

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0465-05

• 实验研究 •

血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1表达的影响

杨慧宇, 杨志明, 边云飞, 张娜娜, 梁 斌, 肖传实

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 血管紧张素(1-7); 血管紧张素Ⅱ; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[摘要] 目的 观察血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1表达水平的影响并探讨其可能作用机制。方法 采用胰蛋白酶消化法原代培养人脐静脉内皮细胞,取2~5代用于实验,培养的人脐静脉内皮细胞随机分为对照组、血管紧张素Ⅱ组、血管紧张素(1-7)组、血管紧张素Ⅱ+血管紧张素(1-7)组、血管紧张素Ⅱ+血管紧张素(1-7)+血管紧张素(1-7)特异性受体拮抗剂A-779组,通过半定量逆转录聚合酶链反应和流式细胞术分别检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1基因和蛋白表达水平;用免疫印迹法检测p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化的表达水平。结果 血管紧张素Ⅱ(10^{-6} mol/L)可以诱导血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1表达增加($P < 0.05$),血管紧张素(1-7)($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L)随着浓度的增加抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1表达水平增强($P < 0.05$);血管紧张素(1-7)特异性受体拮抗剂A-779可阻断血管紧张素(1-7)的上述效应($P < 0.05$)。与对照组相比,血管紧张素Ⅱ(10^{-6} mol/L)诱导后p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化表达水平显著增加($P < 0.05$);血管紧张素(1-7)($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L)随着浓度的增加抑制血管紧张素Ⅱ诱导的p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化表达水平增强($P < 0.05$),血管紧张素(1-7)特异性受体拮抗剂A-779可阻断血管紧张素(1-7)的上述效应($P < 0.05$)。结论 血管紧张素Ⅱ可诱导血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1及p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化表达增加,血管紧张素(1-7)抑制血管紧张素Ⅱ的上述效应,并且是通过其特异性受体发挥作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Angiotensin (1-7) on the Expression of Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Angiotensin II

YANG Hui-Yu, YANG Zhi-Ming, BIAN Yun-Fei, ZHANG Na-Na, LIANG Bin, and XIAO Chuan-Shi

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Angiotensin (1-7); Angiotensin II; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1; p38 Mitogen Activated Protein Kinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Angiotensin (1-7) (Ang (1-7)) on the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** HUVEC were isolated and cultured. Cultured HUVEC were incubated for 24 h with Ang-(1-7), Ang II, Ang (1-7) + A-779, Ang (1-7) + Ang II, A-779 + Ang II + Ang (1-7), respectively. And cultured HUVEC without incubating stimulator were chosen as controls. The expression of the mRNA and protein of LOX-1 was measured by RT-PCR and flow cytometry methods respectively. The expression of the phosphorylation of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) was determined by Western blotting. **Results** Compared with the Ang II group, Ang (1-7) dose-dependently inhibited the expression of LOX-1 in HUVEC ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression of the phosphorylation of p38 MAPK increased significantly in Ang II group ($P < 0.05$), while it was a little in Ang (1-7) group and A-779 group ($P > 0.05$). The expression of the phosphorylation of p38 MAPK reduced in Ang II + Ang (1-7) group compared with Ang II group ($P < 0.01$). The expression of the phosphorylation of p38 MAPK had no significant change in Ang II + Ang (1-7) + A-779 group ($P > 0.05$). **Conclusion** Ang(1-7) concentration dependently attenuate the expression of LOX-1 induced by Ang II in HUVEC through its specific receptor MAS, Ang (1-7) could inhibit the expression of the phosphorylation of p38 MAPK induced by Ang II in HUVEC, and then inhibit the Ang II-induced LOX-1 expression.

[收稿日期] 2009-02-20

[修回日期] 2009-04-02

[作者简介] 杨慧宇, 博士研究生, 研究方向为冠心病的基础与研究, E-mail 为 huiyuyang@yahoo.com.cn。杨志明, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床。通讯作者肖传实, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床。

近年研究发现,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的新成员血管紧张素(1-7) [angiotensin(1-7), Ang(1-7)]具有利钠利尿、降血压、抗增生等拮抗血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)的作用^[1]。血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)是氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在血管内皮细胞上的主要受体,介导 ox-LDL 对血管内皮细胞的损伤、功能失调,在动脉粥样硬化的形成和发展过程中发挥着重要作用^[2]。研究报道 Ang Ⅱ可诱导人冠状动脉内皮细胞 LOX-1 表达,促使其加速摄取 ox-LDL,介导 ox-LDL 对细胞的损害^[3]。Ang(1-7)是 Ang Ⅱ内源性的拮抗因子,但是 Ang(1-7)在体外能否抑制 Ang Ⅱ所诱导的内皮细胞 LOX-1 表达及其作用机制国内外报道甚少。p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一,介导的信号转导通路是生物信号引起核反应的重要通路,通过对细胞内信号的传递参与细胞对外界刺激的调节反应,与内皮细胞功能失调及凋亡密切相关^[4]。本研究通过 Ang Ⅱ诱导体外培养的 HUVEC,用不同浓度的 Ang(1-7)进行干预,观察 Ang(1-7)对 Ang Ⅱ诱导的 HUVEC LOX-1 及 p38 MAPK 磷酸化表达的影响,并选用 Ang(1-7)特异性受体拮抗剂 A-779 进行干预,对其可能的作用机制进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

健康新生儿脐带(山西医科大学第二医院妇产科提供);Ang Ⅱ、Ang(1-7)和 A-779(美国 Sigma 公司);山羊抗人 LOX-1 多克隆抗体、生物素化马抗山羊 IgG、标记荧光素的羊抗兔 IgG、vWF 免疫组织化学试剂盒、山羊 SP 试剂盒及 DAB 显色剂(北京中山生物技术有限公司);RT-PCR 试剂盒和引物(大连宝生物有限公司);Ⅷ因子相关抗原(北京中山生物试剂公司);磷酸化 p38 MAPK sc-17852-R 单克隆抗体(Santa Cruz 公司);p38 MAPK 5F11 单克隆抗体及蛋白抽提试剂盒(Cell Signaling 公司)。

1.2 原代人脐静脉内皮细胞的培养

采用酶消化法进行原代人脐静脉内皮细胞培养,选择生长良好的第 2~5 代细胞用于实验。采用形态学及抗Ⅷ因子抗体免疫荧光染色行内皮细胞鉴定。

1.3 实验分组

培养的细胞分为五组:①对照组;②Ang Ⅱ组(10^{-6} mol/L);③Ang(1-7)组(10^{-6} mol/L);④Ang Ⅱ + Ang(1-7)组:在加入 Ang Ⅱ 10^{-6} mol/L 基础上,分别加入不同浓度的 Ang(1-7) (10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L);⑤Ang Ⅱ + Ang(1-7) + A-779 组:在加入 Ang Ⅱ (10^{-6} mol/L)和 Ang(1-7) (10^{-6} mol/L)基础上加入 Ang(1-7)拮抗剂 A-779 (10^{-6} mol/L)。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 的表达

收集上述各组细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。LOX-1 引物正义 5'-TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC-3',反义 5'-AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC-3',扩增片段长度 193 bp;GAPDH 引物正义 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',反义 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3',扩增片段长度 318 bp。反应结束后,取反应产物 10 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UV 型凝胶图像分析系统摄图,并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值,以二者的比值代表各基因的表达量。

1.5 流式细胞术检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白的表达

收集细胞,加入 1:100 兔抗人 LOX-1 抗体,4℃ 孵育 1 h 然后以 0.1% BSA 缓冲液洗 1 次,除去未结合的一抗。加入标记荧光素的羊抗兔 IgG(工作浓度 1:100),4℃ 避光孵育 1 h,0.1% BSA 缓冲液洗 2 次,加入 PBS 重悬细胞。使用流式细胞仪检测表达 LOX-1 阳性细胞数,以标记抗体呈阳性的细胞百分率作为表达 LOX-1 蛋白的计量标准。

1.6 Western blotting 检测 p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化的表达

细胞总蛋白的提取按蛋白抽提产品说明书进行,Bradford 法测定蛋白浓度。以总 p38 MAPK 作为内参校正,用磷酸化 p38 MAPK 与同管内参总 p38 MAPK 强度的比值代表磷酸化 p38 MAPK 的相对表达含量。

1.7 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对实验数据进行 ANOVA 单因素方差分析,多重比较采用 LSD 和 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

刚分离的 HUVEC 呈圆形或椭圆形,多呈小团

存在,4 h 后细胞开始贴壁生长,之后很快生长成为多数单层小多角形集落,培养 2~3 天后,细胞生长迅速,集落增大,3~5 天开始汇合形成排列紧密的单层细胞。细胞呈鹅卵石样镶嵌排列,无重叠生长现象,细胞多呈多角形(图 1A)。培养的 HUVEC VⅢ因子相关抗原为阳性。在荧光倒置显微镜下,HUVEC 细胞核周胞浆呈较强黄绿色荧光,呈颗粒状存在或弥散分布,而背景无荧光显示(图 1B),表明所分离培养的细胞为血管内皮细胞。

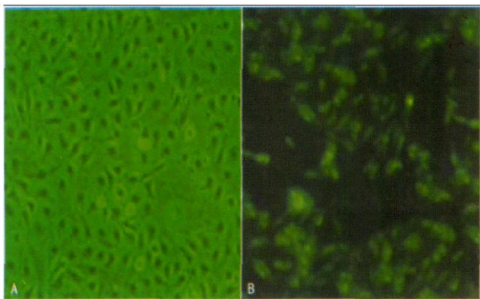


图 1. 人脐静脉内皮细胞鉴定(×100)

2.2 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的影响

AngⅡ诱导的 HUVEC LOX-1 mRNA 表达水平明显上调($P<0.05$);Ang(1-7)随着浓度增加抑制 AngⅡ诱导的 LOX-1 mRNA 表达作用增强($P<0.05$);A-779 干预后 LOX-1 mRNA 表达与 AngⅡ+Ang(1-7)组比较差异显著($P<0.05$),与 AngⅡ组比较差异无统计学意义。Ang(1-7)组 LOX-1 mRNA 表达与对照组比较差异亦无统计学意义(表 1 和图 2)。

表 1. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的影响

分 组	LOX-1 mRNA 相对值
对照组	0.387±0.018
Ang(1-7)组	0.375±0.015
AngⅡ组	1.089±0.012 ^a
AngⅡ+10 ⁻⁹ mol/L Ang(1-7)组	1.017±0.01 ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁸ mol/L Ang(1-7)组	0.798±0.023 ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁷ mol/L Ang(1-7)组	0.619±0.018 ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁶ mol/L Ang(1-7)组	0.533±0.011 ^{ab}
AngⅡ+Ang(1-7)+A-779 组	1.025±0.014 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 AngⅡ组比较。

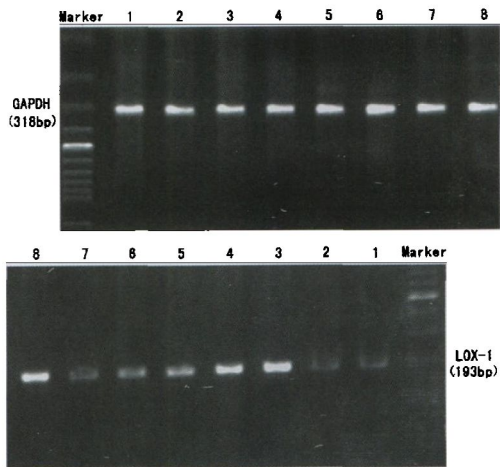


图 2. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 mRNA 表达的影响($n=3$) 1 为对照组,2 为 Ang(1-7)组,3 为 AngⅡ组,4 为 AngⅡ+10⁻⁹ mol/L Ang(1-7)组,5 为 AngⅡ+10⁻⁸ mol/L Ang(1-7)组,6 为 AngⅡ+10⁻⁷ mol/L Ang(1-7)组,7 为 AngⅡ+10⁻⁶ mol/L Ang(1-7)组,8 为 AngⅡ+Ang(1-7)+A-779 组。

2.3 血管紧张素(1-7)对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 蛋白表达的影响

AngⅡ诱导 HUVEC LOX-1 蛋白表达明显增加($P<0.05$);Ang(1-7)随着浓度增加抑制 AngⅡ诱导的 LOX-1 蛋白表达作用增强($P<0.05$);A-779 干预后 LOX-1 阳性细胞比率与与 AngⅡ+10⁻⁶ mol/L Ang(1-7)组比较差异显著($P<0.05$),与 AngⅡ刺激组比较差异无统计学意义;Ang(1-7)组 LOX-1 蛋白表达与对照组比较差异亦无统计学意义(表 2 和图 3)。

表 2. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 阳性细胞数表达的影响

分 组	阳性细胞率
对照组	17.8%±3.1%
Ang(1-7)组	15.8%±2.3%
AngⅡ组	62.6%±2.5% ^a
AngⅡ+10 ⁻⁹ mol/L Ang(1-7)组	56.9%±2.1% ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁸ mol/L Ang(1-7)组	48.9%±1.3% ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁷ mol/L Ang(1-7)组	37.7%±2.5% ^{ab}
AngⅡ+10 ⁻⁶ mol/L Ang(1-7)组	22.8%±2.4% ^{ab}
AngⅡ+Ang(1-7)+A-779 组	60.6%±3.5% ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 AngⅡ组比较。

2.4 血管紧张素(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化表达的影响

AngⅡ诱导 HUVEC p38 MAPK 磷酸化表达水平

显著增加 ($P < 0.05$); Ang(1-7) 随着浓度增加抑制 Ang II 诱导的 HUVEC p38 MAPK 磷酸化水平表达作用增强 ($P < 0.05$); A-779 干预后 p38 MAPK 磷酸化表达与 Ang II + 10^{-6} mol/L Ang(1-7) 组比较差异显著 ($P < 0.05$), 与 Ang II 组比较差异无统计学意义。Ang(1-7) 组 p38 MAPK 磷酸化表达与对照组比较差异亦无统计学意义 (表 3 和图 4)。

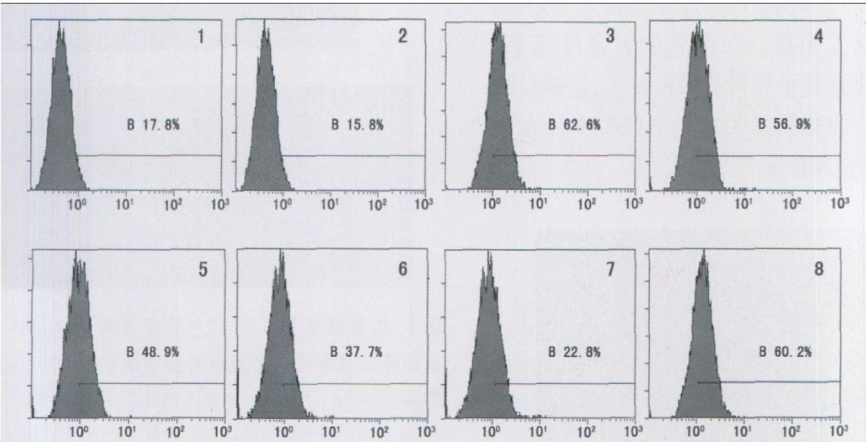


图 3. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 阳性细胞数表达的影响 ($n = 3$) 1 为对照组, 2 为 Ang(1-7) 组, 3 为 Ang II 组, 4 为 Ang II + 10^{-9} mol/L Ang(1-7) 组, 5 为 Ang II + 10^{-8} mol/L Ang(1-7) 组, 6 为 Ang II + 10^{-7} mol/L Ang(1-7) 组, 7 为 Ang II + 10^{-6} mol/L Ang(1-7) 组, 8 为 Ang II + Ang(1-7) + A-779 组。

表 3. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞 p38 MAPK 磷酸化表达的影响

分 组	p38 MAPK 磷酸化表达
对照组	1.00 ± 0.08
Ang(1-7) 组	1.22 ± 0.12
Ang II 组	2.28 ± 0.22 ^{ab}
Ang II + 10^{-9} mol/L Ang(1-7) 组	1.89 ± 0.23 ^a
Ang II + 10^{-8} mol/L Ang(1-7) 组	1.67 ± 0.15 ^{ab}
Ang II + 10^{-7} mol/L Ang(1-7) 组	1.33 ± 0.11 ^{ab}
Ang II + 10^{-6} mol/L Ang(1-7) 组	1.09 ± 0.07 ^b
Ang II + Ang(1-7) + A-779 组	2.21 ± 0.27 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 Ang II 组比较

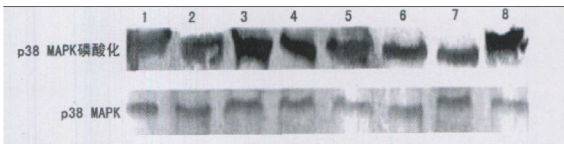


图 4. 血管紧张素(1-7)对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞 p38 MAPK 磷酸化表达的影响 ($n = 3$) 1 为对照组, 2 为 10^{-6} mol/L Ang(1-7) 组, 3 为 10^{-6} mol/L Ang II 组, 4 为 10^{-6} mol/L Ang(1-7) + 10^{-6} mol/L Ang II 组, 5 为 10^{-6} mol/L A-779 + 10^{-6} mol/L Ang(1-7) + 10^{-6} mol/L Ang II 组, 6 为 A-779 组。

3 讨论

Ang(1-7) 是 RAS 系统中新的活性成员, 与 Ang II 的多种生物学作用相拮抗。研究报道, Ang II 可

诱导 LOX-1 mRNA 和蛋白表达显著增加^[3], 但是 Ang(1-7) 能否抑制 Ang II 诱导的 LOX-1 表达及其可能作用机制目前国内外研究报道甚少。本研究中发现, Ang(1-7) 与 Ang II 共同孵育后可抑制 Ang II 诱导的 HUVEC LOX-1 mRNA 和蛋白表达, 且随着浓度的增加抑制作用增强。由于 LOX-1 作为 ox-LDL 特异性受体在动脉粥样硬化的发生和发展中起着极其重要的作用, 由此我们推测 Ang(1-7) 在体内可能通过抑制 LOX-1 受体表达而拮抗 Ang II 的生物学作用, 从而发挥其抗动脉粥样硬化作用。

细胞对外界刺激的调节反应是通过细胞内信号转导通路对信号的快速传递来实现的。MAPK 是生物体内重要的信号转导系统之一^[5]。Ang II 在体内所介导的多种生物学作用与 p38 MAPK 信号通路有关^[5,6]。本研究发现, Ang II 能显著增加 HUVEC p38 MAPK 磷酸化表达, 提示 Ang II 可以激活 HUVEC p38 MAPK 通路, 与上述结果一致。且 Ang(1-7) 随着浓度增加抑制 Ang II 诱导的 p38 MAPK 磷酸化表达水平作用增强, 表明 Ang(1-7) 可抑制 Ang II 激活 p38 MAPK 通路的作用。已有研究表明, Ang II 可上调 LOX-1 表达, LOX-1 又通过激活 MAPK 途径, 使核因子 κ B (NF- κ B) 激活, 诱发炎症因子表达, 最终引起内皮细胞损伤, 炎症细胞聚集于血管内膜, 触发动脉粥样硬化的形成和发展^[7,8]。由此我们推测 Ang(1-7) 通过抑制 p38 MAPK 通路进一步抑制

LOX-1 所介导一系列病理损伤,进而发挥抗动脉粥样硬化作用。

目前认为,Mas 受体很可能就是 Ang(1-7) 的特异性受体,Ang(1-7)的作用是通过其自身特异性受体实现的^[9]。本研究结果也发现加入 Ang(1-7) 特异性受体拮抗剂 A-779 后,可阻断 Ang II 诱导的 LOX-1 表达及 p38 MAPK 磷酸化表达水平,表明 Ang(1-7)的作用是通过特殊的受体介导的,Mas 从中起着重要作用。

总之,本研究发现了 Ang(1-7)通过拮抗 Ang II 的作用从而显示出其强有力的血管内皮细胞保护效应,然而其相应的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, et al. Angiotensin-(1-7): an active member of the rennin-angiotensin system [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2002, 53: 533-540.

[2] 朱惠莲,侯孟君,李燕,等. 氧化型低密度脂蛋白经血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 途径诱导血管内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (4): 383-386.

[3] Li DY, Zhang YC, Philips I, et al. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation [J]. *Circ Res*, 1999, 84 (9): 1 043-049.

[4] Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells [J]. *Kidney Int*, 2006, 69: 2 212-218.

[5] Zheng J, Wen Y, Chen DB, et al. Angiotensin II elevates nitric oxide synthase 3 expression and nitric oxide production via a mitogen-activated protein kinase cascade in ovine fetoplacental artery endothelial cells [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72 (6): 1 421-428.

[6] Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, et al. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-β1 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286 (2): F278-F287.

[7] Guo RW, Yang LX, Li MQ, et al. Angiotensin II induces NF-κB activation in HUVEC via the p38 MAPK pathway [J]. *Peptides*, 2006, 27 (12): 3 269-275.

[8] Chen J, Li D, Schaefer R, et al. Cross-talk between dyslipidemia and renin-angiotensin system and the role of LOX-1 and MAPK in atherosclerosis studies with the combined use of rosuvasatin and candesartan [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 184 (2): 295-301.

[9] Santos RA, Ferreira AJ, Simões E, et al. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93 (5): 519-527.

(此文编辑 文玉珊)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者声明

《中国动脉硬化杂志》2009 年第 17 卷第 2 期(145-149)所发表题为《血清可溶性 CD40L 在冠心病患者中的价值》文章的通讯作者为中山大学附属第三医院心内科彭朝权副教授,特此声明。