>; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of atorvastatin treat on secretion of prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cultured rat artery endothelial cells (RACE). **Methods** RACE were cultured within basal medium. When cells grew to the stage of confluence, 50 mmol/L homocysteine (HCY) and variant concentration of atorvastatin (5, 15, 30 and 50 mmol/L) were added, for another 8 hours. PGI<sub>2</sub> and MCP-1 were examined in nutrient solution. **Results** RAEC were injured severely by HCY. Within atorvastatin medium, PGI<sub>2</sub> increased and MCP-1 decreased. This effect was dose-dependent. **Conclusion** Atorvastatin reduce MCP-1 and increase PGI<sub>2</sub> secretion in damaged RAEC.

同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的一项新的独立危险因素, 而血管内皮细胞功能异常是动脉粥样硬化形成的早期环节, 有研究证明 HCY 能促进内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化是一种慢性炎症过程, 动脉粥样硬化的早期病变(即脂纹)主要由单核细胞来源的巨噬细胞和 T 淋巴细胞构成<sup>[2]</sup>。持续的炎症反应使血液中的单核细胞和淋巴细胞不断迁移到动脉粥样硬化病变区, MCP-1 在该过程中起重要作用。前列腺素 I<sub>2</sub>(prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>)由血管内皮细胞合成并分泌, 是一种重要的血管活性物质, 动

脉粥样硬化整个病理过程都与 PGI<sub>2</sub> 和血栓素 A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>)的平衡失调密切相关, 而 HCY 也参与这些过程。目前认为, 他汀类药物除调节血脂代谢外, 还有消除炎症、稳定斑块、改善内皮功能等非调脂作用。本研究通过观察阿托伐他汀对同型半胱氨酸损伤的大鼠动脉内皮细胞分泌的血管活性物质的影响, 探讨阿托伐他汀对血管内皮功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠购于哈尔滨医科大学动物实验中心。M199 培养基购自美国 Gibco 公司; 优质胎牛血清购自杭州四季青公司; Trypsin 0.25% 胰蛋白酶购自美国 BD 公司; 阿托伐他汀原粉由中国红惠医药公司赠送; HCY 为 Sigma 公司产品; 6-keto PGF1 $\alpha$  试

[收稿日期] 2006-12-12

[修回日期] 2007-02-01

[作者简介] 刘书文, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 shuwenliu2004@yahoo.com.cn。崔林, 教授, 硕士生导师, 研究方向为冠心病的发病机制。王玥, 医师, 研究方向为冠心病的预防与治疗。

剂盒购自解放军总院东亚免疫技术研究所;大鼠 MCP-1 ELISA 试剂盒购自上海朗卡公司。

## 1.2 大鼠主动脉内皮细胞的培养及鉴定

分离大鼠主动脉内皮,胰蛋白酶消化后收集内皮细胞,采用 M199 培养基,加入 20% 胎牛血清,100 ku/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,接种于培养瓶中,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱孵育,24 h 后换液,以后每 2 天换液 1 次。4~5 天后细胞达汇合状态。倒置显微镜下观察,内皮细胞呈梭形及多角形,汇合成单层,呈典型的铺路石样外观。(1)因子相关抗原间接免疫荧光法鉴定呈阳性,胞质内可见棕黄色颗粒。

## 1.3 实验分组

用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,第 2~3 代细胞用于实验。接种于 96 孔板(1×10<sup>5</sup>/孔),换用无血清 M199 培养基培养 12 h 使细胞同步化,参照文献[1,3]将实验分为 6 组,每组 16 孔。对照组继续用无血清 M199 培养 8 h;损伤组以含 50 mmol/L HCY 的无血清 M199 培养 8 h;不同浓度阿托伐他汀组以 5、15、30 和 50 mmol/L 阿托伐他汀加含 50 mmol/L HCY 的无血清 M199 培养 8 h。

## 1.4 前列腺素 I<sub>2</sub> 的测定

培养终止后,分别收集上清液存于-30℃冷冻待测。PGI<sub>2</sub> 的半衰期极短,其代谢产物 6-keto PGF1α 稳定,因此用放射免疫分析法测定 6-keto PGF1α 的含量以反映 PGI<sub>2</sub> 水平。

## 1.5 单核细胞趋化蛋白 1 的测定

培养终止后,取细胞培养液 100 μL,双抗体夹心 ELISA 法检测 MCP-1 的表达。将 100 μL 培养液加入已标记好的 ELISA 反应板中,37℃水浴 2 h,弃去培养液,反复冲洗 4 次,每次 5 min;加入第一抗体工作液 50 μL,37℃水浴 2 h,冲洗 4 次;加入酶标抗体工作液 100 μL,37℃水浴 2 h,冲洗 4 次;每孔加入显色液 50 μL,用酶标仪在 490 nm 下读数。

## 1.6 统计学分析

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析及 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 前列腺素 I<sub>2</sub> 水平的变化

50 mmol/L HCY 可明显损伤大鼠主动脉内皮细胞,使 PGI<sub>2</sub> 水平明显减少,与对照组比较差异显著( $P < 0.01$ );5、15、30 和 50 mmol/L 阿托伐他汀与 HCY 共孵育后,PGI<sub>2</sub> 水平升高,呈明显的剂量依赖性,并明显高于损伤组( $P < 0.01$ ;表 1)。

表 1. 不同浓度阿托伐他汀对同型半胱氨酸损伤的内皮细胞分泌前列腺素 I<sub>2</sub> 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

分 组	PGI <sub>2</sub>
对照组	610.6 ± 15.0
损伤组	522.7 ± 17.4 <sup>a</sup>
阿托伐他汀组	
5 mmol/L	544.6 ± 10.5 <sup>b</sup>
15 mmol/L	556.0 ± 10.1 <sup>bc</sup>
30 mmol/L	595.1 ± 16.9 <sup>bd</sup>
50 mmol/L	592.7 ± 15.0 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与损伤组相比; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与 5 mmol/L 阿托伐他汀组比较。

## 2.2 单核细胞趋化蛋白 1 水平的变化

50 mmol/L HCY 可明显损伤内皮细胞,使 MCP-1 水平明显增加,与对照组比较差异显著( $P < 0.01$ )。5、15、30 和 50 mmol/L 阿托伐他汀与 HCY 共孵育后,MCP-1 水平降低,呈明显的剂量依赖性( $P < 0.01$ ),并明显低于损伤组( $P < 0.05$ ;表 2)。

表 2. 不同浓度的阿托伐他汀对同型半胱氨酸损伤的内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

分 组	MCP-1
对照组	98 ± 12
损伤组	156 ± 11 <sup>a</sup>
阿托伐他汀组	
5 mmol/L	145 ± 14 <sup>b</sup>
15 mmol/L	128 ± 11 <sup>cd</sup>
30 mmol/L	111 ± 10 <sup>ce</sup>
50 mmol/L	107 ± 13 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与损伤组相比; d 为  $P < 0.01$ , 与 5 mmol/L 阿托伐他汀组比较; e 为  $P < 0.01$ , 与 15 mmol/L 阿托伐他汀组比较。

# 3 讨论

动脉粥样硬化是心、脑、肾、周围血管等许多疾病的病理基础,动脉粥样硬化的形成过程是血管内膜损伤的一种慢性炎症反应过程,是内皮细胞、炎症细胞(主要是单核和淋巴细胞)、血管平滑肌细胞与细胞因子相互作用的结果<sup>[2]</sup>。内皮细胞的损伤导致内源性 PGI<sub>2</sub> 分泌减少,而 MCP-1 表达增高,促进动脉粥样硬化的形成和发展<sup>[3]</sup>。已知 PGI<sub>2</sub> 有扩张血管、抑制血小板激活、抗血栓形成、保护内皮细胞的功能,其具体作用机制仍不明了。MCP-1 能诱导单核细胞粘附于正常或受损的内皮细胞表面并穿入内

皮下,吞噬低密度脂蛋白而形成泡沫细胞构成了动脉粥样硬化的早期病变<sup>[4,5]</sup>。大量流行病学资料证明 HCY 能引起动脉粥样硬化,是新的致动脉粥样硬化的独立危险因素<sup>[6,8]</sup>,其损伤内皮细胞的可能机制为诱导核因子  $\kappa$ B 及 CD40 表达增强<sup>[9,11]</sup>,引起多种内皮细胞因子(如 MCP-1、 $\text{PGI}_2$  等)的表达变化,而致动脉粥样硬化。

阿托伐他汀目前主要用于血脂增高及动脉粥样硬化相关疾病的治疗,而其在治疗高半胱氨酸血症中的应用及其作用机制研究较少。本研究发现 HCY 可诱导大鼠主动脉内皮细胞 MCP-1 表达增加, $\text{PGI}_2$  分泌减少,而阿托伐他汀 15 mmol/L 就能使 MCP-1 降低 15.9%,使  $\text{PGI}_2$  升高 6.4%,随着阿托伐他汀浓度的增加, MCP-1 逐渐降低,  $\text{PGI}_2$  逐渐升高,提示阿托伐他汀能保护内皮细胞并改善 HCY 损伤的内皮细胞功能,且呈浓度依赖关系,从而发挥预防动脉粥样硬化的发生<sup>[12]</sup>、稳定斑块、减少缺血事件的作用。阿托伐他汀作用最强为 30 mmol/L 时,在 30 mmol/L 与 50 mmol/L 组之间 MCP-1、 $\text{PGI}_2$  的浓度有所变化,但没有显著性差异,说明进一步增加浓度并不能使内皮细胞获得更多的保护。由此推测阿托伐他汀的作用机制可能通过抑制核因子  $\kappa$ B 细胞信号通路的激活<sup>[9]</sup>,抑制 MCP-1 在内皮细胞的表达,从而减少单核细胞与内皮细胞的粘附,抑制动脉粥样硬化的形成和发展。另外阿托伐他汀还促使内皮细胞分泌  $\text{PGI}_2$ ,增高局部  $\text{PGI}_2$  浓度,通过  $\text{PGI}_2$  受体扩张血管,增加血流,改善内皮细胞的营养状况,起到抗炎、保护内皮完整性的作用。这些作用对于发挥内皮细胞维持血管稳态、防止血管痉挛及血栓形成有重要的意义<sup>[12-14]</sup>。

本研究证明阿托伐他汀具有保护 HCY 损伤内皮细胞的功能,提示阿托伐他汀可用于高半胱氨酸血症的治疗,其临床疗效尚需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease [J]. *Circulation*, 2001, **103** (22): 2 717-723.
- [2] Ross R. Atherosclerosis —an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126.
- [3] Zineh I, Luo X, Welder GJ, Wessel TR, Arant CB, Schofield RS, et al. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors [J]. *Pharmacotherapy*, 2006, **26** (3): 333-340.
- [4] Walch L, Massade L, Dufilho M, Brunet A, Rendu F. Proatherogenic effect of interleukin-4 in endothelial cells: Modulation of oxidative stress, nitric oxide and monocyte chemoattractant protein 1 expression [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **187** (2): 285-291.
- [5] Arefieva TI, Kukhtina NB, Antonova OA, Krasnikova TL. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades [J]. *Cytokine*, 2005, **31** (6): 439-446.
- [6] Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis [J]. *N Engl J Med*, 1998, **338** (15): 1 042-050.
- [7] Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease [M]. In: Francis RB Jr. *Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function*. New York: Marcel Dekker, 1992, 183-236.
- [8] 冯相平,董文彬,陈新山. 冠心病猝死冠状动脉粥样硬化斑块单核细胞趋化蛋白 1 表达的研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2006, **34** (7): 598-601.
- [9] Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL, et al. Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor- $\kappa$ B in endothelial cells via oxidative stress [J]. *Circulation Research*, 2004, **94** (1): 28-36.
- [10] Clifton DR, Rydkina E, Huyck H, Pryhuber G, Freeman RS, Silverman DJ, et al. Expression and secretion of chemotactic cytokines IL-8 and MCP-1 by human endothelial cells after *Rickettsia rickettsii* infection: regulation by nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B [J]. *Int J Med Microbiol*, 2005, **295** (4): 267-278.
- [11] 邢玮,邓仲端,瞿智玲,倪娟. 同型半胱氨酸诱导 THP-1 单核细胞产生巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$  [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 9-12.
- [12] Lorkowska B, Chlopicki S. Statins as coronary vasodilators in isolated bovine coronary arteries-involvement of  $\text{PGI}_2$  and NO [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, **72** (2): 133-138.
- [13] Levine L. Statins stimulate arachidonic acid release and prostaglandin  $\text{I}_2$  production in rat liver cells [J]. *Lipids Health Dis*, 2003, **2** (1): 1 150-159.
- [14] Santodomingo-Garzon T, Cunha TM, Verri WA Jr, Valerio DA, Parada CA, Poole S, et al. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, **149** (1): 14-22.

(此文编辑 文玉珊)