

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0943-05

• 实验研究 •

阿托伐他汀通过调节 Bcl-2/Bax蛋白表达抑制高糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡

谢彬^{1,2}, 吕湛¹, 苟连平¹, 陈玲¹, 梁传亮², 刘倩², 吴绍华²

(1. 川北医学院附属医院心内科, 四川省南充市 637000; 2. 湖南省石门县人民医院心内科)

[关键词] 葡萄糖; 内皮细胞; 凋亡; 阿托伐他汀

[摘要] 目的 研究阿托伐他汀对高浓度葡萄糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡的影响以及其分子机制。方法 将培养的人脐静脉内皮细胞与不同浓度的葡萄糖(5.6 mmol/L, 17.6 mmol/L, 33.3 mmol/L)及阿托伐他汀(0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L)作用 24 h后用吖啶橙/溴化乙锭荧光染色观察凋亡细胞形态, 四甲基偶氮唑蓝比色法测定人脐静脉内皮细胞增殖率, 流式细胞仪和 Western Blotting分别检测细胞早期凋亡率及 Bcl-2/Bax蛋白表达。结果 随着葡萄糖浓度的增加, 人脐静脉内皮细胞增殖率逐渐降低($P < 0.05$), 细胞早期凋亡率逐渐升高($P < 0.05$)。人脐静脉内皮细胞 Bcl-2蛋白表达逐渐减弱, Bax蛋白表达逐渐增强。用不同浓度的阿托伐他汀干预后, 人脐静脉内皮细胞的增殖率逐渐升高($P < 0.05$), 而凋亡率逐渐降低($P < 0.05$); 人脐静脉内皮细胞 Bcl-2蛋白表达逐渐增强, Bax蛋白表达逐渐减弱。其中, 与高糖组比较, 10 μmol/L阿托伐他汀干预组能提高 Bcl-2蛋白表达($P < 0.05$), 抑制 Bax蛋白表达($P < 0.05$)。结论 阿托伐他汀可能通过调节 Bcl-2/Bax蛋白表达抑制高浓度葡萄糖诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

A torvastatin Inhibit the Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by High Glucose Through Regulating the Expression of Bcl-2/Bax Protein

XIE Bin^{1,2}, LV Zhan¹, GOU Lian-Ping¹, CHEN Ling¹, LIANG Chuan-Liang², LIU Qian², and WU Shao-Hua²

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000; 2. Department of Cardiology, Shimeng County People's Hospital, Shimeng, Hunan 415300, China)

[KEY WORDS] Glucose; Endothelial Cell; Apoptosis; A torvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of atorvastatin on the apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by high glucose and to explore its potential molecular mechanism. **Methods** The HUVEC were cultured in vitro. Apoptosis of HUVEC were observed by acridine orange/ethidium bromide fluorescence staining. The survival rates of HUVEC were detected by MTT assay after HUVEC were incubated with different glucose concentrations (5.6 mmol/L, 17.6 mmol/L, 33.3 mmol/L) and atorvastatin concentrations (0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L) for 24 hours. The early apoptosis rates and the Bcl-2/Bax protein expression were respectively detected by flow cytometry and Western Blotting. **Results** With the increase in glucose concentration, the values of MTT were significantly reduced ($P < 0.05$). The early apoptosis rates of HUVEC were gradually increased with the increase in glucose concentrations ($P < 0.05$). The 33.3 mmol/L glucose group inhibited the expression of Bcl-2 protein and increased the expression of Bax protein compared with the control group ($P < 0.05$). 10 μmol/L atorvastatin decreased early apoptosis rates ($P < 0.01$) and the expression of bax protein ($P < 0.05$), increased the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.05$) induced by 33.3 mmol/L glucose. **Conclusion** A torvastatin probably inhibit the apoptosis in HUVEC induced by high glucose through regulating the expression of Bcl-2/Bax protein.

糖尿病血管病变是糖尿病患者致残或致死的重要原因, 血管内皮细胞功能紊乱与糖尿病血管并发症关系密切。大量的研究表明, 高糖环境可以诱

导内皮细胞凋亡^[1,2], 从而促进动脉粥样硬化的发生发展。他汀类药物是目前临床上治疗高胆固醇血症最有效的一类药物。长期应用他汀类药物能够显著降低高脂血症和冠心病患者的死亡率和心血管事件(心肌梗死、猝死和不稳定型心绞痛)发生率^[3,4]。他汀类药物的许多药理作用与其降胆固醇效应无关, 这些作用被称为“非降脂相关的心血管保护作用”。新近有研究显示, 他汀类药物能够抑制血管内皮细胞凋亡^[1,5]。这为他汀类药物的非降脂相关的

[收稿日期] 2010-10-15 [修回日期] 2010-12-08

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(08zc061)

[作者简介] 谢彬, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者吕湛, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail为 doctor_lb@163.com。苟连平, 硕士, 副教授, 研究方向为冠心病的发病机制。

心血管保护作用提供了一个新的研究方向。为此,本研究在建立高糖诱导血管内皮细胞凋亡模型的基础上,对阿托伐他汀这一新发现的非降脂相关的心血管保护作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

流式细胞仪(美国 BD 公司),聚丙烯酰胺凝胶电泳垂直电泳槽和转移电泳槽(美国 Bio Red 公司);兔抗人 Bcl-2 单克隆抗体和兔抗人 Bax 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司),兔抗人 β -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司);阿托伐他汀(美国 Sigma)。

1.2 血管内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells HUVEC)由重庆医科大学组胚教研室提供。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液调整细胞密度为 1×10^8 /L 后接种于培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养。待细胞长至汇合状态后进行传代。实验分为:对照组(10% 胎牛血清 + 葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L 的 DMEM 培养液)、中糖组(10% 胎牛血清 + 葡萄糖浓度为 17.6 mmol/L 的 DMEM 培养液)、高糖组(10% 胎牛血清 + 葡萄糖浓度为 33.3 mmol/L 的 DMEM 培养液)、低浓度阿托伐他汀组(10% 胎牛血清 + 33.3 mmol/L 葡萄糖和 0.1 μ mol/L 阿托伐他汀的 DMEM 培养液)、中浓度阿托伐他汀组(10% 胎牛血清 + 33.3 mmol/L 葡萄糖和 1 μ mol/L 阿托伐他汀的 DMEM 培养液)和高浓度阿托伐他汀组(10% 胎牛血清 + 33.3 mmol/L 葡萄糖和 10 μ mol/L 阿托伐他汀的 DMEM 培养液)。

1.3 吖啶橙 溴化已啶荧光染色观察细胞凋亡

将消毒后的盖玻片放置于 6 孔培养板中,按细胞分组分别加入细胞密度为 1×10^8 /L 的不同浓度葡萄糖和阿托伐他汀的 DMEM 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,捞出盖玻片,PBS 液漂洗细胞 3 次,每次 3 min。分别用吖啶橙和溴化已啶染色后,荧光显微镜观察,摄片。

1.4 四甲基偶氮唑蓝比色法测定人脐静脉内皮细胞增殖率

取对数生长期细胞制成 5×10^8 /L 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板内,每组设三个复孔,调零孔加 100 μ L 培养液,继续培养 12、24、48 h 结束前 4 h 每孔吸去上清液,

加 0.5 g/L 四甲基偶氮唑蓝 100 μ L 继续培养 4 h,吸去全部上清液,然后每孔加 200 μ L 二甲基亚砜,震荡摇匀,使结晶充分溶解,酶联免疫检测仪测每孔吸光度。以上实验重复三次。

1.5 流式细胞仪测定细胞早期凋亡率

按照细胞分组,调整细胞浓度按 5×10^5 /孔接种于六孔板,每组设三孔。培养 24 h 后收集细胞,PBS 液漂洗 3 次,将细胞重悬于 500 μ L 预冷的结合缓冲液,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 室温避光 15 min,1 h 内送流式细胞仪检测早期凋亡细胞数,用 CELL Quest 软件对结果进行分析。以上实验重复三次。

1.6 Western Blotting 检测

按照以上实验分组,每组设三孔,培养细胞 24 h 后收集细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min。加入预冷细胞裂解液 500 μ L 裂解细胞,提取物冰上孵育 30 min 后离心(12 000 r/min, 4℃) 20 min,上清液蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。每组取 20 μ g 蛋白,SDS-PAGE 电泳分离,转移到 PVDF 膜上,含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温下封闭 2 h 加入一抗(兔抗人 Bax, Bcl-2 单抗) 4℃ 过夜, TBST 洗膜 10 min \times 3 次,辣根过氧化物酶标记的兔抗 IgG 室温孵育 2 h,常规洗膜, DAB 试剂显色。Quantity one 图像分析系统进行蛋白条带灰度分析,测目标蛋白和内参 β -actin 蛋白的电泳条带灰度积分,以二者比值代表目标蛋白的相对表达量,分析结果。以上实验重复三次。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较用 SNK 检验。

2 结果

2.1 凋亡细胞的形态学观察

在荧光显微镜下,对照区内大多数细胞核染色质呈绿色正常结构,颜色较淡,仅见少数细胞核浓染的早期凋亡细胞。中糖组可见较多核染色质为亮绿色并呈固缩状或圆珠状的早期凋亡细胞。高糖组可见大量早期凋亡细胞和核染色质呈橘红色的晚期凋亡细胞。不同浓度的阿托伐他汀干预后凋亡细胞明显减少,低浓度阿托伐他汀组和中浓度阿托伐他汀组的晚期凋亡细胞较高糖组明显减少,高浓度阿托伐他汀组中仅见少数凋亡细胞(图 1)。

2.2 阿托伐他汀对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的影响

HUVEC 在不同浓度葡萄糖条件下培养 12 h

后, 三组细胞的增殖率差异均无统计学意义; 培养 24 h 后中糖组与对照组相比细胞增殖率无统计学差异, 而高糖组细胞增殖率低于对照组 ($P < 0.05$); 培养 48 h 后, 中糖组较对照组降低 ($P < 0.05$), 而高糖组与对照组相比, 细胞增殖率明显降低 ($P < 0.01$)。用不同浓度的阿托伐他汀干预后, 细胞增殖率明显增加。中浓度阿托伐他汀组 HUVEC 在培养 48 h 后增殖率较高糖组明显增加 ($P < 0.05$), 用 $10 \mu\text{mol/L}$ 的阿托伐他汀干预后, 12 h、24 h、48 h 的 HUVEC 增殖率较高糖组和低浓度阿托伐他汀组均有明显升高 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 阿托伐他汀对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	0.88 ± 0.16	1.17 ± 0.17	1.51 ± 0.19
中糖组	0.91 ± 0.09	1.05 ± 0.16	1.33 ± 0.13 ^a
高糖组	0.94 ± 0.05	0.93 ± 0.20 ^a	1.09 ± 0.12 ^{bc}
低浓度阿托伐他汀组	0.93 ± 0.07	0.94 ± 0.12	1.15 ± 0.11
中浓度阿托伐他汀组	0.98 ± 0.11	1.00 ± 0.06	1.21 ± 0.12 ^d
高浓度阿托伐他汀组	1.04 ± 0.13 ^{de}	1.11 ± 0.09 ^{de}	1.25 ± 0.11 ^{de}

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c为 $P < 0.05$ 与中糖组比较; d为 $P < 0.05$ 与高糖组比较; e为 $P < 0.05$ 与低浓度阿托伐他汀组比较。

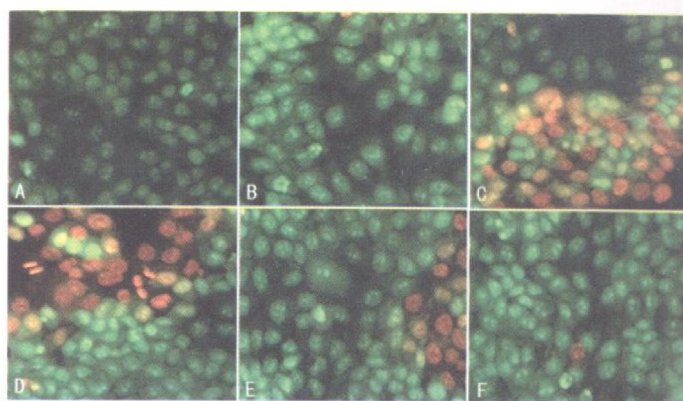


图 1 吖啶橙/溴化已啶荧光染色 A 为对照组, B 为中糖组, C 为高糖组, D 为低浓度阿托伐他汀组, E 为中浓度阿托伐他汀组, F 为高浓度阿托伐他汀组。

2.3 流式细胞仪测定细胞凋亡率

用不同浓度的葡萄糖作用 24 h 后, 内皮细胞的早期凋亡率随着葡萄糖浓度的升高而增加。中糖组和高糖组凋亡率与对照组相比均有统计学差异 ($P < 0.01$)。阿托伐他汀能明显抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡, 中浓度阿托伐他汀组与高糖组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 高浓度阿托伐他汀组细胞早期凋亡率较高糖组明显下降 ($P < 0.01$; 图 2 和表 2)。

表 2 不同浓度葡萄糖和阿托伐他汀作用 24 h 后内皮细胞早期凋亡率的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	细胞凋亡率
对照组	3.97% ± 0.43%
中糖组	7.18% ± 0.57% ^a
高糖组	9.27% ± 0.41% ^{ab}
低浓度阿托伐他汀组	9.04% ± 0.48%
中浓度阿托伐他汀组	8.66% ± 0.71% ^c
高浓度阿托伐他汀组	8.03% ± 0.37% ^{def}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与中糖组比较; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$, 与高糖组比较; e为 $P < 0.01$, 与低浓度阿托伐他汀组比较; f为 $P < 0.05$ 与中浓度阿托伐他汀组比较。

2.4 阿托伐他汀对高糖诱导的内皮细胞 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响

用不同浓度葡萄糖干预内皮细胞后, Bcl-2 蛋白表达随着葡萄糖浓度的升高而下降, 其中高糖组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 Bax 蛋白表达随着葡萄糖浓度升高而增加, 其中高糖组与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与高糖组比较, 高浓度阿托伐他汀 ($10 \mu\text{mol/L}$) 能提高 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低 Bax 蛋白表达 ($P < 0.05$, 表 3 和图 3)。

表 3 阿托伐他汀对高糖诱导的内皮细胞 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	Bax/ β -actin	Bcl2/ β -actin
对照组	0.515 ± 0.069	1.005 ± 0.191
中糖组	0.565 ± 0.048	0.894 ± 0.084
高糖组	0.649 ± 0.048 ^a	0.697 ± 0.059 ^a
低浓度阿托伐他汀组	0.604 ± 0.044	0.848 ± 0.042
中浓度阿托伐他汀组	0.568 ± 0.041	0.891 ± 0.129
高浓度阿托伐他汀组	0.527 ± 0.037 ^b	0.973 ± 0.146 ^b

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与高糖组比较。

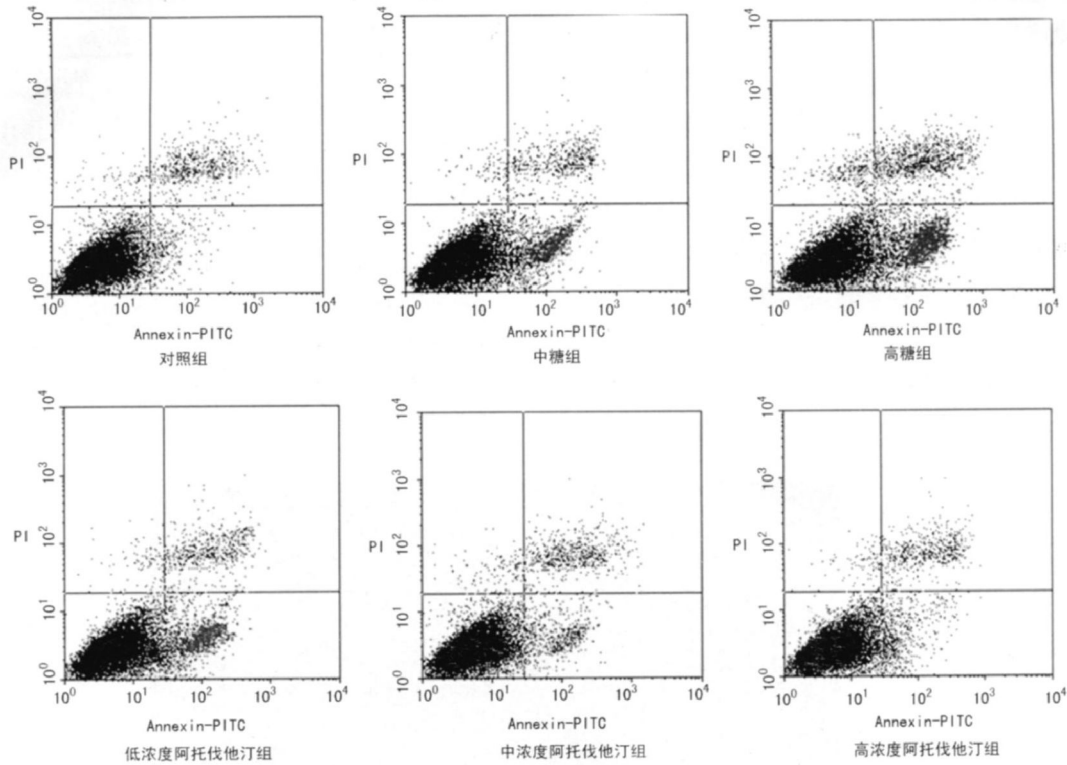


图 2 不同浓度葡萄糖诱导 24 h 对 HUVEC 凋亡率的影响以及阿托伐他汀的干预作用

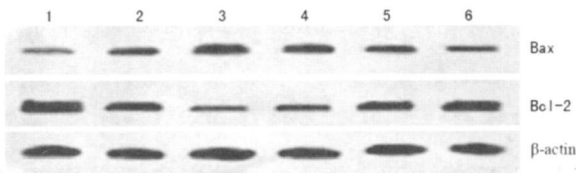


图 3 阿托伐他汀对高糖诱导的内皮细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2 为中糖组, 3 为高糖组, 4 为低浓度阿托伐他汀组, 5 为中浓度阿托伐他汀组, 6 为高浓度阿托伐他汀组。

3 讨论

目前已有研究证实糖尿病患者长期的高血糖可以通过多种途径促进动脉粥样硬化斑块的形成^[6], 而新近完成的一个 10 年随访研究表明, 强化血糖管理可以显著降低 2 型糖尿病患者微血管疾病和心血管事件的发生率^[7]。本研究使用流式细胞术对不同浓度葡萄糖作用 24 h 后的人脐静脉内皮细胞进行检测后发现, 对照组、中糖组、高糖组细胞的早期凋亡率分别为 $3.97\% \pm 0.43\%$ 、 $7.18\% \pm 0.57\%$ 和 $9.27\% \pm 0.41\%$, 任意两组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 这与国内相关研究相符^[8-9]。高浓度葡萄糖通过激活多元醇旁路、蛋白激酶 C, 促进蛋白质非酶糖化等多种途径损伤线粒体, 线粒体损伤后线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrion permeability

transition pore, MPTP) 开放, 使线粒体膜间隙内的细胞色素 C 大量释放到胞质, 从而诱导天冬氨酸酶依赖和非依赖性细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白对 MPTP 的开放和关闭起着关键的调节作用, 促凋亡蛋白 Bax 可以直接与 MPTP 结合, 提高通道活性, 从而促进细胞色素 C 释放。而抗凋亡蛋白 Bcl-2 可以通过与 Bax 竞争性地与 MPTP 结合, 或直接阻止 Bax 与 MPTP 的结合来发挥其抗凋亡作用。本实验通过对凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 检测发现, 与不同浓度葡萄糖作用 24 h 后, 随着葡萄糖浓度的增加, Bcl-2 蛋白表达逐渐减弱, Bax 蛋白表达逐渐增强, 高糖组 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达量与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些研究表明糖尿病患者高发动脉粥样硬化可能与血管内皮细胞凋亡增加有关。

他汀类药物是目前临床上治疗高胆固醇血症最有效的一类药物, 但大量的研究表明他汀类药物的许多药理作用与其降胆固醇效应无关, 这些作用也称为“非降脂相关的心血管保护作用”, 主要包括抗氧化作用、改善血管内皮细胞功能、抗炎作用、抑制神经体液系统活性、提高动脉血管的顺应性^[10]。本研究表明, 阿托伐他汀能够抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡 ($P < 0.05$), 而 $10 \mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀能够

上调 Bcl-2 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达。这提示他汀类药物可能通过抑制内皮细胞凋亡发挥非降脂相关的心血管保护作用, 其机制可能与他汀类药物能够抑制高糖对 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达的诱导作用有关。

血管内皮细胞凋亡增加将导致血管内皮通透性增加和血管调节功能失衡, 血管内皮完整性的破坏无疑将有助于脂质迁移和沉积至血管内膜, 进而趋化单核细胞和平滑肌细胞迁移至内膜吞噬脂质, 从而促进动脉粥样硬化的发生发展^[11]。高血糖可能通过下调 Bcl-2 蛋白表达而上调 Bax 蛋白表达诱导了血管内皮细胞凋亡, 这为临床上预防和治疗糖尿病的血管并发症提供了一个新的思路。阿托伐他汀可能通过调节 Bcl-2/Bax 蛋白表达抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡, 从而发挥非降脂相关的心血管保护作用。这为临床上应用他汀类药物治疗糖尿病病人提供了新的理论依据。但由于体外实验不能完全模拟 2 型糖尿病患者的体内环境, 激素水平、血脂水平以及个体因素等都将影响他汀类药物对高血糖诱导内皮细胞凋亡的抑制作用, 因此, 对内皮细胞凋亡进行进一步深入研究将具有重大的临床意义。

[参考文献]

[1] Piconi L, Cognali M, Da-Ros R, et al. The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose [J]. *J Diab Complic* 2008 **22** (1): 38-45

- [2] Favaro E, Miceli I, Bussolati R, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells: effects of pravastatin on the Akt survival pathway [J]. *Am J Pathol* 2008 **173** (2): 442-450
- [3] Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial [J]. *Lancet* 2004 **364** (9435): 685-696
- [4] Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, et al. Prevention of coronary and stroke events with 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 randomised controlled trial [J]. *Lancet* 2003 **361** (9364): 1149-1158
- [5] Xu SZ, Zhong W, Watson NM, et al. Fluvastatin reduces oxidative damage in human vascular endothelial cells by upregulating Bcl-2 [J]. *J Thromb Haemost* 2008 **6** (4): 692-700
- [6] Renard CB, Kramer F, Johansson F, et al. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions [J]. *J Clin Invest* 2004 **114** (5): 659-668
- [7] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med* 2008 **359** (15): 1577-1589
- [8] 丁莉, 屈顺林, 王蕾, 等. 高葡萄糖刺激血管内皮细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 表达上调、活性氧增加及细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (6): 405-409
- [9] 赵宏, 丁颖, 刘国良. 酰基化 ghrelin 抑制高糖诱导的人血管内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (11): 831-833
- [10] Akgulu C, Ozdemir B, Yilmaz Y, et al. Effect of intensive statin therapy on arterial elasticity in patients with coronary artery disease [J]. *Acta Cardiol* 2008 **63** (4): 467-471
- [11] Banfi C, Brioschi M, Wait R, et al. Proteome of endothelial cell derived procoagulant microparticles [J]. *Proteomics* 2005 **5** (17): 4443-4455

(此文编辑 许雪梅)