

## 脱氢表雄酮对氧化型低密度脂蛋白诱导的平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响及其机制

程恒辉, 胡晓静, 阮秋蓉

(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; 脱氢表雄酮; 氧化型低密度脂蛋白; 单核细胞趋化蛋白 1; 细胞色素 P450 芳香酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察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单核细胞趋化蛋白 1 的影响, 并探讨其作用机制是否与细胞色素 P450 芳香酶的催化作用有关。方法 使用脂质体转染法将含有细胞色素 P450 芳香酶基因的质粒和空白对照质粒分别转染至体外培养的血管平滑肌细胞, 24 h 后给予氧化型低密度脂蛋白诱导及脱氢表雄酮刺激, 采用逆转录聚合酶链反应、实时荧光定量聚合酶链反应及酶联免疫吸附法检测转染后各组细胞单核细胞趋化蛋白 1 的基因和蛋白表达水平。结果 与氧化型低密度脂蛋白刺激组比较, 给予氧化型低密度脂蛋白和脱氢表雄酮后单核细胞趋化蛋白 1 的分泌明显降低 ( $P < 0.05$ )。转染含有细胞色素 P450 芳香酶基因的质粒组和空白对照质粒组单核细胞趋化蛋白 1 的分泌差别不明显 ( $P > 0.05$ )。结论 脱氢表雄酮能抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 的分泌升高, 可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。而这一过程可能并不通过转化为雌雄激素而发挥, 也许与其本身的生物学活性有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Study on the Influence of Dehydroepiandrosterone on the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein and Its Mechanism

CHENG Heng-Hui, HU Xiao-Jing, and RUAN Qiu-Rong

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

[KEY WORDS] Dehydroepiandrosterone; Oxidized Low Density Lipoprotein; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Cytochrome P450 Aromatase; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of dehydroepiandrosterone on expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in vascular smooth muscle cells, and investigate whether its mechanism has something to do with the catalysis of the cytochrome P450 aromatase (CYP19). **Methods** Transiently transfected the plasmid with or without CYP19 into cultured vascular SMC respectively by liposome transfection. 24 h later, the cells were stimulated with ox-LDL and DHEA. Using the method of RT-PCR, Realtime PCR, ELISA, the gene and protein of MCP-1 expression levels of each group were detected. **Results** Compared with the group stimulated by ox-LDL, the secretion level of MCP-1 was obviously reduced after given ox-LDL and DHEA ( $P < 0.05$ ). There wasn't obvious difference of MCP-1 expression in the groups of transfected plasmid with or without CYP19 ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** DHEA shows inhibiting effects on ox-LDL-induced MCP-1 expression in vascular SMC, which may be one of the mechanisms of its antiatherosclerosis. And this effect is not mediated by CYP19.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。单核细胞在血管内皮下聚集, 吞噬脂质形成泡沫细胞是 As 早期的主要特征, 而单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 则是这一过程的重要调节因子<sup>[2]</sup>。脱氢表

雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 是由肾上腺分泌的体内血浆含量最高的一种弱雄激素<sup>[3]</sup>。许多学者研究表明, DHEA 可能是人体的一种内源性抗 As 因子<sup>[4]</sup>, 因而具有治疗及预防 As 的应用前景。但目前对其作用机制知之甚少。本研究通过培养 SD 大鼠血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC), 观察 DHEA 对氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 诱导的血管 SMC 分泌 MCP-1 的影响, 从 SMC 的角度说明 DHEA 的抗 As 作用<sup>[5]</sup>。本研究旨在通过转染含有细胞色素 P450 芳香酶基因

[收稿日期] 2006-12-04 [修回日期] 2007-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30300135); 湖北省自然科学基金 (2005ABA166)

[作者简介] 程恒辉, 硕士研究生, 研究方向为心血管病理, E-mail 为 dx-ehh@yahoo.com.cn。胡晓静, 硕士研究生。通讯作者阮秋蓉, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管和乳腺病理。

(CYP19)的质粒和空白对照质粒于血管 SMC 中,给予  $\alpha$ -LDL 诱导及 DHEA 刺激后,通过检测细胞分泌 MCP-1 的量来判断 DHEA 是否通过转化为雌雄激素而发挥抗 As 作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

胎牛血清、M199 培养基、DMEM/F12 培养基和 OPTI-MEM 培养基购自 Gibco 公司; DHEA 购自 Fluka 公司; Lipofectamine 2000、引物和 Trizol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、Olig(dT) 和 Realtime PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司; ELISA 试剂盒购自 Biosource 公司; 无内毒素质粒大提试剂盒购自 Omega 公司;  $\alpha$ -LDL 和 pEGFP-C3 质粒由本院生物化学教研室提供; PCMV-CYP19 质粒和 PCMV 质粒由美国加州大学 Conley 教授惠赠<sup>[6]</sup>。

### 1.2 SD 大鼠血管平滑肌细胞的原代培养

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,贴壁法培养血管 SMC,以含 10% 胎牛血清和 0.03% 谷氨酰胺的 M199 培养基培养,光学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  $\alpha$ -actin 单抗鉴定血管 SMC。细胞纯度达 95% 以上,取第 3~4 代细胞用于实验。

### 1.3 转染方法及效率检测

在 24 孔板内,分别接种不同密度的血管 SMC,使细胞种植密度分别为  $0.5 \times 10^5$  个/L、 $1.0 \times 10^5$  个/L、 $1.5 \times 10^5$  个/L、 $2.0 \times 10^5$  个/L,每种密度各六孔,M199+10% 胎牛血清培养 24 h 后移出培养基,用 OPTI-MEM 无血清培养基清洗并替换。将 pEGFP-C3 质粒 DNA 与转染试剂 Lipofectamine 2000 分别以 1:0.5、1:1、1:2、1:2.5、1:3 及 1:4 用 OPTI-MEM 稀释后混合 20 min。混合后的转染复合物分别加入不同种植密度培养孔中,使每种种植密度都有六种不同比例的转染复合物。转染 6 h 后更换为普通生长培养基。转染 24 h 后于荧光相差显微镜下观察转染效率,确定种植密度及转染复合物比例。

### 1.4 转染细胞分组

将血管 SMC 接种至 12 孔板中,M199+10% 胎牛血清培养 24 h 后,分别转染 PCMV-CYP19 质粒或者 PCMV 质粒。24 h 后更换 OPTI-MEM 无血清培养基培养 2 h,使细胞处于同步状态,然后进行分组:

CYP19 组为 OPTI-MEM 无血清培养基;④ CYP19+ $\alpha$ -LDL 组为 OPTI-MEM 无血清培养基+50 mg/L  $\alpha$ -LDL;⑤ CYP19+ $\alpha$ -LDL+DHEA 组为 OPTI-MEM 无血清培养基+50 mg/L  $\alpha$ -LDL+ $2 \times 10^{-7}$  mol/L DHEA;对照质粒组为 OPTI-MEM 无血清培养基;

对照质粒+ $\alpha$ -LDL 组为 OPTI-MEM 无血清培养基+50 mg/L  $\alpha$ -LDL;对照质粒+ $\alpha$ -LDL+DHEA 组为 OPTI-MEM 无血清培养基+50 mg/L  $\alpha$ -LDL+ $2 \times 10^{-7}$  mol/L DHEA。24 h 后收集细胞及上清液。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测单核细胞趋化蛋白 1 基因的表达

用 Trizol 一步法提取各组细胞 RNA,紫外分光光度法测量 RNA 的纯度和浓度。每组取 4  $\mu$ g 总 RNA 逆转录成为 cDNA,再取 1  $\mu$ L 产物进行 PCR 循环。反应体系为 20  $\mu$ L: 10  $\times$  buffer 2  $\mu$ L, dNTP 0.4  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ L, Tag 酶 0.2  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,剩余用无菌三蒸水补足。MCP-1 引物序列正义为 5' CCT GTT GTT CAC AGT TGC TGC C 3',反义为 5' TCT ACA GAA GTG CTT GAG GTG GTT G 3',扩增产物长度 440 bp。内参照  $\beta$ -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',扩增产物长度 173 bp。循环参数 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 59  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环。取 5  $\mu$ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, Goldwell 染色,紫外线下扫描记录电泳结果。再用 SQ9636 型扫描系统扫描, HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统检测各组目的基因及内参的积分吸光度值(A),并以两者比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

### 1.6 实时荧光定量聚合酶链反应检测转染细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因的表达

逆转录步骤同上。反应体系 20  $\mu$ L: 模板 2  $\mu$ L,上下游引物各 0.4  $\mu$ L, SYBR Green Realtime Master Mix 10  $\mu$ L,剩余用无菌三蒸水补足。并设三管标准品对照。各反应管放入 ABI GeneAmp 5700 荧光定量检测仪进行 PCR 扩增,循环条件同上。根据标准品建立的标准曲线,由软件自动计算出待测样本中 MCP-1 DNA 的准确含量。

### 1.7 酶联免疫吸附法检测转染细胞单核细胞趋化蛋白 1 蛋白的表达

按照试剂盒上的操作步骤检测所收集的上清液中 MCP-1 蛋白含量。结果以酶标仪在 492 nm 处的吸光度值(A)表示。

### 1.8 统计学分析

实验每组样品 3 份,重复 3 次。采用 SPSS 12.0

软件进行统计学分析,主要统计指标进行正态性检验,正态分布的各个统计指标以  $\bar{x} \pm s$  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  $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血管平滑肌细胞转染的最佳条件及效率

将 24 孔板中转染 24 h 后的细胞于荧光相差显微镜下观察,SMC 在  $2.0 \times 10^8$  个/L,质粒 DNA 与转染试剂以 1:2 混合时转染效率最高(图 1)。

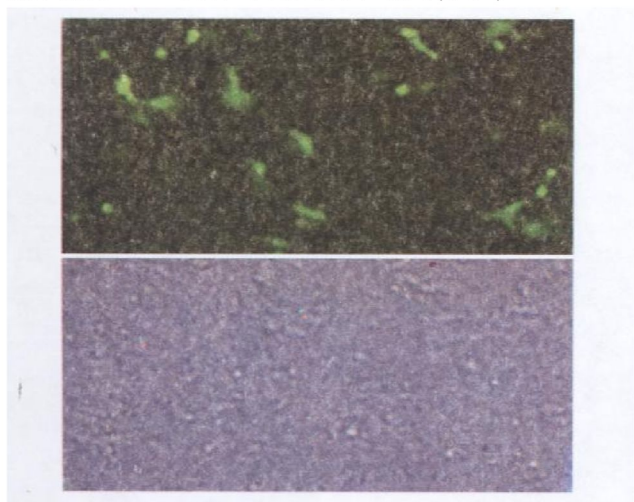


图 1. 血管平滑肌细胞的转染效率 上为荧光显微镜下转染成功的细胞,下为同视野光镜下的细胞(100 $\times$ )。

### 2.2 转染细胞单核细胞趋化蛋白 1 基因的表达

CYP19+  $\alpha$ -LDL 组和对照质粒+  $\alpha$ -LDL 组 MCP-1 mRNA 的表达高于其它各组( $P < 0.05$ ),而 CYP19+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组与对照质粒+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组比较 MCP-1 mRNA 的表达无明显差异(表 1)。

### 2.3 转染细胞单核细胞趋化蛋白 1 蛋白的表达

CYP19+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组与对照质粒+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组比较 MCP-1 蛋白表达水平无明显差异(表 1)。

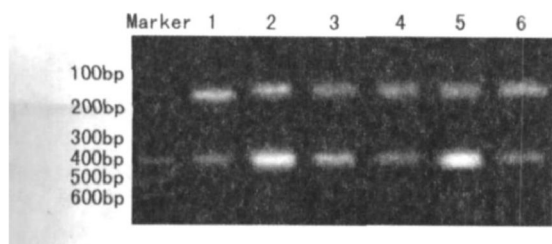


图 2. 转染细胞单核细胞趋化蛋白 1 逆转录聚合酶链反应产物电泳 1 为 CYP19 组,2 为 CYP19+  $\alpha$ -LDL 组,3 为 CYP19+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组,4 为对照质粒组,5 为对照质粒+  $\alpha$ -LDL 组,6 为对照质粒+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组。

表 1. 血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 和蛋白的表达

分 组	mRNA	蛋白(ng/L)
CYP19 组	1 925 $\pm$ 113 <sup>ab</sup>	44.4 $\pm$ 5.1 <sup>cd</sup>
CYP19+ $\alpha$ -LDL 组	2 613 $\pm$ 301	47.7 $\pm$ 5.0 <sup>cd</sup>
CYP19+ $\alpha$ -LDL+ DHEA 组	1 822 $\pm$ 220 <sup>ab</sup>	19.3 $\pm$ 3.4
对照质粒组	1 714 $\pm$ 173 <sup>ab</sup>	44.9 $\pm$ 3.5 <sup>cd</sup>
对照质粒+ $\alpha$ -LDL 组	2 387 $\pm$ 244	49.5 $\pm$ 5.1 <sup>cd</sup>
对照质粒+ $\alpha$ -LDL+ DHEA 组	1 914 $\pm$ 266 <sup>ab</sup>	22.5 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与 CYP19+  $\alpha$ -LDL 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与对照质粒+  $\alpha$ -LDL 组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 CYP19+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与对照质粒+  $\alpha$ -LDL+ DHEA 组比较。

## 3 讨论

脱氢表雄酮(DHEA)是主要由肾上腺皮质细胞合成的一种弱雄激素,是血清中含量最多的一类类固醇激素。它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。因此被称为“青春激素”<sup>[7]</sup>。由于 DHEA 随年龄的增加而递减的特点,人们的许多研究发现 DHEA 与许多老年性疾病关系密切,尤其在抗 As 方面发挥了重要作用。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 DHEA 有着密切的关系<sup>[8]</sup>。并且目前已有将 DHEA 应用于临床的报道<sup>[9]</sup>。

本研究组对未转染细胞 MCP-1 的表达作了相关研究<sup>[5]</sup>,以  $\alpha$ -LDL 作为刺激因素,观察 DHEA 在 As 发生过程中对血管 SMC MCP-1 表达水平的影响,来阐明 DHEA 作用的可能机制。研究结果发现,使用 50 mg/L  $\alpha$ -LDL 作用于血管 SMC 24 h 后,可以显著促进 MCP-1 mRNA 水平的表达。同时给予 50 mg/L  $\alpha$ -LDL 以及 DHEA 作用 24 h 后, MCP-1 mRNA 的表达显著降低,表明 DHEA 能够抑制  $\alpha$ -LDL 诱导的细胞 MCP-1 的基因表达。单独使用 DHEA 作用于血管 SMC 24 h 后, MCP-1 mRNA 表达水平与正常对照组无明显差异,说明 DHEA 对正常细胞的 MCP-1 表达并无影响。这些均提示 DHEA 通过影响血管 SMC MCP-1 的表达而发挥抗 As 的作用。

脱氢表雄酮(DHEA)具有广泛的生物学活性,而它本身只是一种弱雄激素,是体内性激素的前体物质,因此很多学者认为 DHEA 在体内主要通过转化为雌雄激素而发挥作用<sup>[10]</sup>。CYP19 是细胞色素 P450 家族的一员,广泛存在于细胞中。它是 DHEA 转化为雌雄激素的关键酶。因此, CYP19 活性的高低正是 DHEA 对特定组织细胞作用强弱的关键因素。但是,也有不少学者认为 DHEA 的抗 As 作用并

未通过转化为雌雄激素。Simoncini 等<sup>[11]</sup>报道, DHEA 并没有在内皮细胞转化为雌激素和雄激素, 而且它的基因作用和非基因作用不受雌激素、黄体酮、糖皮质激素或者雄激素受体拮抗剂的阻滞。Zapata 等<sup>[12]</sup>发现, DHEA 能够通过增强 p53 和 p21 的表达, 限制 Rb 蛋白磷酸化, 从而抑制人脐静脉内皮细胞的增殖, 并且这一过程也不依赖于雄激素和雌激素。Williams 等<sup>[13]</sup>发现, DHEA 通过其特异性受体干预细胞外信号调节激酶 1 (ERK-1) 磷酸化, 从而抑制人类血管 SMC 的增殖, 而此作用不受雄激素或者雌激素受体的影响。另外, Furutama 等<sup>[14]</sup>认为 DHEA 的作用可能通过直接与细胞上特异性位点相结合而引发, 与其在外周组织的代谢、转化无关。

为了明确在血管 SMC 中, DHEA 是否是通过转化为雌雄激素而发挥其抗 As 的作用, 我们将 CYP19 高表达载体通过脂质体转染至体外培养的血管 SMC 中, 给予 ox-LDL 刺激和 DHEA 拮抗氧化, 检测 MCP-1 的表达水平。如果 DHEA 是通过转化为雌雄激素而发挥抗 As 作用, 在高表达 CYP19 的细胞中, DHEA 大量转化为雌雄激素, 则抗 As 作用应该明显高于普通细胞。而我们的结果显示, CYP19 + ox-LDL + DHEA 组与对照质粒 + ox-LDL + DHEA 组比较无论是基因水平还是蛋白水平, 两组差异均没有统计学意义, 提示 DHEA 可能不通过雌激素受体通路发挥其生物学效应, 而很有可能与其自身的生物学活性有关。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammation disease [J]. *N Engl Med*, 1999, **340**: 115-126.
- [2] Chen YL, Chang YL, Jiang MJ. Monocyte chemotactic protein 1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 115.
- [3] Corrigan B. DHEA and sport [J]. *Clin J Sport Med*, 2002, **12** (4): 236-241.
- [4] Porčová A, Dutoit I, Šulcová J, Stárka L. Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease [J]? *Physiol Res*, 2000, **49** (Suppl1): s43-s56.
- [5] 丁艳萍, 阮秋蓉, 胡晓静. 脱氢表雄酮对氧化低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞中 VCAM-1 和 MCP-1 表达的影响 [J]. *河南科技大学学报 (医学版)*, 2006, **24** (3): 166-168.
- [6] Conley A, Mapes S, Corbin CJ, Greger D, Walters K, Trant J, et al. A comparative approach to structure-function studies of mammalian aromatases [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, **79** (1-5): 289-297.
- [7] Zdrojewicz Z, Ciszko B. Dehydroepiandrosterone (DHEA)—structure, clinical importance and the role in human body [J]. *Postępy Hig Med Dosw*, 2001, **55** (6): 835-854.
- [8] Vatalas IA, Dionys-Asteriou A. Adrenal C19 steroids and lipoprotein levels in healthy men [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001, **1** (6): 388-393.
- [9] Silvestri A, Gambacciani M, Vitale C, Monteleone P, Ciaponi M, Fini M, et al. Different effect of hormone replacement therapy, DHEAS and tibolone on endothelial function in postmenopausal women with increased cardiovascular risk [J]. *Maturitas*, 2005, **50** (4): 305-311.
- [10] Hayashi T, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Thakur NK, et al. Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: The possible role of nitric oxide [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (3): 782-792.
- [11] Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR. Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**: 3449-455.
- [12] Zapata E, Ventura JL, De La Cruz K, Rodriguez E, Damian P, Masso F, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the proliferation of human umbilical vein endothelial cells by enhancing the expression of p53 and p21, restricting the phosphorylation of retinoblastoma protein, and is androgen- and estrogen-receptor independent [J]. *FEBS J*, 2005, **272**: 1343-353.
- [13] Williams MR, Ling S, Dawood T, Hashimura K, Dai A, Li H, et al. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87**: 176-181.
- [14] Furutama D, Fukui R, Amakawa M, Ohsawa N. Inhibition of migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by dehydroepiandrosterone sulfate [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1406** (1): 107-114.

(此文编辑 文玉珊)