

# 阿托伐他汀对 HMGB1 诱导血管内皮细胞激活的影响

李馨欣, 杨俊, 杨简, 丁家望, 李松, 董武松

(三峡大学心血管病研究所 三峡大学第一临床医学院心内科, 湖北省宜昌市 443000)

[关键词] 高迁移率族蛋白 1; 阿托伐他汀; 内皮细胞; Toll 样受体 4

[摘要] **目的** 探讨阿托伐他汀能否抑制高迁移率族蛋白 1(HMGB1)诱导的血管内皮细胞激活, 阐明其潜在的分子机制。**方法** 体外培养大鼠胸主动脉内皮细胞, 分别用不同浓度的阿托伐他汀、HMGB1、TLR4 特异性抑制剂 CLI-095 预处理内皮细胞, 荧光定量分析中性粒细胞与内皮细胞的黏附活力; 实时定量 RT-PCR 与 Western blot 分别检测 TLR4、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)和 E-选择素 mRNA 和蛋白的表达水平; 电泳迁移率实验(EMSA)测定核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65 的 DNA 结合活性。**结果** 阿托伐他汀(0.1 ~ 10  $\mu$ mol/L)呈剂量依赖性地抑制 HMGB1 诱导的血管内皮细胞活化。阿托伐他汀预处理能明显下调 HMGB1 诱导的 TLR4 mRNA 和蛋白表达水平( $P$  均  $< 0.05$ ); 阿托伐他汀、CLI-095 均能有效抑制 HMGB1 诱导的 NF- $\kappa$ B p65 的 DNA 结合活性以及 ICAM-1 和 E 选择素的表达水平( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 阿托伐他汀可通过调节黏附分子(ICAM-1 和 E-选择素)的表达而显著抑制 HMGB1 诱导的血管内皮细胞活化效应, 其机制可能与它抑制 TLR4 的表达及 NF- $\kappa$ B 激活有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Atorvastatin on Vascular Endothelial Activation Induced by HMGB1

LI Xin-Xin, YANG Jun, YANG Jian, DING Jia-Wang, LI Song, and DONG Wu-Song

(Cardiovascular Research Institute, China Three Gorges University & Department of Cardiology, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

[KEY WORDS] High Mobility Group Chromosomal Protein 1; Atorvastatin; Endothelial Cells; Toll Like Receptor 4

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether atorvastatin inhibits HMGB1-induced vascular endothelial activation, and clarify the underlying molecular mechanism. **Methods** The cultured endothelial cells (EC) of rats were treated by Atorvastatin, HMGB1, TLR4-specific inhibitor CLI-095 with different concentrations. Leukocyte-endothelial adhesion was calculated as the proportion of the adherent neutrophils fluorescence intensity among the total added cells. RT-PCR and Western blot method were used to assay the expression of Toll like receptor 4(TLR4), ICAM-1, E-selectin mRNA and protein. DNA binding activity of NF- $\kappa$ B was measured by EMSA. **Results** Atorvastatin, at concentrations ranging from 0.1 to 10  $\mu$ mol/L, effectively and in a dose-dependent manner inhibited HMGB1-induced ECs activation. Atorvastatin markedly suppressed TLR4 expression ( $P < 0.05$ ) in ECs; Incubation of ECs with atorvastatin and CLI-095 reduced HMGB1-induced NF- $\kappa$ B p65 DNA binding activity and adhesion molecules (ICAM-1 and E-selectin) expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Atorvastatin can attenuate HMGB1-induced vascular endothelial activation. The underlying mechanism may be connected with inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B-dependent signaling pathway induced leukocyte-endothelial adhesion.

动脉粥样硬化是临床常见病理过程, 血管内皮损伤和功能障碍是其重要始发因素<sup>[1,2]</sup>。炎症反应可显著促进内皮细胞活化, 进而增强中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附作用, 而高迁移率族蛋白 1(HMGB1)与其受体结合后可参与细胞的活化和炎

症反应<sup>[3,4]</sup>。Toll 样受体家族的成员也被证实实在 HMGB1 的信号转导中起到重要作用<sup>[4-6]</sup>, 如 TLR4 可通过识别内源性分子/配体, 如热休克蛋白、基质蛋白和 HMGB1<sup>[5,7]</sup>, 导致 NF- $\kappa$ B 的核转录及炎症相关基因的表达<sup>[8]</sup>, 从而介导炎症反应。他汀类药物

[收稿日期] 2012-04-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170133)和湖北省自然科学基金计划项目(2011CDB179)

[作者简介] 李馨欣, 硕士, 研究方向为冠心病, E-mail 为 lixinxinsx@163.com。通讯作者杨俊, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病, E-mail 为 yangjun@medmail.com.cn。

物,因其能降低胆固醇代谢而被广泛用于冠心病的治疗。有研究者称他汀类药物也具有稳定斑块,抗炎和保护血管内皮作用<sup>[9,10]</sup>。此外,它还可以调节TLR4的信号转导。迄今为止,他汀类药物对血管内皮细胞活化的抑制机制及TLR4表达水平的影响机制尚未完全阐明。本实验旨在研究阿托伐他汀能否抑制HMGB1所诱导的内皮细胞活化,并探讨此作用是否主要是通过TLR4/NF- $\kappa$ B信号转导通路来实现。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

阿托伐他汀由美国Pfizer友情提供,重组人HMGB1和红色荧光膜染料PKH26均购自美国Sigma公司,CLI-095购自美国InvivoGene公司,TLR4抗体、NF- $\kappa$ B p65抗体、ICAM-1抗体、选择素-E抗体、CD31抗体和 $\beta$ -肌动蛋白抗体均购自Santa Cruz公司。

### 1.2 内皮细胞培养及实验分组

从雄性SD大鼠(100~150 g)胸主动脉中分离出原始内皮细胞,以含20%胎牛血清,内皮细胞生长添加剂,100 kU/L的青霉素和100 mg/L链霉素的培养基在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>孵育箱中培养。将培养的第2~5代细胞用于实验,分为5组:①内皮细胞空白对照组;②HMGB1刺激干预组;③阿托伐他汀干预组;④阿托伐他汀干预+HMGB1刺激组;⑤CLI-095干预+HMGB1刺激组。

### 1.3 中性粒细胞的制备及黏附活力测定

采用羧乙基淀粉交换输血法和沉淀技术从大鼠血液中分离出新鲜的中性粒细胞,并用PKH26标记。内皮细胞以 $1 \times 10^4$ 细胞/孔的浓度接种于明胶包被的96孔培养板中,生长融合后,经阿托伐他汀预处理或培养基培养8 h并用HMGB1刺激16 h。洗脱后,将内皮细胞暴露于PKH26标记的中性粒细胞30 min,PBS洗去未黏附的中性粒细胞。将黏附的细胞在激发波长551 nm和发射波长567 nm条件下进行荧光检测,定量分析中性粒细胞与内皮细胞的黏附活力。

### 1.4 实时定量RT-PCR检测内皮细胞TLR4、ICAM-1和E-选择素mRNA表达

总RNA的提取和cDNA的合成采用Trizol法抽提细胞总RNA,取2  $\mu$ g总RNA逆转录成cDNA。实时荧光定量PCR由ABI Prism 7500序列检测系统(PE应用生物系统公司)完成,按照SYBR Premix试剂盒(TaKaRa公司)进行具体操作。用于PCR扩

增的引物均由Sangon Gene公司合成(表1)。定量结果使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较量化方法分析,本实验设定GAPDH为管家基因。

表1. RT-PCR引物序列

Table 1. The primers used for real-time RT-PCR

Gene	Sequence	Product Size (bp)	Accession NO.
TLR4	5'-AGCCATTGCTGCCAACATCA-3' 5'-GCCAGAGCTACTCAGAAAC-3'	148	NM_019178
ICAM-1	5'-CAAACGGGAGATGAATGGTA-3' 5'-AATAGGTGTAATGGACGCC-3'	176	NM_012967
E-选择素	5'-GTCTGCGATGCTGCCTACTTG-3' 5'-CTGCCACAGAAAGTGCCACTAC-3'	73	NM_138879
GAPDH	5'-GACAACCTTTGGCTCGTGA-3' 5'-ATGCAGGGTTCTGG-3'	133	NM_017008

### 1.5 Western blot检测内皮细胞TLR4、ICAM-1和E-选择素蛋白表达

细胞经冰冻PBS洗涤,于裂解缓冲液中采集。细胞核,细胞质和总蛋白样品经10%的SDS-PAGE凝胶电泳分离后,转移至硝酸纤维素膜上。在室温条件下用5%脱脂奶粉及0.05% Tris-缓冲盐溶液封闭后,分别加入TLR4抗体、NF- $\kappa$ B p65抗体、ICAM-1抗体、选择素-E抗体、CD31抗体和 $\beta$ -肌动蛋白抗体,以及辣根过氧化物酶标记的二抗进行孵育。蛋白检测由ECL化学发光检测试剂盒(Pierce)完成。

### 1.6 EMSA测定核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65的DNA结合活性

收集经HMGB1刺激后冷固定1 h的内皮细胞。按照NE-PER试剂盒说明提取核蛋白。取等量核蛋白提取物(5  $\mu$ g),每组加入 $10 \times$  binding buffer, 1 g/L Poly (di2dC)和400 fmol生物素标记的双链NF- $\kappa$ B结合的寡核苷酸探针序列:5'-AGTTGAG GG-GACTTTCCAGGC-3'。

### 1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0统计软件进行分析,多组间数据比较采用单因素方差分析,组间比较应用 $q$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 阿托伐他汀抑制HMGB1诱导的内皮细胞与中性粒细胞黏附

与未经任何干预措施的空白对照组相比,经不

同浓度 HMGB1 刺激活化的单层内皮细胞与中性粒细胞的黏附活力显著增加( $P < 0.05$ , 图 1A)。而在经 HMGB1 刺激前用 CLI-095 预处理 30 min 内皮细胞后, 中性粒细胞与内皮细胞间的黏附作用被显著抑制( $P < 0.05$ )。阿托伐他汀呈剂量依赖性地抑制 HMGB1 诱导的内皮细胞与中性粒细胞黏附。10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀预处理, 抑制率约为 50% ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

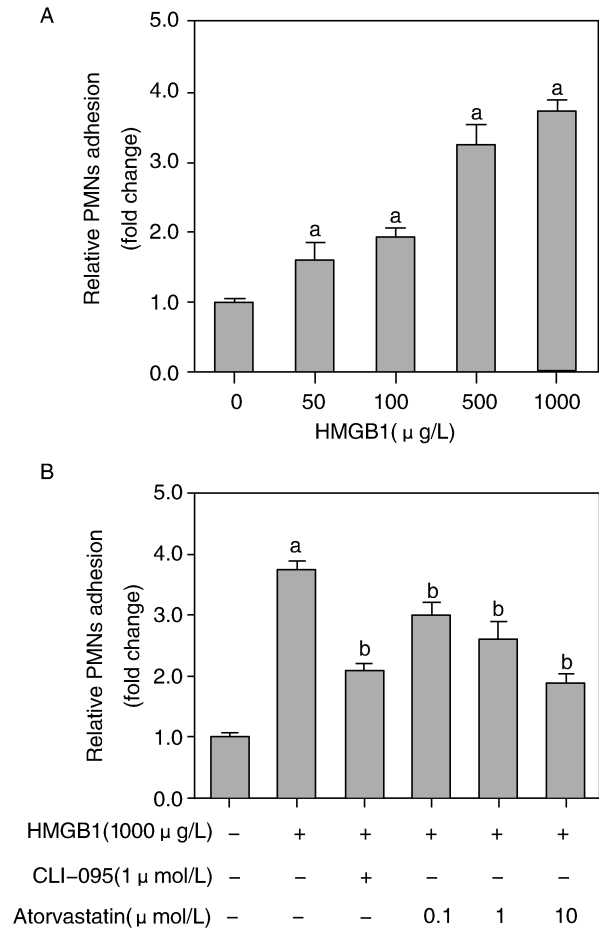


图 1. 阿托伐他汀抑制 HMGB1 诱导的中性粒细胞与内皮细胞黏附

A 图为经不同浓度 HMGB1 刺激 16 h 的内皮细胞与中性粒细胞的黏附活力; B 图为经 CLI-095 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 或不同浓度阿托伐他汀处理一定时间后再经 HMGB1 (1000  $\mu\text{g/L}$ ) 刺激 16 h 的内皮细胞与中性粒细胞的黏附活力。a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与仅用 HMGB1 处理组相比。

Figure 1. Atorvastatin prevented HMGB1-induced PMNs adhesion to ECs

## 2.2 阿托伐他汀对内皮细胞 TLR4 表达水平的影响

在体外实验中未经任何干预措施的内皮细胞低表达 TLR4。而经 HMGB1 (1000  $\mu\text{g/L}$ ) 处理 4 h 后的细胞, TLR4 mRNA 和蛋白表达水平分别明显上

调 4.2 倍和 3.1 倍 ( $P < 0.05$ )。另外, 经 10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀预处理组中, HMGB1 引起的 TLR4 表达增强效应减弱 ( $P < 0.05$ ); 并且与对照组相比, 阿托伐他汀本身并不能影响 TLR4 的表达 (图 2)。

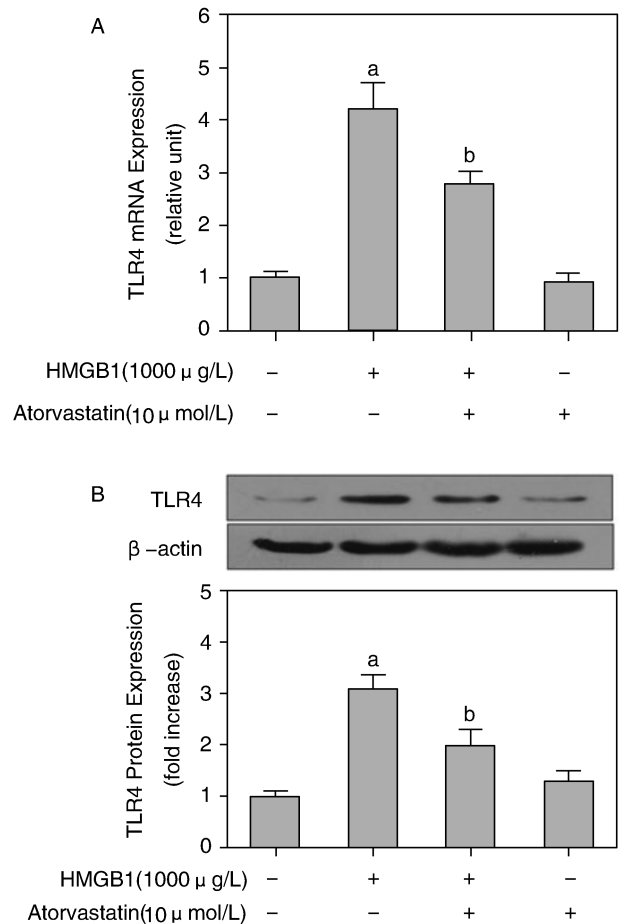


图 2. 阿托伐他汀对内皮细胞 TLR4 表达水平的影响

A 图为实时定量 RT-PCR 检测 TLR4 的 mRNA 的表达; B 图为 Western blot 分析 TLR4 蛋白表达水平。a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组相比。b 为  $P < 0.05$ , 与仅用 HMGB1 处理组相比。

Figure 2. Effect of atorvastatin on TLR4 expression in ECs

## 2.3 阿托伐他汀抑制 HMGB1 诱导的 NF- $\kappa$ B 活化

与对照组相比, 经 HMGB1 (1000  $\mu\text{g/L}$ ) 处理 4 h 后的内皮细胞, NF- $\kappa$ B p65 亚单位的核移位及 DNA 结合活性都显著增加 ( $P < 0.05$ )。而经阿托伐他汀 (10  $\mu\text{mol/L}$ , 8 h) 或 CLI-095 (1  $\mu\text{mol/L}$ , 30 min) 孵育后再经 HMGB1 刺激 1 h, HMGB1 介导的 NF- $\kappa$ B 激活效应明显减弱 ( $P < 0.05$ ; 图 3)

## 2.4 阿托伐他汀对 HMGB1 诱导的内皮细胞黏附分子表达的影响

正常内皮细胞 ICAM-1 和 E-选择素低表达, 经 HMGB1 刺激 16 h 后, 两者表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而阿托伐他汀可抑制此效应 ( $P < 0.05$ )。同

时, CLI-095 也有相同的抑制作用( $P < 0.05$ ; 图 4)。

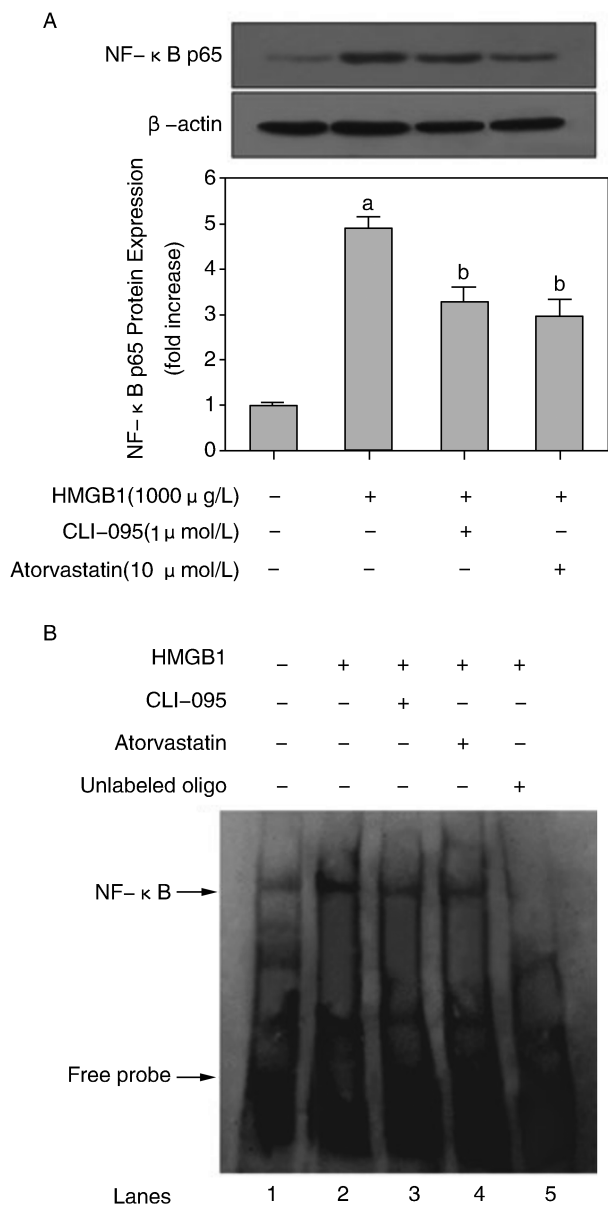


图 3. 阿托伐他汀或 CLI-095 预处理抑制 HMGB1 诱导的内皮细胞 NF-κB 的核移位和 DNA 结合活性 A 图为 Western blot 分析检测细胞核提取物中 NF-κB p65 亚单位的核移位; B 图为 EMSA 测定 NF-κB 的 DNA 结合活性。a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与仅用 HMGB1 处理组相比。

Figure 3. Pretreatment with atorvastatin or CLI-095 inhibited HMGB1-induced NF-κB nuclear translocation and DNA binding in ECs

### 3 讨论

血管内皮细胞活化促进动脉粥样硬化的发生是由多种因素引起的, 包括炎症、缺氧和机械损伤<sup>[11-13]</sup>, 其中, 炎症反应被认为是最重要的影响因

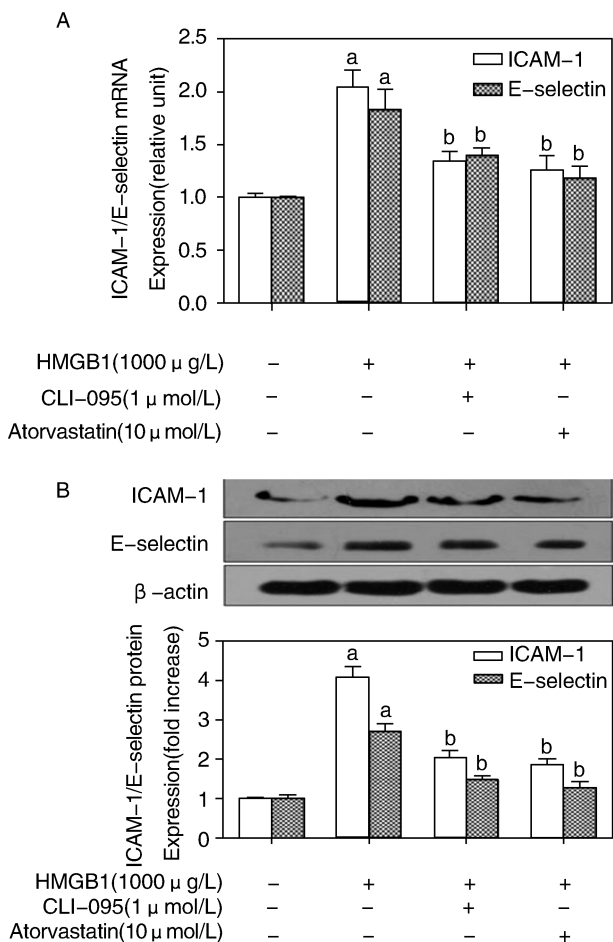


图 4. 阿托伐他汀和 CLI-095 对 HMGB1 诱导的黏附分子表达的影响 A 图为实时定量 RT-PCR 检测细胞 ICAM-1 和 E-选择素 mRNA 水平; B 图为 Western blot 分析其蛋白表达水平。a 为  $P < 0.05$ , 与空白对照组相比较; b 为  $P < 0.05$ , 与仅用 HMGB1 处理组相比。

Figure 4. Effect of atorvastatin and CLI-095 on HMGB1-stimulated adhesion molecules production

素。而 HMGB1 是由坏死细胞和活化的巨噬细胞/单核细胞分泌的一种促炎性细胞因子, 它与 RAGE 结合后可诱导内皮细胞活化<sup>[4]</sup>。TLR4 作为 HMGB1 的细胞表面受体, 在炎症初始阶段起着至关重要的作用。然而, 关于 TLR4 是否参与了调节了 HMGB1 诱导的血管内皮活化效应, 目前尚无相关报道。我们的实验结果显示, 经 HMGB1 处理的内皮细胞, TLR4 和黏附分子(ICAM-1 和选择素-E) 表达水平均显著上调, NF-κB 的 DNA 结合活性也明显增强; 此外, TLR4 抑制剂 CLI-095 能有效地抑制中性粒细胞与内皮细胞的黏附, 这表明, HMGB1 所诱导的血管内皮细胞的活化效应, 可能是通过 TLR4/NF-κB 信号通路来发挥作用的。

TLR4 的活化可增加其自身的表达水平, 从而增

强宿主先天免疫和防御能力。因而,TLR4 的表达在血管内皮功能障碍发生发展的过程中是具有保护作用的。但是,TLR4 的过度表达也可能导致血管内皮损伤。在本研究中我们发现,经 HMGB1 刺激的内皮细胞,TLR4 的表达明显上调,是未经处理对照组的 4 倍。众所周知,TLR4 是 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活物,主要黏附分子(ICAM-1 和选择素-E)是 NF- $\kappa$ B 信号通路的靶基因<sup>[14-16]</sup>。另外,一些研究也证实,NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,以及随后的黏附分子的表达,是炎症反应中白细胞聚集活化血管内皮的关键步骤<sup>[17]</sup>。

阿托伐他汀,临床最有效的他汀类药物之一,除了具有高效的降脂作用,也发挥抗炎和血管内皮保护作用<sup>[9,10,18]</sup>。虽然阿托伐他汀对血管内皮细胞的保护作用已经报道,但对其涉及的机制仍然知之甚少。我们的研究结果显示,阿托伐他汀预处理可降低细胞 ICAM-1 和 E-选择素的表达,从而减弱 HMGB1 诱导的内皮细胞与白细胞之间的黏附作用。阿托伐他汀对 HMGB1 诱导的内皮活化的抑制作用主要是通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的下调来实现的。此外,我们还发现在无 HMGB1 处理的实验组与对照组,相同剂量的阿托伐他汀对 TLR4 的表达并无显著影响。由此我们推测,在正常情况下反馈机制对维持基因表达的稳定性可能至关重要。

总之,阿托伐他汀可通过调节黏附分子(ICAM-1 和 E-选择素)的表达而抑制 HMGB1 诱导的血管内皮细胞活化效应,证实了病理条件下阿托伐他汀对于血管内皮的保护功能,这可能与它抑制 TLR4 的表达及 NF- $\kappa$ B 的激活有关。本研究为阿托伐他汀通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 HMGB1 介导的内皮细胞活化效应,提供了新的实验依据。

#### [参考文献]

[1] Xi H, Akishita M, Nagai K, et al. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191 (2): 281-289.

[2] Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335 (1): 191-203.

[3] Kostova N, Zlateva S, Ugrinova I, et al. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 337 (1-2): 251-258.

[4] 殷亚昕, 刘润梅, 翟红霞, 等. 辛伐他汀对动脉粥样硬化大鼠高迁移率族蛋白 1 表达的影响 [J]. *实用老年医学*, 2010, 2: 128-

131.

[5] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (9): 7 370-377.

[6] Park JS, Gamboni-robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290 (3): C917-C924.

[7] Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19 (1): 3-10.

[8] Sassz' MF, Sauri AE, Souza LF, et al. Response of macrophage Toll-like receptor 4 to a *Sporothrix schenckii* lipid extract during experimental sporotrichosis [J]. *Immunology*, 2009, 128 (2): 301-309.

[9] Liu PY, Liu YW, Lin LJ, et al. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation [J]. *Circulation*, 2009, 119 (1): 131-138.

[10] Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203 (2): 325-330.

[11] Szmítka PE, Wang CH, Weisel RD, et al. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II [J]. *Circulation*, 2003, 108 (17): 2 041-048.

[12] Ou HC, Lee WJ, Lee IT, et al. Ginkgo biloba extract attenuates oxLDL-induced oxidative functional damages in endothelial cells [J]. *J Appl Physiol*, 2009, 106 (5): 1 674-685.

[13] Wang JS, Singh H, Zhang F, et al. Endothelial dysfunction and hypertension in rats transduced with CYP4A2 adenovirus [J]. *Circ Res*, 2006, 98 (7): 962-969.

[14] Ibeagha-awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and down-stream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells [J]. *Vet Res*, 2008, 39 (2): 11.

[15] Jiang H, Jiang YJ. Effects of yiqi huoxue compound contained drug serum on the expressions of toll-like receptor 4 and downstream signal transduction pathway, and LOX-1, TNF-alpha, ICAM-1 in the human vein endothelial Cells [J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2012, 32 (2): 219-223.

[16] 朱彦琪, 张治, 安英华, 等. 大鼠主动脉内皮损伤后核因子  $\kappa$ B 活性的动态变化及血管细胞黏附分子 1 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (11): 921-924.

[17] Zhou Z, Connell MC, Macewan DJ. TNFR1-induced NF-kappaB, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells [J]. *Cell Signal*, 2007, 19 (6): 1 238-248.

[18] 蒋卫红, 谭丽华, 杨侃, 等. RhoA/Rho 激酶在氟伐他汀对组织因子表达影响中的调控作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (2): 117-120.

(此文编辑 李小玲)