

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0893-04

• 实验研究 •

阿托伐他汀通过过氧化体增殖物激活型受体 γ 促进一氧化氮生成抑制炎症因子产生

路 岩, 姜一农

(大连医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省大连市 116021)

[关键词] 动脉粥样硬化; 内皮功能; 阿托伐他汀; 人脐静脉内皮细胞; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 一氧化氮; 可溶性细胞间黏附分子 1

[摘要] 目的 观察阿托伐他汀是否能通过激活人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ 从而改善血管内皮功能。方法 将体外培养的人脐静脉内皮细胞的实验分为两部分, 实验一分为: 对照组; ④脂多糖组 (1.0 mg/L); ④阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组; 脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组; 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组, 经孵育 24 h 后, 收集细胞和培养上清液, 用 RT-PCR 方法测定不同浓度阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达的影响, 并用硝酸还原酶法测定不同浓度阿托伐他汀干预对脂多糖诱导后细胞培养上清液中的一氧化氮生成的影响, ELISA 方法测定细胞培养上清液中人可溶性细胞间黏附分子含量的影响。实验二分为: 对照组; ④阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组; ④GW 9662 组; 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组; GW 9662 + 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组, 观察过氧化体增殖物激活型受体 γ 特异性阻断剂 GW 9662 对阿托伐他汀与脂多糖共同作用后人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达及培养上清液中一氧化氮、人可溶性细胞间黏附分子 1 含量变化的影响。结果 不同浓度阿托伐他汀可上调人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达, 且随着药物浓度的增加其上调受体表达的作用增强。不同浓度阿托伐他汀可干预脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞液中一氧化氮生成减少及人可溶性细胞间黏附分子 1 含量的增加, 且随着药物浓度的增加上述作用增强。过氧化体增殖物激活型受体 γ 特异性阻断剂 GW 9662 可部分阻断阿托伐他汀上述作用。结论 阿托伐他汀可能部分通过激活人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ 受体, 促进一氧化氮生成, 抑制炎症因子的产生, 改善血管内皮功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of PPAR γ in Human Umbilical Vein Endothelial Cell and the Effect of Atorvastatin

LU Yan, and JIANG Yirong

(The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Endothelial Function; Atorvastatin; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; Nitric Oxide; Soluble Intracellular Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether atorvastatin can improve the endothelial function through activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human umbilical vein endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured in vitro. And the 2~4 generation were used. Experiment 1: control group; ④lipopolysaccharide group (1.0 mg/L); ④atorvastatin 1.0 group (atorvastatin 1.0 mmol/L); lipopolysaccharide + atorvastatin 1.0 group (atorvastatin 1.0 mmol/L); lipopolysaccharide + atorvastatin 5.0 group (atorvastatin 5.0 mmol/L). After human umbilical vein endothelial cells were incubated with different concentrations of atorvastatin and lipopolysaccharide for 24 hours, the expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma of human umbilical vein endothelial cells were evaluated with reverse transcription-polymerase chain reaction. The content of nitric oxide, soluble intracellular adhesion molecule-1 in cell culture fluid were measured with Nitrate reductase and ELISA. Experiment 2: control group; ④atorvastatin 5.0 group (atorvastatin 5.0 mmol/L); ④GW 9662 group (GW 9662 0.2 mmol/L); lipopolysaccharide + atorvastatin 5.0 group (atorvastatin 5.0 mmol/L); GW 9662 + lipopolysaccharide + atorvastatin group 5.0 group (GW 9662 0.2 mmol/L, atorvastatin 5.0 mmol/L). After human umbilical vein endothelial cells were incubated with atorvastatin, lipopolysaccharide and GW 9662 (the specific inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

[收稿日期] 2009-08-11 [修回日期] 2009-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30271433)

[作者简介] 路岩, 博士, 副主任医师, 主要从事高血压病的脏器损伤和动脉粥样硬化的临床及基础研究, 联系电话为 0411-83535963-2198, Email 为 lyz720902@yahoo.com.cn. 姜一农, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压病的脏器损伤和动脉粥样硬化的临床及基础研究, 联系电话为 0411-83535963-2197, Email 为 jiangyn64510@yahoo.com.cn.

for 24 hours the expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human umbilical vein endothelial cells were evaluated with RT-PCR. The content of nitric oxide, soluble intracellular adhesion molecule-1 in cell culture fluid were determined with the way of Nitrate reductase and ELISA.

Results The expression of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma of human umbilical vein endothelial cells were upregulated by different concentrations of atorvastatin.

The expression reinforced with the increased concentration of atorvastatin. Compared with control group, the contents of nitric oxide significantly increased and soluble intracellular adhesion molecule-1 decreased in cell culture fluid when Human umbilical vein endothelial cells were incubated with lipopolysaccharide+ atorvastatin 1.0 mmol/L and lipopolysaccharide+ atorvastatin 5.0 mmol/L. The effects reinforced with the increased concentration of atorvastatin. The effects of atorvastatin are partially inhibited by GW 9662 (the specific inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma).

Conclusion The endothelial function was improved by atorvastatin partially through activating Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)被认为是一种慢性炎症性疾病^[1],目前临床和基础研究已证明他汀类药物在降低胆固醇同时,还具有调脂外改善血管内皮功能的作用,对As的发生发展具有明显的抑制^[2-4],但其改善血管内皮功能的具体机制尚不完全明确。过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ)活化能抑制炎症反应而对As产生影响^[5-6]。既往研究显示他汀类药物能够通过激活单核/巨噬细胞 PPAR γ ,起到抗As的作用^[7],但他汀类药物是否可通过激活血管内皮细胞 PPAR γ 改善血管内皮功能未见明确报道。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清购自 Gibco公司;脂多糖、胶原酶购自 Sigma公司;阿托伐他汀原粉由辉瑞公司提供;一氧化氮(NO)测定试剂盒购自南京市建成生物工程研究所;人可溶性细胞间黏附分子-1(soluble intracellular adhesion molecule-1, sICAM-1)定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司;真核细胞总 RNA 提取试剂盒,通用 PCR 优化试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术公司;PPAR γ 抗体购自 Upstate 公司;GW 9662购自 Cayman Chemical公司。所有产妇均签署应用其脐带的知情同意书。

1.2 实验细胞及分组

分离新鲜脐带,经消化传代后,将体外培养的 2~4代人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)分为两部分,应用脂多糖作为炎性刺激因子^[8],实验一分组:对照组;④脂多糖 1.0 mg/L组;④阿托伐他汀 1.0 mmol/L组;脂多糖+阿托伐他汀 1.0 mmol/L组;脂多糖+阿托伐他汀 5.0 mmol/L组,经孵育 24 h后,收集细胞和培养上清液,观察不同浓度阿托伐他汀干预对脂多糖诱导后 HUVEC 的 PPAR γ 表达及培养上清液中

NO、sICAM-1含量的影响。实验二分组:对照组;④阿托伐他汀 5.0 mmol/L组;④0.2 mmol/L GW 9662组;脂多糖+阿托伐他汀 5.0 mmol/L组;GW 9662+脂多糖+阿托伐他汀 5.0 mmol/L组,观察 PPAR γ 特异性阻断剂 GW 9662对阿托伐他汀与脂多糖共同作用后 HUVEC 的 PPAR γ 表达及培养液中 NO、sICAM-1含量的变化。

1.3 实验方法

利用硝酸还原酶法通过显色深浅测定培养液中 NO 浓度的高低。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。分别用抗 sICAM-1单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 sICAM-1与单抗结合,加入生物素化的抗人 sICAM-1抗体,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 OPD,出现黄色,加中止液硫酸,在 492 nm 处测 OD 值,可通过绘制标准曲线求出标本中 sICAM-1 浓度。半定量逆转录聚合酶链反应法检测各组人脐静脉内皮细胞 PPAR γ mRNA 的变化,严格按 Trizol 试剂盒说明提取各组 HUVEC 总 RNA,各组样品取 1 μ L RNA 按试剂盒说明进行 cDNA 合成及 PCR 扩增。PCR 引物及内参由上海生工公司合成,引物序列:PPAR γ 上游引物 5'-TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC-3',下游引物 5'-GCA TTA TGA GAC ATC CCC AC-3',PCR 扩增片段为 474 bp。GAPDH(内参)上游引物 5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3',下游引物 5'-TCT AGA GGG CAG GTC AGG TCC ACC-3',PCR 扩增片段为 598 bp。以 cDNA 为模板加入 Taq 合成酶、10 \times Buffer Mg²⁺、dNTP 和上下引物进行 PCR 反应,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。所得 PCR 产物点样于 1.0% 琼脂糖凝胶上,EB 染色,观察结果。对电泳结果进行凝胶成像系统扫描及软件分析。

1.4 统计学分析

用 SPSS13.0 软件进行正态性检验,组间比较行

单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ 表达的影响

不同浓度阿托伐他汀可上调 HUVEC PPAR γ 表达, 且随着阿托伐他汀浓度的增加其上调 PPAR γ 表达的作用增强 ($P < 0.05$; 图 1 和表 1)。

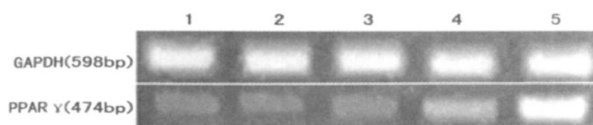


图 1 不同浓度阿托伐他汀干预后人脐静脉内皮细胞的过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为脂多糖组, 3 为阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组, 4 为脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组, 5 为脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组。

表 1 不同浓度阿托伐他汀对人脐静脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

分 组	PPAR γ /GAPDH 灰度比
对照组	0.29 ± 0.05
脂多糖组	0.25 ± 0.03
阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组	0.34 ± 0.05
脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组	0.48 ± 0.07 ^a
脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	0.76 ± 0.12 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组比较。

2.2 不同浓度阿托伐他汀干预对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞培养上清液中一氧化氮、可溶性细胞间黏附分子 1 的影响

脂多糖可使培养上清液中 NO 含量降低, sICAM-1 含量增加 (均 $P < 0.01$); 不同浓度阿托伐他汀干预后培养上清液中 NO 生成增加, sICAM-1 含量减少, 且随着阿托伐他汀浓度的增加其上述作用增强 (均 $P < 0.01$; 表 2)。

2.3 GW 9662 对阿托伐他汀与脂多糖共同作用后人脐静脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达的影响

阿托伐他汀有上调 HUVEC PPAR γ 表达的作用 ($P < 0.01$), PPAR γ 特异性阻断剂 GW 9662 可阻断该作用 ($P < 0.05$; 图 2 和表 3)。

表 2 不同浓度阿托伐他汀干预对脂多糖诱导人脐静脉内皮细胞培养液中一氧化氮、可溶性细胞间黏附分子 1 的影响

分 组	NO ($\mu\text{mol/L}$)	sICAM-1 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	5.6 ± 0.4	1.5 ± 0.3
脂多糖组	2.4 ± 0.5 ^a	6.4 ± 0.6 ^a
阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组	6.5 ± 1.3	1.7 ± 0.4
脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组	14.8 ± 1.2 ^a	5.4 ± 0.5 ^a
脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	22.4 ± 3.9 ^{ab}	3.0 ± 0.6 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与脂多糖 + 阿托伐他汀 1.0 mmol/L 组比较。

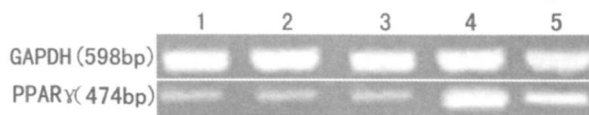


图 2 GW 9662 干预后人脐静脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达 1 为对照组, 2 为阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组, 3 为 GW 9662 组, 4 为脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组, 5 为 GW 9662 + 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组。

表 3 GW 9662 对人脐静脉内皮细胞过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 影响 ($n = 3$)

分 组	PPAR γ /GAPDH 灰度比
对照组	0.28 ± 0.08
阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	0.29 ± 0.07
GW 9662 组	0.27 ± 0.05
脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	0.78 ± 0.12 ^a
GW 9662 + 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	0.50 ± 0.06 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 组比较。

2.4 GW 9662 对阿托伐他汀与脂多糖共同作用后人脐静脉内皮细胞培养上清液中一氧化氮、可溶性细胞间黏附分子 1 的影响

GW 9662 可使阿托伐他汀与脂多糖共同作用后 HUVEC 培养液中 NO 含量减少, sICAM-1 含量增加 ($P < 0.01$; 表 4)。

表 4 GW 9662 对培养液中一氧化氮、可溶性细胞间黏附分子 1 的影响

分 组	NO ($\mu\text{mol/L}$)	sICAM-1 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	5.6 ± 0.7	1.8 ± 0.3
阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	7.6 ± 1.4	1.5 ± 0.5
GW 9662 组	4.6 ± 0.7	1.9 ± 0.6
脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	22.4 ± 3.9 ^a	3.2 ± 0.8 ^a
GW 9662 + 脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 mmol/L 组	13.3 ± 1.8 ^{ab}	6.4 ± 0.9 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与脂多糖 + 阿托伐他汀 5.0 组比较。

3 讨论

近年的研究发现,几乎所有参与As形成的血管壁细胞,如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核巨噬细胞等均可表达PPAR γ ^[8-10]。他汀类药物能够通过激活单核巨噬细胞等炎性细胞PPAR γ ,起到抗As的作用,但其对内皮细胞PPAR γ 表达的作用尚无明确报道。

目前研究表明,NO由内皮细胞产生,介导内皮细胞依赖性血管舒张作用,并且众多内皮依赖性血管保护作用几乎都是通过NO来实现的,如抗白细胞黏附、抗血小板聚集、抗平滑肌细胞增殖等^[11]。由此可见,在内皮细胞的血管保护作用中,NO处于非常重要的地位。ICAM-1是Rothlein等^[12]在研究淋巴细胞黏附时发现的一种跨膜单链糖蛋白。生理情况下,血管内皮细胞仅低水平、持续地表达ICAM-1,很少或不表达其他的白细胞黏附分子,而ICAM-1表达增强可促进内皮细胞与单核细胞黏附,导致As发生和发展。大量的研究结果表明,与As病变有关的细胞因子、生长因子、内皮素、氧化型低密度脂蛋白均可刺激ICAM-1表达增强。因此,增加NO的生成并减少ICAM-1的产生可明显抑制As的发展。

本研究应用脂多糖刺激HUVEC,发现培养上清液中NO含量减少,sICAM-1含量增加,应用不同浓度的阿托伐他汀干预后,HUVEC的PPAR γ mRNA表达上调,细胞培养上清液中NO的含量增加,sICAM-1含量减少,说明阿托伐他汀可改善脂多糖所致HUVEC的炎性改变。在应用PPAR γ 特异性阻断剂GW 9662后阿托伐他汀的上述作用被部分抑制,由此我们推断阿托伐他汀改善脂多糖所致HUVEC炎性反应中NO释放减少和sICAM-1生成增加,部分与阿托伐他汀激活内皮细胞PPAR γ 受体的表达有关。

实验结果显示阿托伐他汀可能通过激活内皮细胞PPAR γ 受体起到保护血管内皮功能的作用,部分解释阿托伐他汀抑制As发生发展的可能机制;且本研究显示阿托伐他汀的内皮保护机制随着药物浓度的增加而增强,与先前临床研究证实阿托伐他汀剂量越大其预防及治疗As的作用越明显^[13-15]的结果相一致。本研究为体外实验,有关阿托伐他汀通过

PPAR γ 受体发挥内皮保护作用及PPAR γ 受体是否会成为抗As治疗新的靶点,尚需基础和临床的进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. *Am Heart J*, 1999, **138** (5 Pt 2): S419-S420
- [2] Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, et al. ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial [J]. *Lancet*, 2003, **361** (9364): 1149-1158
- [3] Kushiro T, Mizuno K, Nakaya N, et al. Pravastatin for cardiovascular event primary prevention in patients with mild-to-moderate hypertension in the management of elevated cholesterol in the primary prevention group of adult Japanese (MEGA) study [J]. *Hypertension*, 2009, **53** (2): 135-141
- [4] Rikker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein [J]. *N Engl J Med*, 2008, **359** (21): 2195-207
- [5] 吴佳易,周珊珊,郭志刚. 过氧化体增殖物激活型受体 γ 对脂质代谢及动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (10): 794-796
- [6] Verma S, Sanjivko PE. The vascular biology of peroxisome proliferator-activated receptors: Modulation of atherosclerosis [J]. *Can J Cardiol*, 2006, **22** (2): 12B-17B
- [7] 罗玉梅,姜德谦,万新红. 急性冠状动脉综合征患者巨噬细胞表达过氧化体增殖物激活型受体 γ 及炎症相关因子的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17** (3): 220-224
- [8] 陈鹏,戴敏. 脂多糖对动脉粥样硬化血管内皮细胞及其信号转导通路的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (6): 495-498
- [9] Wakino S. Anti-atherosclerotic effects of PPAR gamma ligands [J]. *Nippon Rinsho*, 2004, **62** (1): 180-186
- [10] 杨萍,李学宇,秦玲. 过氧化体增殖物激活型受体 γ 在兔动脉粥样硬化模型中的表达及阿托伐他汀的干预作用[J]. *中国实用内科杂志*, 2007, **27** (10): 787-788
- [11] Versari D, Daghini E, Virdis A, et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, **157** (4): 527-536
- [12] Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, et al. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1 [J]. *J Immunol*, 1986, **137** (5): 270-274
- [13] Shepherd J, Kastelein JJ, Bitner V, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with coronary heart disease and chronic kidney disease: the TNT (Treating to New Targets) study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, **51** (15): 1448-454
- [14] Lavallée PC, Labreuche J, Gongora-Rivera F, et al. Placebo-controlled trial of high-dose atorvastatin in patients with severe cerebral small vessel disease [J]. *Stroke*, 2009, **40** (5): 1721-728
- [15] Di Sciascio G, Patti G, Pasceri V, et al. Efficacy of atorvastatin re-load in patients on chronic statin therapy undergoing percutaneous coronary intervention: results of the ARMYDA-RECAPTURE (Atorvastatin for Reduction of Myocardial Damage During Angioplasty) Randomized Trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, **54** (6): 558-565

(此文编辑 李小玲)