

阿托伐他汀对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞肝 X 受体 α 及其靶基因表达的影响

顾文娟, 罗俊, 李江

(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 阿托伐他汀; 人脐静脉内皮细胞; 肝 X 受体 α

[摘要] **目的** 研究阿托伐他汀对炎症刺激物脂多糖干预后人脐静脉内皮细胞中肝 X 受体 α 及其靶基因腺苷三磷酸结合盒转运体 A1、固醇调节元件结合蛋白 1 表达的影响。**方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 进行以下干预实验: 对照组加入 2 μL 磷酸盐缓冲液; 脂多糖干预组用终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖溶液干预细胞 24 h; (2) 对照干预组和阿托伐他汀干预组先用二甲基亚砜或不同浓度 (0.1、1.0 及 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 的阿托伐他汀干预 2 h, 然后加入 100 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖溶液共同干预 22 h。用实时定量聚合酶链反应测定肝 X 受体 α 及其靶基因腺苷三磷酸结合盒转运子 A1、固醇调节元件结合蛋白 1 的 mRNA 表达量。**结果** 与对照组相比, 脂多糖干预组肝 X 受体 α 及其靶基因 mRNA 表达明显受到抑制 ($P < 0.05$); 与对照干预组相比, 阿托伐他汀干预组随给药浓度增加肝 X 受体 α 及其靶基因 mRNA 表达逐步升高 ($P < 0.05$)。**结论** 脂多糖可明显抑制人脐静脉内皮细胞中肝 X 受体 α 及其靶基因表达; 阿托伐他汀在一定范围内可呈剂量依赖性上调肝 X 受体 α 及其靶基因表达, 提示其抗动脉粥样硬化作用可能部分通过肝 X 受体信号通路发挥作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on mRNA Expression of Liver X Receptor α and Its Target Gene in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Lipopolysaccharide

GU Wen-Juan, LUO Jun, and LI Jiang

(Department of Cardiovascular, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Liver X Receptor α

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of atorvastatin on mRNA expression of liver X receptor α (LXR α) and its target gene ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) after treated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were cultured in vitro with gibco 1640 medium and 10 percent fetal bovine serum and 1 percent double antibiotics, and then were plated in 6-well plates at a density of approximately 2×10^5 cells per milliliter of media to be intervened. (1) Control group: HUVEC were cultured with the completed medium involving phosphate buffered saline (PBS), and LPS treated group or control intervention group: HUVEC were treated with LPS (the terminal concentration was 100 $\mu\text{g/L}$) for 24 hours; (2) Atorvastatin intervention group or control intervention group: HUVEC were first treated with atorvastatin at different concentrations (0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 hours, and then co-treated with LPS for 22 hours. The level of LXR α and its target genes mRNA expression were measured by real-time polymerase chain reaction. **Results** Compared with control group, LPS could inhibit the mRNA expression of LXR α and its target genes ABCA1, SREBP-1 in HUVEC. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with LPS plus DMSO group, atorvastatin could upregulate the mRNA expression of LXR α and its target gene mRNA expression in a dose-dependent manner. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Meanwhile, atorvastatin could downregulate the mRNA expression of inflammatory factor and adhesion factors in a dose-dependent manner.

[收稿日期] 2011-08-31

[作者简介] 顾文娟, 硕士研究生, 研究方向为临床血脂学, 现工作于西安市第一医院心血管内科, E-mail 为 wjgu1985@163.com。罗俊, 硕士研究生, 研究方向为临床血脂学, E-mail 为 luojun2242004@yahoo.com.cn。通讯作者李江, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的诊疗, E-mail 为 lijiangcs@163.com。

Conclusion These results demonstrate that LPS may inhibit the mRNA expression of LXR α and its target genes in HUVEC, and atorvastatin can upregulate the mRNA expression of LXR α and its target gene mRNA expression in a dose-dependent manner to inhibit the inflammatory state of HUVEC.

他汀类药物目前广泛应用于各种心血管疾病的治疗和预防中,其多效性已被广为研究。从基础到临床研究已证实他汀类药物是目前抗动脉粥样硬化最主要的有效药物。肝 X 受体(liver X receptor, LXR)是新近研究较为广泛的一种配体依赖性转录因子,具有明确的降低胆固醇、稳定斑块及抗动脉粥样硬化等作用,但目前大多对 LXR 的研究集中在巨噬细胞、单核细胞及肝细胞中,对于内皮细胞的研究甚少。已知 LXR 在内皮细胞中有表达, LXR 信号通路在抗动脉粥样硬化中有着积极的作用,我们认为内皮炎症状态下 LXR 的表达可能受到抑制,而他汀类药物可能明显激动 LXR 的表达,从而发挥抗动脉粥样硬化等作用。本研究在体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的基础上,观察阿托伐他汀对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)干预后内皮细胞中 LXR α 及其靶基因腺苷三磷酸结合盒转运子 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)、固醇调节元件结合蛋白 1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVEC 为中南大学湘雅医学院内分泌研究室赠与, RPMI 1640 培养基、链霉素/青霉素(双抗)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自天津市灏洋生物制品科技有限公司, Trizol 购自 Inbitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, 荧光标记购自 TakaRa 公司, LPS 购自 Sigma 公司, 阿托伐他汀粉剂为进口试剂, 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。细胞培养液为含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 1640 培养液。阿托伐他汀粉剂溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 过滤除菌。

1.2 人脐静脉内皮细胞的体外培养

将 HUVEC 用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI 1640 培养基培养, 光镜下观察细胞呈典型铺路石样外观, 单层贴壁生长。

1.3 实验分组

用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制成细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^8 个/L, 将内皮细胞种于 6 孔

板中培养, 待细胞长成单层融合后, 换成不含血清的细胞培养液饥饿培养 12 h, 然后进行以下干预实验。①对照组(加入 2 μ L 磷酸盐缓冲液)和脂多糖干预组(用终浓度为 100 μ g/L LPS 干预细胞 24 h); ②阿托伐他汀干预组和对照干预组: 先予以不同浓度(0.1、1.0 及 10.0 μ mol/L)的阿托伐他汀或 DMSO 预干预 2 h, 然后加入 100 μ g/L LPS 共同干预 22 h。各组均在实验后收获细胞。实验重复 6 次。

1.4 实时定量聚合酶链反应检测 LXR α 、ABCA1 及 SREBP-1 mRNA 表达

药物干预结束后, 收集各组细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 溶于无 RNA 酶水中。采用 M-MLV 逆转录酶将 RNA 反转录成 cDNA, 进行实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)反应。LXR α 上游引物 5'-TCGCAAGTGCCAGGAGTGTC-3', 下游引物 5'-TCCTCCTCTTGCCGCTTCAG-3'。ABCA1 上游引物 5'-ATGTCCAGTCCAGTAATGCTTCTGT-3', 下游引物 5'-CGAGATATGCTCCGGATTGC-3'。SREBP-1 上游引物 5'-CAGCCCCACTTCATCAAGG-3', 下游引物 5'-GGGACTGTTGCCAAGATGCTTCCG-3'。内参对照 GAPDH 上游引物 5'-GGAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3', 下游引物 5'-GCTCCTGGAAGATGCTGATGG-3'。引物由 Invitrogen 公司合成, 稀释浓度为 10 μ mol/L。反应条件为两步法扩增:(1)1 个循环, 95 $^{\circ}$ C 30 s;(2)40 个循环, 95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 31 s, 并增加一个 dissociation stage: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。

1.5 统计学处理

所有实验数据均输入 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析, 对主要指标进行正态性检验, 采用 One-way ANOVA 分析来进行组间比较。两组均数间比较采用 *t* 检验。主要实验数据来自 3 次以上重复实验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 LPS 抑制 HUVEC LXR α 及其靶基因的表达

对照组可见 LXR α mRNA 表达; 在 100 μ g/L LPS 刺激下, LXR α mRNA 表达明显下调(1.00 ± 0.04 比 0.67 ± 0.12 , $P < 0.05$), ABCA1、SREBP-1 mRNA 表达亦明显下调(ABCA1: 1.00 ± 0.08 比 0.87 ± 0.07 ; SREBP-1: 1.00 ± 0.13 比 0.80 ± 0.02 ,

均 $P < 0.05$; 图 1)。

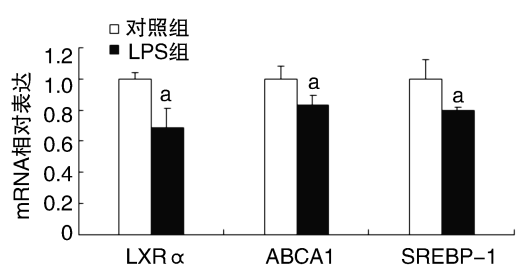


图 1. LPS 对 HUVEC LXRα 及其靶基因 mRNA 表达的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. The effect of LPS on mRNA expression of LXRα and its target gene in HUVEC

2.2 阿托伐他汀呈剂量依赖性上调 LXRα 及其靶基因 ABCA1、SREBP-1 mRNA 的表达

与对照干预组相比,不同浓度 (0.1、1.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 的阿托伐他汀干预 2 h 后 HUVEC 中 LXRα mRNA 的表达随阿托伐他汀浓度的增加而逐渐增强 ($P < 0.05$),其靶基因 ABCA1、SREBP-1 mRNA 表达随着阿托伐他汀浓度的增高也呈增加趋势 ($P < 0.05$)。另外,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀干预组与对照干预组相比 ABCA1 的表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),而 LXRα 与 SREBP-1 的 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 2)。

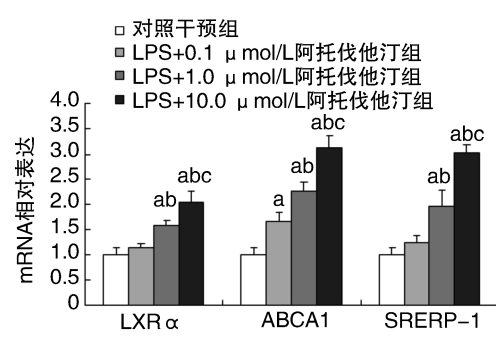


图 2. 不同浓度阿托伐他汀对 LPS 刺激后 HUVEC 中 LXRα 及其靶基因 mRNA 表达的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与对照干预组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 LPS + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 LPS + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组相比。

Figure 2. The effect of atorvastatin on mRNA expression of LXRα and its target gene in HUVECs after treated by lipopolysaccharide

3 讨论

LXR 存在于细胞核内,是一种配体依赖性的转录因子。LXR 最早由 Willy 等于 1995 年从肝 cDNA

文库分离得到,因在肝脏中表达丰富且自然配体不明而将其归类为孤儿受体中的一员^[1]。后来,胆固醇氧化衍生物(又称氧化型胆固醇)被识别为肝脏 X 受体的特定配体,从而将其命名为“氧化型胆固醇受体”^[2]。LXR 可以作为胆固醇的敏感器,通过促进胆固醇的逆转运、抑制肠道中胆固醇的吸收等来维持体内胆固醇的稳态^[3]。随着研究的不断深入,人们发现 LXR 激动剂还可以抑制体内外炎症反应^[4,5],促进内皮源性一氧化氮合酶的表达^[6],预防斑块形成^[7],甚至可以促进斑块消退^[8]。由于他汀类药物与 LXR 的调脂、抗炎、改善内皮功能、稳定斑块效应具有一致性,因此认为他汀类药物可能部分通过 LXR 信号通路发挥作用。由于冠心病是一种特殊类型的慢性炎症性疾病,炎症贯穿动脉粥样硬化形成、发展及恶化的全过程,在一定程度上决定了斑块的稳定性及冠心病的自然进程,为此我们以 HUVEC 为研究对象,在体外模拟炎症状态下阿托伐他汀对内皮细胞中 LXRα 及其靶基因 (ABCA1、SREBP-1) 表达的影响。

3.1 LPS 抑制 HUVEC 中 LXRα 及其靶基因表达

有研究表明 LPS 可明显改变血管内皮的功能状态,低浓度的 LPS 对内皮细胞活力、功能影响不大,但是高浓度的 LPS 刺激可直接损伤内皮细胞,具有强烈的毒性作用^[9-11]。为了了解内皮细胞在炎症状态下 LXR 的表达变化,本研究以不同浓度 LPS 刺激细胞(预实验结果未显示),发现 100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 可以刺激内皮细胞炎症因子及黏附因子表达增加,且无明显的细胞凋亡,因此我们认为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 刺激可以模拟 HUVEC 的体外炎症状态。Mahajan 等^[12]研究表明在低浓度的 C 反应蛋白刺激下,THP-1 巨噬细胞中 LXR 的表达可以反应性上调;而较高浓度的 C 反应蛋白可以抑制 LXR 的表达。王丁等^[4]研究发现 1 mg/L LPS 可以抑制枯否细胞中 LXR 的 mRNA 及蛋白表达。本研究发现在 100 $\mu\text{g/L}$ 的 LPS 作用下,可明显抑制细胞内 LXRα 及其靶基因 ABCA1、SREBP-1 mRNA 表达。因此我们认为炎症状态可以使内皮细胞中 LXR 的表达受到抑制,这与国内外的一些研究结果较为一致,这也许是何炎症状态常合并脂质代谢紊乱的原因。

3.2 阿托伐他汀呈剂量依赖性上调 LXRα 及其靶基因表达

多项研究表明他汀类药物可以呈剂量依赖性地抑制细胞内炎症反应,降低细胞内炎症因子的表达,抑制黏附因子的表达,但是具体作用机制尚不明确。有研究表明可能与他汀类药物抑制 NF- κB

信号转导通路的机制有关,还有研究表明 LXR 激动剂可能也通过抑制 NF-κB 信号转导通路发挥其抗炎、抗黏附、稳定斑块的作用,因此我们推断他汀类药物与 LXR 之间存在一定的联系,但目前对于两者之间的关系仍存在一定的争论。国内外研究他汀类药物与 LXR 之间的作用大多以巨噬细胞或单核细胞作为研究对象,有部分研究表明他汀类药物可以抑制 LXR 及其靶基因 ABCA1 的表达,其可能的作用机制是他汀类药物抑制 LXR 的配体-氧化固醇的合成来发挥抑制 LXR 的作用,但在胆固醇超载的情况下,该抑制作用消失^[13,14]。然而最近不少研究持不同的观点,这些研究认为他汀类药物可以直接激动 LXR,使 LXR 及其靶基因表达上调^[15,16]。Sharma 等^[17]近期用子宫内膜异位的基质细胞作为研究对象,研究表明阿托伐他汀可以呈剂量及时间依赖性地上调抗炎基因过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ) 及 LXR-α 的表达。本研究中,在 LPS 刺激 HUVEC 下调 LXRα 的基础上,不同浓度 (0.1、1.0 及 10.0 μmol/L) 的阿托伐他汀可以呈剂量依赖性地上调 LXRα 的表达,同时呈剂量依赖性地上调其靶基因 ABCA1、SREBP-1 mRNA 的表达,因此进一步证实阿托伐他汀在 LPS 刺激下可以直接上调 HUVEC 中 LXRα 的表达。这与之前的部分研究结果一致,可能的机制有:(1)阿托伐他汀对 LXRα 的直接刺激作用大于其抑制氧化固醇合成的作用;(2)可能与我们模拟的体外炎症状态有关:我们的研究发现 100 μg/L 的脂多糖干预可以抑制人脐静脉内皮细胞中 LXRα 的表达,而阿托伐他汀具有明确的抗炎作用,从而部分解除了炎症反应对 LXRα 表达的抑制作用。

综上所述,阿托伐他汀可能是一种潜在的 LXR 激动剂,它可以通过部分上调 LXR 的表达,激活 LXR 信号转导通路,从而发挥其抗炎、调脂、改善内皮功能、稳定斑块等作用,进而在防治动脉粥样硬化的发生发展中起到重要的作用。

[参考文献]

[1] Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA. LXRs oxysterol activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis[J]. Vasc Pharmacol, 2002, 38(4): 249-256.

[2] Wójcicka G, Wisniewska AJ, Horoszewicz K, et al. Liver X receptors (LXRs): Structure, function, regulation of activity, and role

in lipid metabolism[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2007, 61(12): 736-759.

[3] Beltowski J. Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia[J]. Cardiovasc Ther, 2008, 26(4): 297-316.

[4] 王 丁, 苗春木, 龚建平. 肝 X 受体激动剂对脂多糖诱导的炎症反应相关因子 IRAK-4 和 NF-κB 的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25(4): 293-298.

[5] Crisafulli C, Mazzon E, Paterniti I, et al. Effects of liver X receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation[J]. Respir Res, 2010, 11(1): 19-34.

[6] 颜 伟, 胡厚源, 周 林, 等. LXR 激动剂 3β-羟基-5α,6α 环氧胆酸甲酯对血管内皮细胞 ABCA1、LXRα 表达的影响[J]. 中国新医药, 2004, 3(9): 11-14.

[7] Levin N, Bischoff ED, Daige CL, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 135-142.

[8] Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 7 604-609.

[9] 钱 婕, 刘志华, 程绪杰, 等. 辛伐他汀对脂多糖损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 江苏医药, 2008, 34(4): 328-330.

[10] 李珊珊, 李 澎, 黄启福. 脂多糖对体外培养人脐静脉内皮细胞分泌功能及活力的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(7): 658-661.

[11] 姚 磊, 孙 宇, 张 征. 脂多糖对人脐静脉内皮细胞的直接损伤作用[J]. 基础医学与临床, 2001, 21(5): 479.

[12] Mahajan N, Dhawan V. In vitro modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ and its genes by C-reactive protein: role of atorvastatin[J]. Arch Med Res, 2010, 41(3): 154-161.

[13] Wong J, Quinn CM, Brown AJ. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver X receptor in human macrophage with consequences for cholesterol flux[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(12): 2 365-371.

[14] Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, et al. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 180-189.

[15] Argmann CA, Edwards JY, Sawyez CG, et al. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux[J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 22 212-221.

[16] Guan JZ, Tamasawa N, Murakami H, et al. HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin improves reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia[J]. J Atheroscler Thromb, 2008, 15(1): 20-25.

[17] Sharma I, Dhawan V, Mahajan N, et al. In vitro effects of atorvastatin on lipopolysaccharide-induced gene expression in endometrial stromal cells[J]. Fertil Steril, 2010, 94(5): 1 639-646.

(此文编辑 曾学清)