

缬沙坦抑制非对称二甲基精氨酸诱导的内皮细胞 LOX-1 的表达

黄 婷, 唐 丽, 栗夏连

(郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 非对称二甲基精氨酸; 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; NADPH 氧化酶; 活性氧; 缬沙坦

[摘要] 目的 研究缬沙坦对非对称二甲基精氨酸(ADMA)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1) mRNA 和蛋白表达的影响,并探讨其机制。方法 体外培养 HUVEC,以不同浓度的缬沙坦和 15 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 共同孵育 24 h,DCFH-DA 检测细胞内活性氧(ROS)生成量;RT-PCR 测定 NADPH 氧化酶 p22phox 及 LOX-1 mRNA 的转录水平;酶联免疫吸附法检测细胞 LOX-1 蛋白的表达水平。结果 与 ADMA 组相比,缬沙坦干预后细胞 ROS 水平显著下降($P < 0.05$),p22phox 和 LOX-1 mRNA 转录水平及 LOX-1 蛋白的表达水平明显下调($P < 0.05$),并呈剂量依赖性。结论 缬沙坦通过抑制 p22phox 的表达减少细胞内 ROS 水平,进而抑制 ADMA 诱导的内皮细胞 LOX-1 mRNA 转录和蛋白表达,这可能是其独立于降压作用的抗动脉粥样硬化作用的部分机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Valsartan Inhibited the Effect of Asymmetric Dimethylarginine Induced LOX-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HUANG Ting, TANG Li, and LI Xia-Lian

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] Asymmetric Dimethylarginine; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor 1; NADPH Oxidase; Reactive Oxygen Species; Valsartan

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of valsartan on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression induced by asymmetric dimethylarginine (ADMA) in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** 15 $\mu\text{mol/L}$ ADMA was added into the cultured HUVEC for 24 h, intracellular reactive oxygen species (ROS) generation was measured by DCFH-DA. NADPH p22phox subunit and LOX-1 mRNA transcription were detected by quantitative competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). LOX-1 protein expression was detected by cell enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Valsartan significantly decreased intracellular ROS generation, inhibited the transcription of p22phox, LOX-1 mRNA and LOX-1 protein expression compared with ADMA group ($P < 0.05$), and this effect was in a dose-dependent manner. **Conclusions** Valsartan inhibited expression of LOX-1 induced by ADMA, involving in inhibiting the expression of p22phox through decreasing intracellular ROS generation. This may be part of the mechanism of its anti-atherosclerotic effect independent of anti-hypertensive effect.

缬沙坦是临床上常用的一种血管紧张素受体拮抗剂,广泛用于高血压及糖尿病肾病的治疗。VALUE 研究^[1]表明,在血压水平控制相同的情况下,缬沙坦与氨氯地平相比能更有效地降低心力衰竭、新发糖尿病、水肿、心绞痛的发生率。NAVIGATOR 研究^[2]显示缬沙坦可使糖耐量异常发展为糖

尿病的几率降低 14%,提示其有降压外的有益作用。更有相关研究显示缬沙坦具有独立于降压作用的抗氧化应激作用^[3,4]。

研究发现,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, NOS)抑制剂—非对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)可致内皮

[收稿日期] 2013-02-01

[作者简介] 黄婷,硕士研究生,E-mail 为 lily20081994@163.com。唐丽,硕士研究生。通讯作者栗夏连,主任医师,硕士研究生导师,主要从事内分泌与代谢疾病的诊断和治疗,E-mail 为 xialianli@hotmail.com。

细胞功能紊乱,在多种动脉粥样硬化疾病中水平升高。动物实验表明,灌注 ADMA 可致血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)mRNA 和蛋白表达上调,诱导冠状微动脉斑块的形成,而血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor,ACEI)和血管紧张素受体阻断剂(angiotensin receptor blocker,ARB)可逆转 ADMA 的上述效应^[5,6]。我们前期的研究显示,ADMA 可通过 NADPH 氧化酶 p22phox/ROS 途径上调人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1,LOX-1)mRNA 和蛋白的表达,进而增加其对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)的摄取,促进动脉硬化的发生、发展。亦有研究发现缬沙坦可逆转血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,Ang Ⅱ)所致的 LOX-1 表达上调^[7]。那么缬沙坦是否可阻断 ADMA 对 LOX-1 表达的影响以及是否能够通过抗氧化应激途径发挥抗动脉粥样硬化的作用呢?本研究通过观察缬沙坦对 ADMA 诱导的 HUVEC LOX-1 mRNA 转录和蛋白表达的影响,探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HUVEC(EA. HY926)购自美国 ATCC 公司;缬沙坦由北京诺华制药有限公司惠赠,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,ADMA、DPI 购自美国 Sigma 公司,活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒购自碧云天生物试剂公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,兔抗人 LOX-1 多克隆抗体购自武汉博士德公司,生物素化山羊抗兔 IgG 及辣根酶标记链亲和素购自北京中杉金桥生物有限公司,其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 HUVEC 的培养

HUVEC 培养于含 10% 胎牛血清、10 $\mu\text{mol/L}$ 青霉素、10 $\mu\text{mol/L}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,37℃、5% CO₂ 培养箱培养。2~3 天更换培养基 1 次,待细胞 80% 汇合时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。细胞于实验前换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞达到同步化。每组设平行测量 6 份,并重复实验 3 次。

1.3 实验分组

将细胞随机分成:①对照组(DMEM 培养基);②

ADMA 组(加 15 $\mu\text{mol/L}$ ADMA);③10⁻⁵ mol/L、10⁻⁶ mol/L 及 10⁻⁷ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组(10⁻⁵ mol/L、10⁻⁶ mol/L 及 10⁻⁷ mol/L 缬沙坦分别预作用 1 h 后再加入 15 $\mu\text{mol/L}$ ADMA);④缬沙坦组(单独加 10⁻⁵ mol/L 缬沙坦)。各组细胞均继续培养 24 h。

1.4 RT-PCR 检测 NADPH p22phox 和 LOX-1 mRNA 的表达

胰酶消化后收集 6 孔板处理后的细胞,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 检测,实验重复 3 次。用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物,p22phox(371 bp)引物上游为 5'-GTT TGT GTG CCT GCT GGA GT-3',下游为 5'-TGG GCG GCT GCT TGA TGG T-3';LOX-1(251 bp)引物上游为 5'-ACT CTC CAT GGT GGT GCC TGG-3',下游为 5'-CAT TCA GCT TCC GAG CAA GGG-3';GAPDH(454 bp)引物上游为 5'-GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC-3',下游为 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA-3'。反应结束取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,医学图像分析系统摄图,分别用 p22phox、LOX-1 与 GAPDH 基因灰度值的比值来表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.5 ROS 检测

细胞内 ROS 水平用荧光探针 DCFH-DA 活性氧检测试剂盒检测,按照说明书的流程操作,以流式细胞仪检测细胞内平均荧光强度反应 ROS 水平。

1.6 ELISA 检测 LOX-1 的蛋白表达

参考 Yang 等^[8]方法并加以改动。收集 96 孔板处理后的细胞,弃培养液,用 PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,脱脂奶粉封闭 30 min,加兔抗人 LOX-1 多克隆抗体,37℃ 孵育 2 h,洗板 5 次,拍干后加入生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h,洗板 5 次,拍干后加入酶联物 37℃ 孵育 1 h,加入 TMB 显色 15 min,以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,450 nm 酶标仪测吸光度(A),结果以 A₄₅₀ 表示细胞蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缬沙坦对 ADMA 诱导的细胞 ROS 的影响

与对照组相比,ADMA 组细胞内 ROS 水平明显增高($P < 0.05$),单独应用缬沙坦对细胞 ROS 水平

无明显影响($P>0.05$);与 ADMA 组相比,缬沙坦预处理组呈剂量依赖地减少 ADMA 所致的细胞 ROS 水平增高($P<0.05$;表 1 和图 1)。

2.2 缬沙坦对 ADMA 诱导的细胞 p22phox mRNA 转录的影响

与对照组相比,ADMA 组 p22phox mRNA 转录明显增高($P<0.05$),单独应用缬沙坦对 p22phox mRNA 转录无明显影响($P>0.05$);与 ADMA 组相比,缬沙坦预处理组呈剂量依赖地下调 ADMA 诱导

的 p22phox mRNA 转录($P<0.05$;表 1)。

2.3 缬沙坦对 ADMA 诱导的细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白水平的影响

与对照组相比,ADMA 组细胞 LOX-1 mRNA 和蛋白表达水平均明显增高($P<0.05$),单独应用缬沙坦对 LOX-1 的表达无明显影响($P>0.05$);与 ADMA 组相比,缬沙坦预处理组呈剂量依赖地下调 ADMA 诱导的 LOX-1 mRNA 和蛋白表达水平($P<0.05$;表 1 和图 2)。

表 1. 缬沙坦对 ADMA 诱导的细胞 ROS、p22phox 和 LOX-1 mRNA 及 LOX-1 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1. The effect of valsartan on the expression of ADMA induced intracellular ROS, p22phox and LOX-1 mRNA and LOX-1 protein

分 组	ROS 水平	p22phox mRNA	LOX-1 mRNA	LOX-1 蛋白
对照组	41.150 ± 1.202	1	0.105 ± 0.080	0.353 ± 0.038
ADMA 组	91.570 ± 0.929 ^a	3.847 ± 0.114 ^a	0.402 ± 0.194 ^a	0.512 ± 0.018 ^a
10 ⁻⁷ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组	81.170 ± 0.586 ^b	3.108 ± 0.021 ^b	0.349 ± 0.031 ^b	0.488 ± 0.11 ^b
10 ⁻⁶ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组	61.200 ± 0.557 ^{bc}	2.389 ± 0.023 ^{bc}	0.226 ± 0.022 ^{bc}	0.446 ± 0.018 ^{bc}
10 ⁻⁵ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组	45.230 ± 1.150 ^{bed}	1.606 ± 0.095 ^{bed}	0.158 ± 0.031 ^{bed}	0.417 ± 0.012 ^{bed}
缬沙坦组	40.070 ± 0.351	0.970 ± 0.022	0.101 ± 0.023	0.356 ± 0.020

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ADMA 组比较;c 为 $P<0.05$,与 10⁻⁷ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组比较;d 为 $P<0.05$,与 10⁻⁶ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组比较。

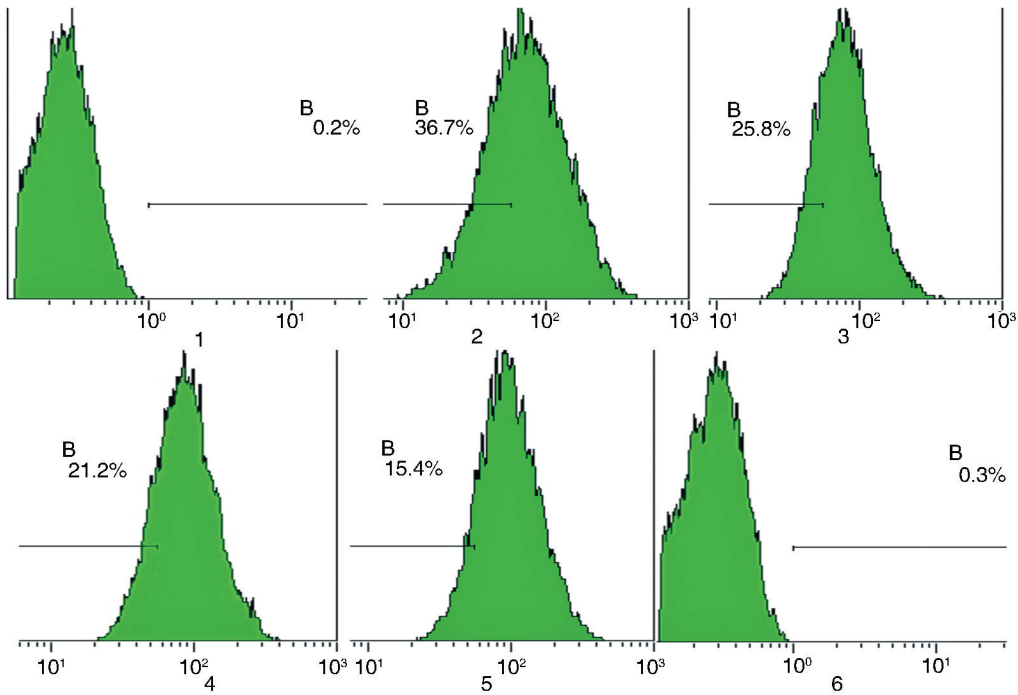


图 1. 缬沙坦对 ADMA 诱导的细胞 ROS 的影响 1 为对照组,2 为 ADMA 组,3 为 10⁻⁷ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,4 为 10⁻⁶ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,5 为 10⁻⁵ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,6 为缬沙坦组。

Figure 1. The effect of valsartan on the expression of ADMA induced intracellular ROS

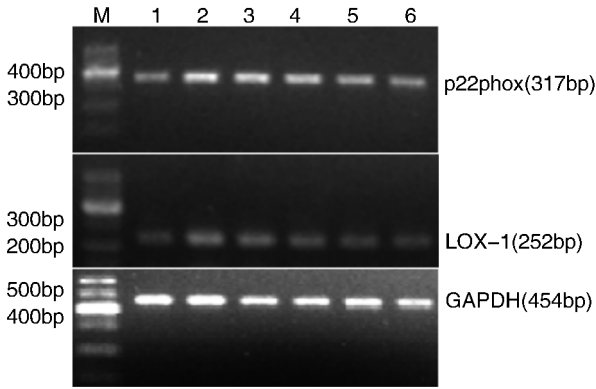


图 2. ADMA 对细胞 p22phox 和 LOX - 1 mRNA 表达的影响及缬沙坦的干预作用 M 为 Marker,1 为对照组,2 为 ADMA 组,3 为 10⁻⁷ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,4 为 10⁻⁶ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,5 为 10⁻⁵ mol/L 缬沙坦 + ADMA 组,6 为缬沙坦组。

Figure 2. The effect of ADMA on the expression of intracellular p22phox and LOX - 1 mRNA and the intervention effect of valsartan

3 讨 论

ADMA 是由体内含有甲基化精氨酸残基的蛋白分解而来,其在多种动脉粥样硬化疾病中升高,被认为是心血管疾病独立的预测因子。LOX-1 是一种在内皮细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞上均有表达的清道夫受体 (scavenger receptor, SR),它可以通过摄取 ox-LDL 参与泡沫细胞的形成,进而在动脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用^[9]。CHEN 等^[10]研究发现,ox-LDL、LOX-1 和 ROS 组成了一个促进泡沫细胞形成的“信号通路”,在泡沫细胞的形成乃至诱导动脉粥样硬化发生中起始动作用。在这一通路中,ox-LDL 是“激活子”,LOX-1 是信号“转导子”,ROS 是“催化子”和“诱导剂”。

目前认为,动脉粥样硬化的核心环节为内皮功能不全,而氧化应激与内皮功能损伤的发生、发展密切相关^[11]。氧化应激时机体在各种因素刺激下产生大量的 ROS,并伴有体内清除 ROS 的能力下降,造成正常的氧化还原平衡被打破。血管内皮细胞 ROS 主要来源于 NADPH 氧化酶,其中 p22phox 是 NADPH 氧化酶产生 ROS 的关键亚基,在细胞内稳定表达。Veresh 等^[12]研究发现 ADMA 可上调 p22phox mRNA 的表达,致氧化应激水平增加。而 Nagase 等^[13]研究显示氧化应激是血管内皮 LOX-1 表达上调的重要原因。与上述结果一致,本研究结果显示,ADMA 通过上调 p22phox mRNA 的表达,增加细胞氧化应激水平,从而使 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达增加。

近年来,研究表明 Ang II 在 ROS 的产生中起重要的作用,在内皮细胞中 Ang II 可通过 NADPH 氧化酶诱导 ROS 产生^[14]。亦有研究证实 ADMA 可激活局部的肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS),促进 Ang II 释放,从而激活 NADPH 氧化酶^[15]。动物实验表明,灌注 ADMA 可致 ACE mRNA 和蛋白表达上调,诱导冠状微动脉斑块形成,而 ACEI、ARB 可逆转 ADMA 的上述效应。以上结果提示 ADMA 可通过 Ang II 途径致动脉粥样硬化。因此,干预 Ang II 效应的药物可对抗 ADMA 的致动脉粥样硬化作用。

缬沙坦是临床常用的 Ang II 受体拮抗剂,广泛用于高血压及糖尿病肾病的治疗。大量的临床及动物实验表明,缬沙坦具有独立于降压效果的抗动脉粥样硬化作用,张磊等^[7]发现缬沙坦可逆转 Ang II 所致的 LOX-1 表达上调,Hanefeld 等^[16]发现缬沙坦在降压的同时,可以显著降低血总胆固醇和 LDL 水平。且相关研究显示缬沙坦具有独立于降压效果的抗氧化应激作用^[3,4]。Yung 等^[17]发现缬沙坦可降低卵巢切除后雌鼠的 p22phox 的表达,改善其内皮依赖的舒张功能。而缬沙坦是否可影响 ADMA 对 LOX-1 的诱导表达作用及其是否通过抗氧化应激途径发挥作用的研究较少。本研究通过体外培养 HUVEC,以不同浓度的缬沙坦和 15 μmol/L ADMA 共同孵育 24 h,结果发现,缬沙坦呈剂量依赖性抑制 ADMA 诱导的血管内皮细胞 LOX-1 表达,进一步研究发现,缬沙坦呈剂量依赖性下调 p22phox mRNA 表达,使细胞 ROS 水平降低,提示缬沙坦可通过抗氧化效应保护与改善内皮细胞,起到抗动脉粥样硬化的作用。

综上所述,缬沙坦可通过下调 NADPH 氧化酶 p22phox 亚基的表达,降低细胞活性氧水平,抑制 ADMA 对 LOX-1 表达的影响,为缬沙坦抗动脉粥样硬化提供了新的依据。

[参考文献]

[1] Julius S, Weber MA, Kjeldsen SE, et al. The valsartan antihypertensive long-term use evaluation (VALUE) trial: outcomes in patients receiving monotherapy[J]. Hypertension, 2006, 48 (3): 385-391.

[2] NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, et al. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2010, 362 (16): 1 477-490.

[3] Dandona P, Kumar V, Aljada A, et al. Angiotensin II re-

- ceptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88 (9): 496-501.
- [4] Hussein O, Shneider J, Rosenblat M, et al. Valsartan therapy has additive anti-oxidative effect to that of fluvastatin therapy against low-density lipoprotein oxidation: studies in hypercholesterolemic and hypertensive patients [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 40 (1): 28-34.
- [5] Hasegawa K, Wakino S, Tatematsu S, et al. Role of asymmetric dimethylarginine in vascular injury in transgenic mice overexpressing dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 [J]. *Circ Res*, 2007, 101 (2): e2-e10.
- [6] Suda O, Tsutsui M, Morishita T, et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (9): 1682-688.
- [7] 张磊, 黄元伟, 姚航平. 血管紧张素 II 和缬沙坦对豚脐静脉内皮细胞血凝素样氧化低密度脂蛋白受体表达的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30 (10): 630-633.
- [8] Yang XY, Jiang HG, Hartmann WK, et al. Development of a quantitative antigen specific cell based ELISA for the 7G7/ B6 monoclonal antibody directed toward IL-2Ra [J]. *J Immunol Meth*, 2003, 277 (1-2): 87-100.
- [9] 林令君, 王晓俐, 吕晓霞, 等. 葡萄糖和厄贝沙坦对单核巨噬细胞系凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (2): 107-110.
- [10] CHEN XP, ZHAO HY, ZHONG ZF, et al. "Ox-LDL-LOX-1-ROS" signaling pathway involvement in foam cell formation [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (7): 577-581.
- [11] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress [J]. *Circ Res*, 2000, 87 (10): 840-844.
- [12] Veresh Z, Racz A, Lotz G, et al. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NADPH oxidase pathway [J]. *Hypertension*, 2008, 52: 960-966.
- [13] Nagase M, Ando K, Nagase T, et al. Redox-sensitive regulation of LOX-1 gene expression in vascular endothelium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281 (3): 720-725.
- [14] Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, et al. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low-density lipoproteins [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 115 (2): 201-215.
- [15] Veresh Z, Racz A, Lotz G, et al. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway [J]. *Hypertension*, 2008, 52 (5): 960-966.
- [16] Hanefeld M, Abletshauser C. Effect of the angiotensin II receptor antagonist valsartan on lipid profile and glucose metabolism in patients with hypertension [J]. *J Int Med Res*, 2001, 29 (4): 270-279.
- [17] Yung LM, Wong WT, Tian XY, et al. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (3): e17437.

(此文编辑 文玉珊)