

辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管细胞粘附分子表达的影响

张 路, 吴宗贵

(中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心内科, 上海市 200003)

[关键词] 药理学; 辛伐他汀的抗动脉粥样硬化作用; 免疫细胞化学; 细胞粘附分子; 人脐静脉内皮细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β

[摘要] 观察辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管细胞粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 表达的影响。采用免疫细胞化学及 Western blot 蛋白印迹方法, 观察促炎症因子肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 对体外培养的人脐静脉内皮细胞中血管细胞粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 表达的影响, 并以辛伐他汀干预, 观察其对上述作用的影响。结果发现, 肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 明显增加人脐静脉内皮细胞中血管细胞粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 的表达, 辛伐他汀可一定程度抑制上述作用。结果提示, 辛伐他汀一定程度抑制促炎症因子刺激导致的细胞粘附分子表达上调, 可能具有增加粥样斑块稳定性和延缓动脉粥样硬化进程的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Effects of Simvastatin on the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

ZHANG Lu, and WU Zong-Gui

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Cell Adhesion Molecule; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin 1β ; Simvastatin; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Simvastatin on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human umbilical vein endothelial cell (hUVEC).

Methods The effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1β (IL- 1β) and Simvastatin on the protein levels of VCAM-1 and ICAM-1 in hUVEC were observed by means of immunocytochemistry and Western blot.

Results TNF- α and IL- 1β significantly upregulated the protein levels of VCAM-1 and ICAM-1 in hUVEC, which were inhibited by Simvastatin.

Conclusion Simvastatin inhibited the upregulations of VCAM-1 and ICAM-1 stimulated by proinflammatory factors, which may increase the stability of plaques and decelerate the progression of atherosclerosis.

动脉粥样硬化是动脉血管壁一种慢性炎症性疾病, 其确切机制尚未完全阐明, 很多因素可促进其发生发展。血管内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化的重要始动环节, 而血管内皮细胞与白细胞和单核细胞等炎症细胞的粘附是动脉粥样硬化最早的细胞行为之一^[1], 某些炎症因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 1β (interleukin 1β , IL- 1β) 可通过影响上述过程进而影响动脉粥样硬化的进程。他汀类药物对动脉粥样硬化进程的影响是近年心血管病研究热点, 但他汀类药物对血管内皮细胞中细胞粘附分子表达影响的研究近些年来才见报道^[2,3]。本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, hUVEC), 采用

免疫细胞化学方法, 观察炎症因子 TNF- α 和 IL- 1β 对血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达的影响, 采用 Western blot 方法对 VCAM-1 表达进行分析, 并观察辛伐他汀对上述过程的干预作用, 旨在探讨他汀类药物抗动脉粥样硬化作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器及药物

RPMI1640 培养基、胶原酶、胰蛋白酶、TNF- α 和 IL- 1β 及细胞培养瓶和 6 孔细胞培养板均购自 Sigma 公司; 兔抗人 VCAM-1 和 ICAM-1 单抗购自 Santa Cruz 公司; 其余试剂均为国产分析纯。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 721 型分光光度计 (国营东方仪器厂); Simvastatin 原粉由默沙东制药有限公司提供; Smartscape 生

[收稿日期] 2003-09-27

[修回日期] 2004-05-24

[作者简介] 张路, 博士研究生, 主要研究方向为冠心病不稳定性斑块的发生机制及防治, E-mail 为 tjzlat@sina.com。吴宗贵, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病、高血压病的发生机制及防治。

物电泳图像处理系统由上海复日公司出品。

1.2 细胞培养和鉴定

取人新鲜脐带,以 0.1% 胶原酶消化,收集细胞,计数后加 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清、100 ku/L 青霉素、100 ku/L 链霉素、2 mg 谷氨酰胺),37℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞汇合铺满瓶底后,以 0.25% 胰蛋白酶消化、传代、计数,以 5×10^8 /L 的密度接种于 25 mL 培养瓶继续培养,隔天换液一次,培养 24 h 用于实验。采用形态学及抗人血管性假血友病因子抗体免疫荧光染色进行鉴定内皮细胞,实验前 2% 台盼蓝染色估算细胞活力。

1.3 实验细胞分组

将细胞接种于 6 孔细胞培养板并随机分为下列各组,每组样本数为 6。空白对照组为未加任何干预因素的 hUVEC 悬液 1.0 mL 孵育 24 h; 辛伐他汀组为 hUVEC 悬液 1.0 mL 与辛伐他汀 1 μ mol/L 共同孵育 24 h; TNF- α 组为 hUVEC 悬液 1.0 mL 与 TNF- α 10 μ g/L 共同孵育 24 h; 辛伐他汀+ TNF- α 组为 hUVEC 悬液 1.0 mL 预先与辛伐他汀 1 μ mol/L 孵育 2 h,再加 TNF- α 10 μ g/L 共同孵育 24 h; IL-1 β 组为 hUVEC 悬液 1.0 mL 与 IL-1 β 10 μ g/L 共同孵育 24 h; 辛伐他汀+ IL-1 β 组为 hUVEC 悬液 1.0 mL 预先与辛伐他汀 1 μ mol/L 孵育 2 h,再加 IL-1 β 10 μ g/L 共同孵育 24 h。

1.3 人脐静脉内皮细胞培养上清液乳酸脱氢酶活性测定

将培养的 hUVEC 接种于 6 孔板中,按上述各组处理后,最后收集培养上清液,采用 LDH 试剂盒测定各组 LDH 活性。

1.4 免疫细胞化学检查

将培养的 hUVEC 接种于含盖玻片的 6 孔板中,按上述各组处理后,取出盖玻片,PBS 洗 2 次后于 95% 酒精中固定 30 min,取出晾干,分别利用兔抗人 VCAM-1 和 ICAM-1 单抗行免疫细胞化学检查,以 PBS 代替抗体作为阴性对照。请 2 名病理学专业人员将免疫细胞化学检查结果按强阳性、弱阳性和阴性进行分级。

1.5 Western blot 蛋白印迹分析

参照有关方法,取各组 hUVEC 悬液加入蛋白裂解液,4℃、12 kr/min 离心 20 min,蛋白定量后各取等量样本行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,封闭液中封闭 1 h,将膜与第一抗体共同孵育 90 min,漂洗后与辣根过氧化物酶标记的第二抗体共同孵育 45 min,加等体积增强发光化学试剂孵育 1 min,在暗室将膜在感

光胶片上曝光并用相纸显影洗像,调整曝光时间直至显影出电泳带,采用 Smartscape 生物电泳图像处理系统对免疫复合物进行分析。

1.6 统计学分析

各组培养上清液 LDH 活性采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,各组信号强度比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞培养上清液乳酸脱氢酶的活性

空白对照组和辛伐他汀组 LDH 活性无显著性差异($P > 0.05$),TNF- α 组和 IL-1 β 组 LDH 活性显著高于空白对照组($P < 0.05$),辛伐他汀+ TNF- α 组,辛伐他汀+ IL-1 β 组 LDH 活性分别显著低于 TNF- α 组和 IL-1 β 组($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

表 1. 人脐静脉内皮细胞培养上清液乳酸脱氢酶活性 ($\bar{x} \pm s$, u/L)

Table 1. Levels of LDH in hUVEC supernatants of the six groups

分 组	LDH 活性
空白对照组	78.57 \pm 1.83
辛伐他汀组	80.23 \pm 2.19
TNF- α 组	271.86 \pm 6.76 ^b
辛伐他汀+ TNF- α 组	157.94 \pm 4.53 ^a
IL-1 β 组	224.33 \pm 3.46 ^b
辛伐他汀+ IL-1 β 组	147.90 \pm 4.39 ^a

a: $P < 0.05$, 与 TNF- α 组和 IL-1 β 组比较; b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 免疫细胞化学结果

空白对照组和辛伐他汀组未见 VCAM-1 阳性表达信号,其它各组均可见不同程度的褐色阳性表达信号,主要沿细胞膜周围分布,胞浆内也有表达。辛伐他汀+ TNF- α 组、辛伐他汀+ IL-1 β 组 VCAM-1 阳性表达信号强度分别明显弱于 TNF- α 组和 IL-1 β 组。相应地,空白对照组和辛伐他汀组未见 ICAM-1 阳性表达信号,其它各组均可见不同程度的褐色阳性表达信号,阳性表达信号主要存在于细胞膜及核周。辛伐他汀+ TNF- α 组、辛伐他汀+ IL-1 β 组 ICAM-1 阳性表达信号强度分别明显弱于 TNF- α 组和 IL-1 β 组。对各组免疫细胞化学染色信号强度进行分级,经统计学处理后结果同上(图 1 及表 2 和 3, Figure 1 and Table 2 and 3)。

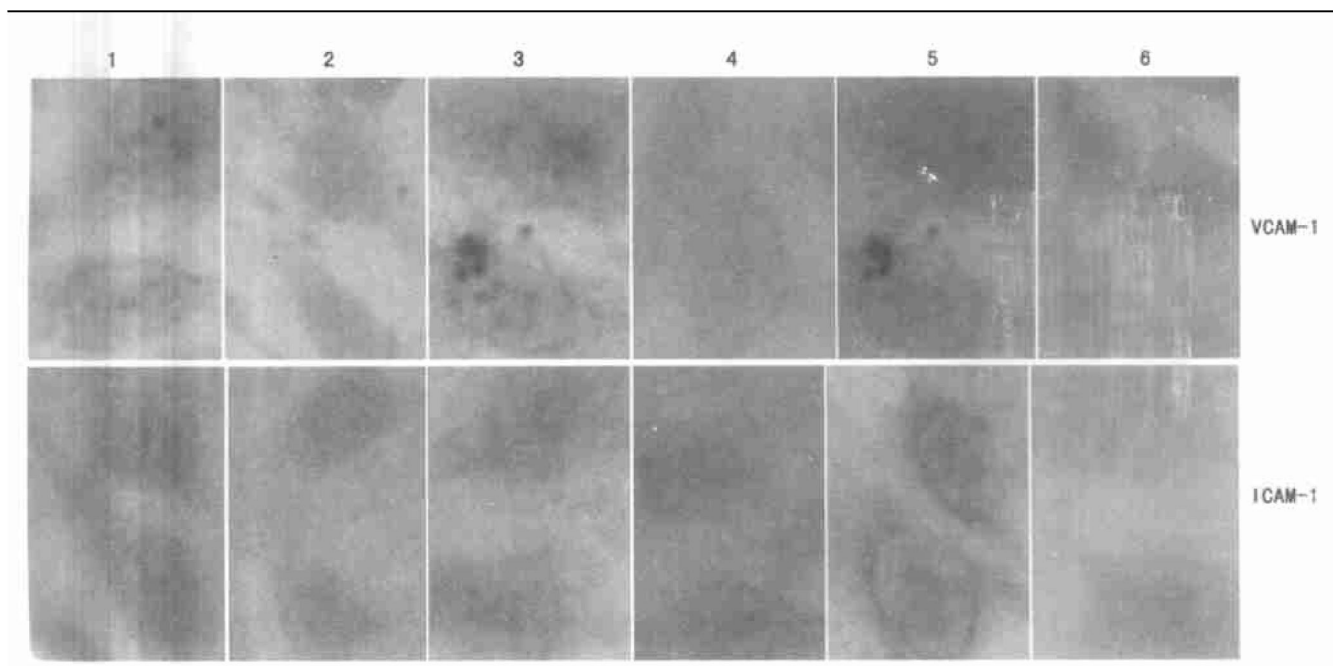


图 1. 血管细胞粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 免疫细胞化学分析结果 1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀组, 3 为 TNF- α 组, 4 为辛伐他汀 + TNF- α 组, 5 为 IL-1 β 组, 6 为辛伐他汀 + IL-1 β 组。

Figure 1. Expression of VCAM-1 and ICAM-1 by Immunocytochemistry

表 2. 各组血管细胞粘附分子 1 免疫细胞化学信号强度(例)

Table 2. Levels of VCAM-1 by immunocytochemistry variety in the six groups

分 组	强阳性	弱阳性	阴性	合计
空白对照组	0	1	5	6
辛伐他汀组	0	1	5	6
TNF- α 组	6	0	0	6
辛伐他汀 + TNF- α 组	1	5	0	6
IL-1 β 组	5	1	0	6
辛伐他汀 + IL-1 β 组	0	6	0	6
合计	12	14	10	36

表 3. 各组细胞间粘附分子 1 免疫细胞化学信号强度(例)

Table 3. Levels of ICAM-1 by immunocytochemistry variety in the six groups

分 组	强阳性	弱阳性	阴性	合计
空白对照组	0	0	6	6
辛伐他汀组	0	1	5	6
TNF- α 组	6	0	0	6
辛伐他汀 + TNF- α 组	1	5	0	6
IL-1 β 组	4	2	0	6
辛伐他汀 + IL-1 β 组	1	5	0	6
合计	12	13	11	36

2.3 血管细胞粘附分子 1 的 Western blot 蛋白印迹分析结果

空白对照组未见 VCAM-1 免疫复合物表达, TNF- α 组和 IL-1 β 组免疫复合物密度显著高于空白对照组, 辛伐他汀 + TNF- α 组、辛伐他汀 + IL-1 β 组亦未见明确 VCAM-1 免疫复合物表达。TNF- α 组、IL-1 β 组条带密度分别为辛伐他汀 + TNF- α 组和辛伐他汀 + IL-1 β 组的 2 倍以上(图 2, Figure 2)。

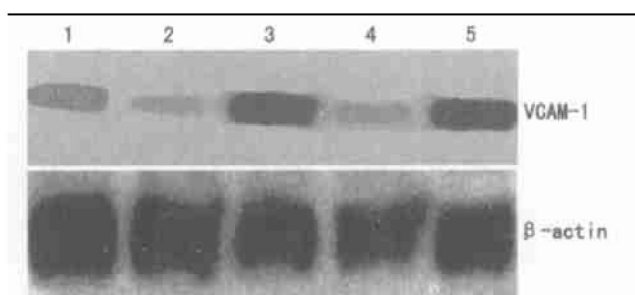


图 2. 血管细胞粘附分子 1 的 Western blot 蛋白印迹分析 1 为空白对照组, 2 为辛伐他汀 + TNF- α 组, 3 为 TNF- α 组, 4 为辛伐他汀 + IL-1 β 组, 5 为 IL-1 β 组。

Figure 2. Expression of VCAM-1 protein by Western blot

3 讨论

在动脉粥样硬化的早期, 白细胞、单核细胞和淋巴细胞等与血管内皮细胞的粘附、迁移是其最重要的始动环节, 在此基础上斑块稳定性下降^[4,5], 可出

现损伤破裂,造成血小板与内皮细胞及胞外基质粘附导致血栓形成,引发不稳定性心绞痛、心肌梗死等严重心血管事件。VCAM-1 和 ICAM-1 是两种重要的细胞粘附分子,目前关于二者与动脉粥样硬化发生发展关系的研究很多,但确切机制仍未明确。研究显示,在动脉粥样硬化早期病灶中已有 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达,而且该表达受病理生理状态、代谢产物、细胞因子等多种因素调控^[6,7]。

本研究结果发现正常生理状态下无 VCAM-1 和 ICAM-1 表达,TNF- α 和 IL-1 β 可一定程度促进二者在 hUVEC 中的表达。辛伐他汀+ TNF- α 组和辛伐他汀+ IL-1 β 组 VCAM-1 信号强度分别显著低于 TNF- α 组和 IL-1 β 组,而辛伐他汀组无明确 VCAM-1 信号,说明正常生理状态下辛伐他汀对二者表达无影响,但可抑制 TNF- α 和 IL-1 β 所造成的 VCAM-1 和 ICAM-1 表达增强。

作为常见的促炎症因子,TNF- α 和 IL-1 β 除直接导致血管内皮细胞损伤外,还可能通过促进粘附分子的表达促进白细胞、单核细胞和淋巴细胞等与血管内皮细胞的粘附、迁移,加速动脉粥样硬化的进程。本研究结果提示 TNF- α 和 IL-1 β 促进 hUVEC 中 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达,这也和绝大多数研究的结果是一致的^[8,9]。

目前关于他汀类药物调脂外作用的研究很多^[10,11],抗炎反应是其重要内容,本研究结果显示辛伐他汀可一定程度抑制 TNF- α 和 IL-1 β 所造成的 VCAM-1 和 ICAM-1 表达增强,如前所述,粘附分子可降低斑块稳定性,促进动脉粥样硬化之进程,故推测辛伐他汀可通过抑制 VCAM-1 和 ICAM-1 的表达达到稳定粥样斑块,延缓动脉粥样硬化进程的作用,这与部分报道的结果是一致的^[12-14]。此外,TNF- α 和 IL-1 β 是两种重要的促炎症因子,所以辛伐他汀对炎症因子引起的粘附分子表达增强的拮抗作用可能也是其抗炎反应的一种具体表现。研究结果还提示 TNF- α 和 IL-1 β 对培养的 hUVEC 有直接的损伤作用,而辛伐他汀对 TNF- α 和 IL-1 β 的这种损伤有一定的保护作用。

总之,本研究结果表明辛伐他汀可抑制 VCAM-1 和 ICAM-1 在 hUVEC 中的表达,可能具有一定的稳

定粥样斑块,延缓动脉粥样硬化进程的作用。TNF- α 和 IL-1 β 对粘附分子在 hUVEC 中表达的时间和剂量依赖性作用研究以及辛伐他汀对粘附分子在 hUVEC 中表达影响的 mRNA 水平研究尚需进一步完成,这对明确他汀类药物抑制粘附分子表达的确切机制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta*, 1999, **286** (1-2): 207-218
- [2] Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Mehta JL. Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **302** (2): 601-605
- [3] Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D. Further evidence for direct vascular actions of statins: effect on endothelial nitric oxide synthase and adhesion molecules. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, **109** (3): 181-183
- [4] de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 443-449
- [5] Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (2): 365-374
- [6] Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor- κ B activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** (10): 7 614-620
- [7] Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res*, 2001, **89** (6): 477-479
- [8] Chen W, Lee JY, Hsieh WC. Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Eur J Dermatol*, 2002, **12** (5): 445-448
- [9] Raab M, Daxecker H, Karimi A, Markovic S, Cichna M, Markl P, et al. In vitro effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta*, 2001, **310** (1): 89-98
- [10] 张敏, 陈桢月, 陆国平, 吴春芳. 辛伐他汀对内皮细胞株 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 234-237
- [11] 张园园, 张运, 张梅, 高月花, 李季昌, 方勇奇. 辛伐他汀+丙冰酚和卡托普利在动脉粥样硬化斑块消退中的作用及与金属蛋白酶 1 和组织抑制物 1 基因表达的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 401-404
- [12] Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: Involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol*, 2000, **165** (5): 2 712-718
- [13] Takeuchi S, Kawashima S, Rikitake Y, Ueyama T, Inoue N, Hirata K, et al. Cerivastatin suppresses lipopolysaccharide-induced ICAM-1 expression through inhibition of Rho GTPase in BAEC. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **269** (1): 97-102
- [14] Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM 3rd, Trocha SD, et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2001, **103** (21): 2 598-603

(此文编辑 文玉珊)