

[文章编号] 1007-3949(2008)16-12-0957-04

• 实验研究 •

阿托伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞内皮脂肪酶表达的影响

边云飞, 成丽英, 杨晓静, 赵欣, 肖传实

(山西医科大学第二医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 阿托伐他汀; 内皮脂肪酶; 大鼠主动脉平滑肌细胞

[摘要] 目的 观察阿托伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞内皮脂肪酶表达的影响。方法 原代培养的大鼠主动脉平滑肌细胞中先加入 $50 \mu\text{g/L}$ 的肿瘤坏死因子 α , 1 h 后加入不同浓度 ($1 \times 10^{-7} \text{ mmol/L}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mmol/L}$ 和 $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$) 的阿托伐他汀, 继续孵育 24 h 后, 收集细胞, 采用逆转录聚合酶链反应检测培养的平滑肌细胞中内皮脂肪酶 mRNA 的表达情况。另外, 取阿托伐他汀 $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$ 浓度, 分别在 6、12 和 24 h 用同样的方法检测培养细胞中内皮脂肪酶 mRNA 表达情况。结果 随阿托伐他汀浓度的增加, 肿瘤坏死因子 α 诱导的平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 表达水平呈下降趋势, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 不同浓度组之间比较亦有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$ 阿托伐他汀作用下, 随着作用时间的延长平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 表达水平亦呈下降趋势, 与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$), 不同时间组之间比较亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 随着阿托伐他汀浓度的增加与作用时间的延长, 肿瘤坏死因子 α 诱导的平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 的表达均呈下降趋势。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Tumor Necrosis Factor- α Induced Endothelial Lipase Secreting by Rat Vascular Smooth Muscle Cell

BIAN Yun-Fei, CHENG Li-Ying, YANG Xiao-Jing, ZHAO Xin, and XIAO Chuan-Shi

(The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Pathophysiology, Atorvastatin, Endothelial Lipase, Rat Vascular Smooth Muscle Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of atorvastatin on TNF- α induced endothelial lipase secreting by rat vascular smooth muscle cells. **Methods** The rat vascular smooth muscle cells were obtained from thoracic aortas and cultured by tissue explant method. Rat vascular smooth muscle cells were first incubated in serum-free medium with $50 \mu\text{g/L}$ Tumor necrotic factor- α . 1 hour later, atorvastatin with different concentration ($1 \times 10^{-7} \text{ mmol/L}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mmol/L}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$) were added to the medium. 24 hours later, cells of different groups were collected and endothelial lipase mRNA levels were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. In another group with atorvastatin concentration of $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$, endothelial lipase levels were respectively determined after 6, 12 and 24 hours. **Results** Endothelial lipase expressions of atorvastatin intervent groups ($1 \times 10^{-7} \text{ mmol/L}$, $1 \times 10^{-6} \text{ mmol/L}$, $1 \times 10^{-5} \text{ mmol/L}$) decreased significantly vs TNF- α group ($P < 0.05$). The levels of endothelial lipase expression decreased initially with the atorvastatin concentration raise ($P < 0.05$). Endothelial lipase expressions of atorvastatin time-intervent groups (6, 12, 24 h) decreased significantly vs TNF- α group ($P < 0.05$). The levels of endothelial lipase expression decreased initially with the time extended ($P < 0.05$). **Conclusions** Atorvastatin can inhibit endothelial lipase mRNA secreting by tumor necrotic factor- α stimulated vascular smooth muscle cells in a concentration-time dependent manner.

近年研究认为他汀类药物除具有调脂作用外, 还能够抑制血管内皮的炎症反应、稳定粥样斑块、改善血管内皮功能和延缓动脉粥样硬化 (atherosclerosis) 进展^[1,2]。

内皮脂肪酶 (endothelial lipase, EL) 做为脂肪酶家族的新成员^[3-5], 与他汀类药物的相关性如何? 目前国内外报道甚少。本研究选用目前公认的炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrotic factor- α , TNF- α) 为诱导因素, 观察他汀类药物对 TNF- α 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) EL 表达的影响, 进一步了解他汀类药物抗 As^[6,7] 的作用机制。

[收稿日期] 2008-11-10 [修回日期] 2008-12-10

[作者简介] 边云飞, 博士, 硕士研究生导师, 山西医科大学第二医院心内科副主任。研究方向为冠心病临床与基础。联系电话为 0351-3362132, E-mail 为 zero1ying515@sohu.com。通讯作者肖传实, 博士, 博士研究生导师, 山西医科大学第二医院心内科主任, 研究方向为冠心病临床与基础, 联系电话为 0351-3362132, E-mail 为 ganxirbaozhongxin@sina.com。

1 材料和方法

1.1 实验材料

健康 SD 大鼠, 3~4 周龄, 体重 120 g 左右, 购自山西医科大学实验动物中心, 血管平滑肌细胞来源于大鼠胸腹主动脉。DMEM 培养粉 (Gibco 公司, 美国)、胎牛血清 (杭州四季青生物材料工程公司)、胰蛋白酶 (Solarbio, Spain)、IL-1 β (Pepro TECH, 美国)、TNF- α (BioVision, 美国)、RT-PCR 试剂盒 (Takara, 大连)、PCR 引物 (上海生工工程有限公司合成)、阿托伐他汀 (美国辉瑞公司馈赠)、HERA cell 150 细胞培养箱、倒置显微镜 (Nikon TS100 日本)、荧光倒置显微镜 (Olympus IX50 日本)、梯度 PCR 仪 (PTC-200, Bio-rad, 美国)、凝胶成像系统 (GelDoc, Bio-rad, 美国)、超净工作台 (Longhong, 中国)。

1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

颈椎脱臼处死动物, 无菌条件下取胸腹主动脉段, 置入 20% 胎牛血清 DMEM 培养基中, 用眼科直剪将主动脉纵行抛开, 拿棉签破坏内皮, 随后剪为 1.5 mm $\times$ 1.5 mm 小块, 内膜面向下贴入 25 cm² 培养瓶中, 加入 20% DMEM 3 mL, 底面向上放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中, 6 h 后小心翻转瓶体。细胞长至瓶底 70% 时, 以 0.125% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化, 1:2 传代, 换为 10% DMEM 培养。传至第 3 代后进行实验, 给予干预措施时培养液改为含 3% 胎牛血清的 DMEM。采用免疫荧光法检测胞质 α -肌动蛋白进行细胞鉴定。

1.3 药品准备

将阿托伐他汀 (atorvastatin, AT) 溶于 95% 乙醇溶液中, 50 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 使其在体外转化成活性形式, 然后用三蒸水稀释, 使其最终乙醇浓度为 2% (体积分数), 有研究表明 2% 浓度的乙醇溶液不影响细胞的生理功能, 药品配置浓度分别为 2×10^{-4} mmol/L、 2×10^{-5} mmol/L 和 2×10^{-6} mmol/L。

1.4 实验分组

将细胞按照下列要求分组: 对照组: 不加干预措施原培养液继续培养; ④TNF- α 组: 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 加入终浓度为 50 μ g/L TNF- α 分别作用 6、12 和 24 h; ④AT 组: 加入 AT 10^{-5} mmol/L 与 VSMC 作用 24 h; TNF- α + AT (不同浓度) 组: 加 AT 前 1 h 先加入终浓度为 50 μ g/L TNF- α , 再加入 AT 使其终浓度分别为 10^{-7} mmol/L、 10^{-6} mmol/L 和 10^{-5} mmol/L, 继续培养 24 h; TNF- α + AT (不同时间) 组: 加 AT 前 1 h 先加入终浓度为 50

μ g/L TNF- α , 再加入 AT 使其终浓度为 10^{-5} mmol/L 分别作用 6、12 和 24 h 按实验分组要求收集细胞。

1.5 MTT 法观察细胞增殖

将传代的进入对数生长期细胞按一定密度 (5×10^7 /L) 接种在 96 孔培养板中, 待细胞贴壁生长融合至 80% 时, 弃去培养液, 分别加入终浓度为 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 和 10^{-5} mmol/L AT 的培养液。每个浓度设 6 个复孔, 每孔体积为 200 μ L。将培养板放入 CO₂ 孵箱, 培养 3、6、12、24 和 48 h 后, 取出培养板。加入 5% MTT 染料溶液 25 μ L, 放入培养箱内继续培养 4 h, 取出培养板。弃去上清液, 加入二甲基亚砜 100 μ L, 温室内放置 30 min, 待蓝色结晶充分溶解后, 在 490 nm 下的酶标仪上读取 OD 值。为排除培养液中营养成分消耗对结果产生的影响, 每隔 24 h 换一次培养液。记录结果。设空白对照, 调零孔。

1.6 RT-PCR 检测大鼠主动脉平滑肌细胞内皮脂酶 mRNA 的表达

应用 TRIZOL Reagent 提取各处理组细胞总 RNA, 分别取 3 μ L RNA 在 10 μ L 反应体系中逆转录合成 cDNA, 取 10 μ L cDNA 于 50 μ L 反应体系中进行 PCR 扩增。EL 引物上游 5'-CCATTACCACCAAACCTC-3', 下游 5'-TGCCCACTGTTCCCTTCAC-3'; GADPH 引物上游 5'-ATCGTGGCCGC-CCTAGGCA-3', 下游 5'-TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG-3'。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 然后进行 40 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s $\rightarrow$ 50 $^{\circ}$ C 退火 40 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物 10 μ L, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 应用 GADPH 作为内参照。用 Image Master TotalLab 生物学软件分析条带的吸光度值, 与内参 GADPH 条带的吸光度值相比来校正, 各组间进行比较。

1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 干预组与对照组之间采用 Dunnett-t 检验, 各干预组之间采用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉平滑肌细胞的培养与鉴定

倒置相差显微镜下观察原代培养的大鼠主动脉平滑肌细胞, 可见细胞形状多样, 一般为梭形, 带形, 三角形或星形。在荧光显微镜下扫描, VSMC 核周胞质呈较强黄绿色荧光, 呈颗粒状存在或弥散分布, 而背景无荧光显示, 表明平滑肌细胞培养成功 (图

1)。

2 2 细胞活性

外源性加入不同浓度的阿托伐他汀后, 分别作

用 3、6、12、24 和 48 h 与对照组比较, 细胞增殖能力无明显变化。说明所用阿托伐他汀浓度本身对细胞没有毒性作用 (表 1)。

表 1 阿托伐他汀对培养的平滑肌细胞增殖活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

AT 浓度 (mmol/L)	n	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h
0	6	0.219 ± 0.010	0.296 ± 0.009	0.406 ± 0.007	0.433 ± 0.006	0.388 ± 0.012
10 ⁻⁷	6	0.221 ± 0.012	0.290 ± 0.008	0.407 ± 0.011	0.425 ± 0.005	0.398 ± 0.015
10 ⁻⁶	6	0.227 ± 0.010	0.297 ± 0.008	0.409 ± 0.009	0.428 ± 0.007	0.376 ± 0.011
10 ⁻⁵	6	0.223 ± 0.010	0.289 ± 0.007	0.405 ± 0.006	0.435 ± 0.006	0.389 ± 0.010

2 3 阿托伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠平滑肌细胞内皮脂肪酶表达的影响

随着给药浓度的增加, 阿托伐他汀对 TNF-α 诱导的 VSMC EL mRNA 表达的抑制作用逐渐增强, 阿托伐他汀的给药浓度分别为 1 × 10⁻⁷、1 × 10⁻⁶和 1 × 10⁻⁵ mmol/L, EL mRNA 的吸光度值分别与对照组、TNF-α 组和 AT 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 不同浓度组间比较亦有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2 和图 2); 在相同给药浓度 (1 × 10⁻⁵ mmol/L) 下, 随着给药时间的延长, 阿托伐他汀对 TNF-α 诱导的 EL 分泌的抑制逐渐增强, 阿托伐他汀给药时间分别为 6、12 和 24 h, EL mRNA 的吸光度值分别与 TNF-α 组比较有统计学意义, 条带亮度逐渐下降, 不同时间组间比较亦有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3 和图 3)。

表 2 不同浓度阿托伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	EL mRNA 相对值
空白对照组	0.387 ± 0.020
TNF-α 组	0.915 ± 0.021 ^a
AT 组	0.301 ± 0.202
10 ⁻⁷ mmol/L AT+ TNF-α 组	0.549 ± 0.143 ^{bc}
10 ⁻⁶ mmol/L AT+ TNF-α 组	0.491 ± 0.154 ^{bc}
10 ⁻⁵ mmol/L AT+ TNF-α 组	0.423 ± 0.103 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与对照组、TNF-α 组和 AT 组比较; c 为 $P < 0.05$ AT+ TNF-α 三组间比较。

表 3 阿托伐他汀作用不同时间对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	TNF-α 组	AT+ TNF-α 组
6	0.535 ± 0.016	0.502 ± 0.132 ^{ab}
12	0.597 ± 0.018	0.489 ± 0.125 ^{ab}
24	0.915 ± 0.021	0.423 ± 0.103 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与 TNF-α 组比较; b 为 $P < 0.05$ AT+ TNF-α 三组间比较。

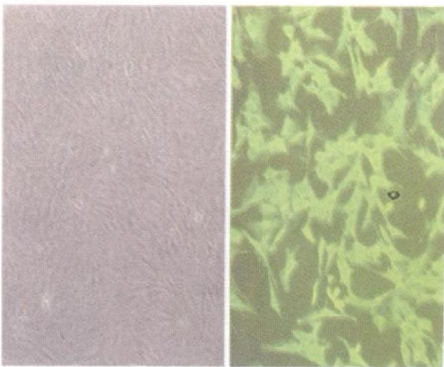


图 1 大鼠主动脉平滑肌细胞形态观察 (左图, ×100) 及肌动蛋白免疫荧光细胞鉴定 (右图, ×200)

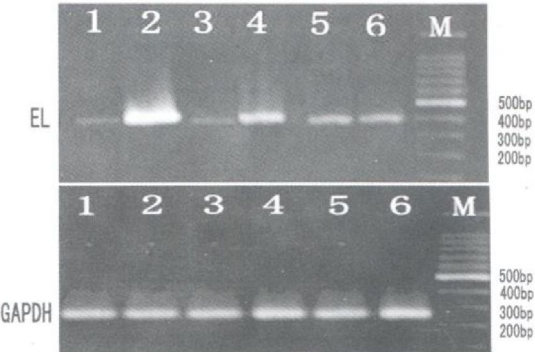


图 2 不同浓度的阿托伐他汀对肿瘤坏死因子 α 诱导的平滑肌细胞内皮脂肪酶 mRNA 表达的影响 M 为 DNA marker (100~ 1 500 bp), 1 为对照组未加任何干预, 2 为加 TNF-α (50 μg/L) 培养 24 h 3 为加入 AT 10⁻⁵ mmol/L 培养 24 h 4~ 6 为加 TNF-α (50 μg/L) 1 h 后分别加入 AT 10⁻⁷、10⁻⁶和 10⁻⁵ mmol/L 培养 24 h

3 讨论

他汀类药物作为新一类的调脂药物目前已被广泛应用于心血管事件的一级预防和二级预防中。但许多证据表明, 他汀类药物的作用相当复杂, 它对心血管事件的预防作用并不依赖于其调脂作用, 还包括调节血管内皮功能、减轻炎症反应及减少血栓形成等方面的作用^[8-9]。

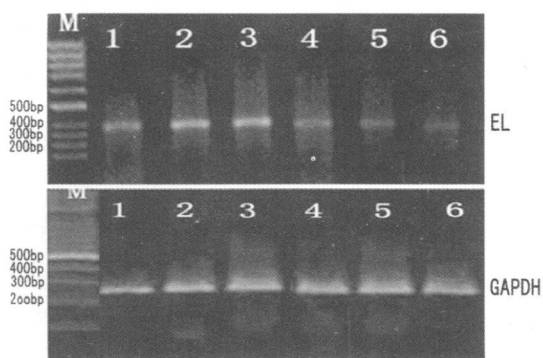


图3 阿托伐他汀作用不同时间对平滑肌细胞内皮脂脂肪酶 mRNA 表达的影响 M 为 DNA marker(100~1 500 bp); 1、2 和 3 为 TNF- α (50 μ g/L)作用 6、12 和 24 h; 4、5 和 6 为加入 AT (1×10^{-5} mmol/L)作用 6、12 和 24 h

脂蛋白代谢在正常血管的维持和粥样硬化病变的发生机制中起着重要的作用。脂蛋白代谢所涉及的脂肪酶包括脂蛋白脂肪酶、肝脂酶、胰脂酶及最近发现的一种脂肪酶家族新成员——内皮脂脂肪酶 (EL)^[10]。研究表明 EL 具有酶性与非酶性作用。虽然 EL 是甘油三酯脂酶家族中一员,且 EL 的氨基酸序列与脂蛋白脂肪酶和肝脂酶具有高度的同源性,但 EL 有个较小的盖状区域,由于该区域决定着酶的底物^[11],因此决定了 EL 与同家族的其它酶作用的底物不同。EL 主要水解高密度脂蛋白胆固醇,将高密度脂蛋白重塑成小颗粒,但不会引起载脂蛋白 A1 的裂解^[12],此为 EL 的酶活性作用。此外 EL 还具有非酶活性作用: EL 可以通过一种非酶活性的分子桥梁促使巨噬细胞摄取含载脂蛋白 B 的脂蛋白以及和单核/巨噬细胞粘附,这种分子桥梁要靠细胞表面的分子如载脂蛋白 E、蛋白多糖或受体参与^[12],抑制 EL 的酶活性,摄取低密度脂蛋白和胆固醇酯作用进一步增加,说明 EL 的酶活性与其结合脂蛋白的作用无关。

本研究采用 MTT 法来检测阿托伐他汀对平滑肌细胞的毒性作用影响。外源性加入不同浓度的阿托伐他汀后,分别作用 3、6、12、24 和 48 h 同对照组相比,细胞增殖能力无明显变化。说明本研究中所采用的药物浓度对细胞的正常生长是安全的。

鉴于目前关于他汀类药物对 EL 表达的影响相关报道甚少,本研究观察阿托伐他汀药物本身对细胞 EL 表达水平的影响作用。结果显示在培养液中加入阿托伐他汀的实验组,EL mRNA 表达水平与空白对照组比较,差异无显著性。实验已经证实随着 TNF- α 浓度的增加与作用时间的延长平滑肌细胞 EL 表达呈上升趋势。这与 Shimokawa 等^[13]的研究结果一致。在本研究结果中,阿托伐他汀可以抑制

炎症因子 TNF- α 诱导的平滑肌细胞 EL mRNA 的表达,随着阿托伐他汀浓度的升高,细胞表达 EL mRNA 逐渐减少。随着时间的延长阿托伐他汀对 TNF- α 诱导 EL mRNA 表达的抑制程度逐渐增强,EL 的表达呈下降趋势。认为阿托伐他汀可能通过抑制炎症因子而使 EL 水平下降;另外,可能通过抑制 EL 的酶性与非酶性作用,提高高密度脂蛋白胆固醇的水平,来发挥抗 As 的作用。为阿托伐他汀抗 As 作用机制进一步提供更新的证据。结合马天容^[14]的研究结果推断阿托伐他汀在 As^[15]中的作用机制还是个研究热点。

阿托伐他汀有可能是通过抑制炎症因子诱导的 EL 表达,调节炎症反应,进而抑制血栓形成和稳定斑块,这可能是他汀类药物抗炎和稳定斑块作用的机制之一,从而发挥抗 As 的作用。

[参考文献]

- [1] Pappolla MA. Statins incident Alzheimer disease change in cognitive function and neuropathology [J]. *Neurology*, 2008 **71** (24): 2 020-026
- [2] Hoffmann M, Novosielski M. DFT study on hydroxy acid-lactone inter-conversion of statins the case of atorvastatin [J]. *Org Biomol Chem*, 2008 **6** (19): 3 527-531
- [3] Fujii H, Fukuda A, Tanaka M, et al. Putative role of endothelial lipase in dialysis patients with hypoalbuminemia and inflammation [J]. *Am J Nephrol* 2008 **28** (6): 974-981
- [4] DeSantis P, Coleman T, Schickofer S, et al. Endothelial lipase a key player in HDL metabolism modulates inflammation and atherosclerotic risk [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008 **8** (6): 619-627
- [5] Qiu G, Hill JS. Endothelial lipase enhances low density lipoprotein binding and cell association in THP-1 macrophages [J]. *Cardiovasc Res* 2007 **76** (3): 528-538
- [6] 王红, 黄岚. 内皮祖细胞与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (9): 751-753
- [7] 章义利, 戴凌燕, 周秀云, 等. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (1): 29-32
- [8] Daniel J, Michael J, et al. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family [J]. *Current Opin Lipidol*, 2000 **11** (2): 141-147
- [9] Jaye M, Krawiec J. Endothelial lipase and HDL metabolism [J]. *Current Opin Lipidol*, 2004 **15** (2): 183-189
- [10] Badellino KO, Rader DJ. The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism [J]. *Current Opin Cardiol*, 2004 **19** (4): 392-395
- [11] Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins implications for cardiovascular event reduction [J]. *JAMA*, 1998 **279** (20): 1 643-650
- [12] Antonio M, Gotto J, John A. Pleiotropic effects of statins do they matter [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001 **12**: 391-394
- [13] Shimokawa Y, Hirata K, Ishida T, et al. Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension [J]. *Cardiovasc Res* 2005 **66** (3): 594-600
- [14] 马天容. 阿托伐他汀对内皮细胞内皮脂脂肪酶 mRNA 表达的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2005 **5** (43): 407-410
- [15] 赵景宏, 黄岚. 内皮脂脂肪酶与脂蛋白代谢和动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. *中华心血管病杂志*, 2005 **33** (5): 480-482

(此文编辑 李小玲)