

辛伐他汀抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体的表达

郝文君¹, 白小涓¹, 杨向红²

(中国医科大学 1. 附属第一医院心内科, 2. 实验病理学研究室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 辛伐他汀抑制血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体的表达; 逆转录聚合酶链反应; 辛伐他汀; 氧化型低密度脂蛋白; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 观察辛伐他汀抑制氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体表达的作用。方法 培养人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 随机分组: 对照组、低密度脂蛋白 (25 mg/L) 组、氧化型低密度脂蛋白 (25、50 和 100 mg/L) 组和氧化型低密度脂蛋白 (50 mg/L) + 辛伐他汀 (1 和 10 μmol/L) 组, 通过逆转录聚合酶链反应和 Western blot 蛋白印迹分析检测血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白的表达, 并在相差显微镜下观察细胞形态变化。结果 氧化型低密度脂蛋白上调血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体表达 ($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性 ($P < 0.05$)。辛伐他汀明显抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体表达 ($P < 0.05$), 且高浓度组较低浓度组的抑制作用更强 ($P < 0.05$)。结论 氧化型低密度脂蛋白可能通过血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体导致内皮功能障碍, 辛伐他汀抑制氧化型低密度脂蛋白诱导血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体的表达是其非调脂抗动脉粥样硬化机制之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Simvastatin Inhibits Oxidized Low Density Lipoprotein-Mediated Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HAO Werr Jun, BAI Xiao Juan, and YANG Xiang-Hong

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Oxidized Low Density Lipoprotein; Lectin-Like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of simvastatin on the expression of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) mediated by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC, ECV304). **Methods** ECV304 Cells were divided into several groups in random: control, LDL (25 mg/L), ox-LDL (25, 50 and 100 mg/L) and ox-LDL (50 mg/L) + simvastatin (1 and 10 μmol/L). Then LOX-1 mRNA expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and LOX-1 protein expression was detected by Western blot.

Results Ox-LDL markedly induced the increase of cells LOX-1 mRNA and protein expression ($P < 0.01$), and the increase of LOX-1 was dependent on ox-LDL concentration ($P < 0.05$). Simvastatin reduced ox-LDL induced expression of LOX-1 ($P < 0.05$), and the high concentration of statins was more potent than the low concentration ($P < 0.05$). **Conclusions** These observations indicate ox-LDL results in endothelial dysfunction and atherosclerosis by LOX-1. The function of statins on reducing ox-LDL-mediated LOX-1 expression may be one of the mechanisms of anti-atherosclerosis, independent of cholesterol-lowering effect.

氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 导致内皮功能障碍在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病理过程中起着关键作用^[1], 但 ox-LDL 损伤的分子机制仍不明确。血凝素样氧

化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 是近年发现的新型 ox-LDL 特异性受体, 主要存在于内皮细胞表面。研究发现, 它与以往的清道夫受体无任何同源性, 是内皮细胞摄取和代谢 ox-LDL 的主要受体, 介导 ox-LDL 的生物学活性, 在 As 中发挥重要作用^[2-4]。

他汀类药物是目前公认的具有划时代意义的降脂药物, 广泛应用于临床。随着研究的深入, 他汀类药物的非降脂作用日益受到重视。本研究在培养的

[收稿日期] 2005-05-03 [修回日期] 2006-03-15

[作者简介] 郝文君, 博士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病发病机制的研究, E-mail 为 haowenj@hotmail.com。白小涓, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病研究。杨向红, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的发病机制研究。

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 基础上观察 ox-LDL 对 LOX-1 表达的影响及辛伐他汀的干预作用, 探讨 ox-LDL 损伤内皮细胞的机制以及他汀类药物非调脂抗 As 作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中国科学院细胞所; 低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 和 ox-LDL 购自中国医学科学院基础医学研究所; RPMI-1640 培养基、小牛血清、Trizol 购自美国 Gibco 公司; 鼠抗人 LOX-1 单克隆抗体由日本 Tatsuya Sawamura 教授馈赠; 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购于日本 Takara 公司; 辛伐他汀原粉由默沙东制药有限公司提供; 琼脂糖购自美国 Sigma 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯; FluorChen V2.0 图像分析系统。

1.2 细胞株的培养和鉴定

采用人脐静脉内皮细胞株 ECV304, 用 RPMI-1640 培养基 (含 10% 小牛血清、100 u/L 青霉素和 100 u/L 链霉素), 在 37℃、5% CO₂ 条件培养箱中培养, 0.25% 胰蛋白酶进行消化、传代。2% 台盼蓝染色判断细胞活性, 活细胞数占细胞总数 96% 以上。

1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备

用连续飘浮超速离心法从正常人外周血中分离 LDL, 0.45 μm 微孔滤膜除菌, Lowry's 法进行蛋白定量。将 LDL 置于含 10 μmol/L CuSO₄ 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中, 37℃温育 24 h, 使其氧化修饰成为 ox-LDL, 加入终浓度为 10 μmol/L 的 EDTA 终止氧化。然后置于含 200 μmol/L EDTA 的 PBS 液中透析 24 h, 4℃避光保存备用。用硫代巴比妥酸法鉴定 LDL 氧化程度, ox-LDL 的值为非修饰 LDL 的 4.8 倍, 说明 LDL 已被一定程度氧化。

1.4 实验分组及处理

取对数生长期细胞, 随机分为对照组 (不加任何干预因素)、LDL (25 mg/L) 组、ox-LDL (25、50 和 100 mg/L) 组, 培养 24 h 后观察细胞形态、收集细胞, 用于以下实验。另取对数生长期细胞, 随机分为对照组 (不加任何干预因素)、ox-LDL (50 mg/L) 组、ox-LDL (50 mg/L) + 辛伐他汀 (1 μmol/L) 组、ox-LDL (50 mg/L) + 辛伐他汀 (10 μmol/L)。辛伐他汀预作用 0.5 h 后, 加入 ox-LDL, 孵育 24 h, 观察各组细胞形态, 收集细胞用于 RT-PCR 和 Western blot 分析。每次实

验至少重复 3 次。辛伐他汀原粉的处理参照文献 [5]。

1.5 内皮细胞形态学观察

相差显微镜下观察各组细胞形态变化。

1.6 逆转录聚合酶链反应

用 Trizol 抽提各组细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 A₂₆₀、A₂₈₀ 吸光度, 计算纯度和含量, A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间。PCR 扩增 LOX-1 片段 (193 bp), 以 β-actin (472 bp) 作内参照。引物序列: LOX-1 上游 5'-TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC-3', 下游 5'-AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC-3'; β-actin 上游 5'-AAATCG TGC GT ACATTA A-3', 下游 5'-CTC GTC ATA CTC CTG CTT G-3' (以上序列由上海生物工程有限公司合成)。采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录扩增, 42℃逆转录 40 min, 94℃预变性 2 min, 循环条件为 94℃变性 30 s → 57.5℃退火 30 s → 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 计算机图像分析, 计算各组条带光密度值与相应 β-actin 光密度值的比值。

1.7 Western blot 分析蛋白表达

用 4℃预冷的细胞裂解液将内皮细胞裂解, 测定蛋白浓度。取 30 μL 总蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 电转移至硝酸纤维素膜上。转移后的硝酸纤维素膜经脱脂奶粉封闭 1 h, 洗涤后置于 1:1000 稀释的小鼠抗人 LOX-1 单克隆抗体中 4℃过夜, 经二抗孵育, 碱磷酶显色, 计算机扫描蛋白条带后进行吸光度分析。

1.8 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 作 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 内皮细胞形态变化

对照组和 LDL 组细胞呈单层铺路卵石样或星芒状排列, 胞核居中呈椭圆形, 核仁明显; ox-LDL 组细胞表面出现黑色颗粒, 胞内见空泡, 核膜模糊, 较多细胞变圆脱落, 未脱落细胞收缩变小, 多有细长突起相互牵连, 高浓度组变化明显; 辛伐他汀组细胞形态改变无 ox-LDL 组变化明显。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响

ox-LDL 组与对照组相比 LOX-1 mRNA 表达和蛋白水平均明显增加 ($P < 0.01$), 且 ox-LDL 这种作用

具有浓度依赖性($P < 0.05$)。LDL 组与对照组相比无明显差异($P > 0.05$)。见表 1 和图 1。

表 1. 氧化型低密度脂蛋白对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.40 ± 0.04	66 ± 4
LDL 组	0.47 ± 0.05	61 ± 3
ox-LDL		
25 mg/L	0.73 ± 0.04^a	95 ± 5^a
50 mg/L	0.83 ± 0.05^{ab}	111 ± 8^{ab}
100 mg/L	0.92 ± 0.04^{ab}	136 ± 10^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, ox-LDL 组间比较。

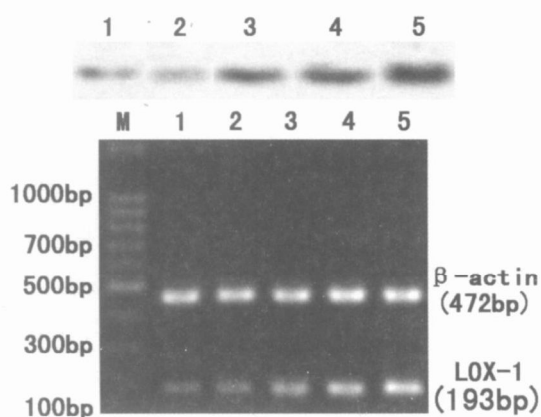


图 1. 氧化型低密度脂蛋白对血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响 上图为 Western blot 蛋白印迹分析, 下图为逆转录聚合酶链反应; M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为低密度脂蛋白组, 3 为 5 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组, 4 为 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组, 5 为 100 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组。

2.3 辛伐他汀对氧化型低密度脂蛋白诱导的血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响

辛伐他汀明显抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$), 而且高浓度组较低浓度组的抑制作用更强($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表 2. 辛伐他汀对氧化型低密度脂蛋白诱导血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.58 ± 0.08	57 ± 10
ox-LDL 组	1.14 ± 0.07	120 ± 7
ox-LDL + 1 μmol/L 辛伐他汀	0.91 ± 0.09^a	92 ± 10^a
ox-LDL + 10 μmol/L 辛伐他汀	0.70 ± 0.05^b	70 ± 4^b

a 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与低浓度辛伐他汀组比较。

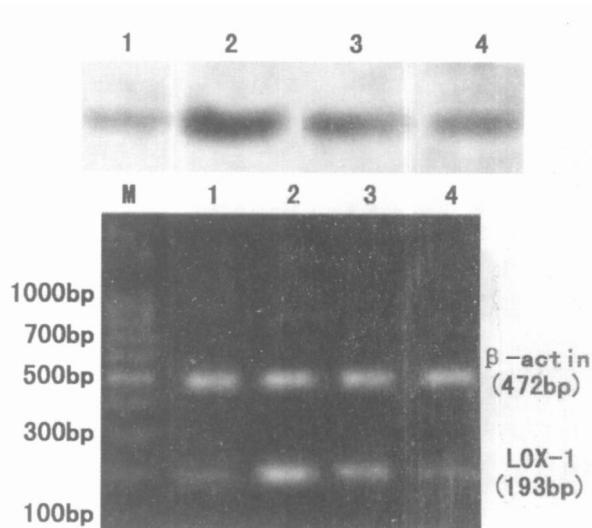


图 2. 辛伐他汀对氧化型低密度脂蛋白诱导血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 mRNA 和蛋白表达的影响 上图为 Western blot 蛋白印迹分析, 下图为逆转录聚合酶链反应; M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为低密度脂蛋白组, 3 为氧化型低密度脂蛋白组 + 1 μmol/L 辛伐他汀组, 4 为氧化型低密度脂蛋白 + 10 μmol/L 辛伐他汀组。

3 讨论

内皮功能障碍是 As 早期关键事件, 很多危险因素如高胆固醇血症、高血压、吸烟、糖尿病等都能导致内皮功能障碍。但内皮损伤的确切机制仍不清楚。越来越多的证据表明 ox-LDL 在内皮功能障碍中起着关键作用。本研究观察到 ox-LDL 引起内皮细胞形态结构的改变, 破坏内皮细胞的完整性, 甚至致内皮细胞脱落。提示 ox-LDL 对内皮细胞的毒性作用。内皮保护屏障破坏, 血中单核细胞和 LDL 等成分则易于进入皮下层, 促进动脉粥样硬化的发生。

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 不仅可直接损伤内皮, 而且还通过多个信号传导通路改变内皮分泌活性, 导致内皮功能失调。已有研究显示 ox-LDL 抑制内皮型一氧化氮合酶的合成和活性, 诱导粘附分子的表达, 促进单核细胞的粘附和血小板的聚集, 从而促进 As 的发展^[6]。但是, ox-LDL 引起内皮细胞损伤的确切机制尚待深入研究。

传统认为, ox-LDL 通过激活巨噬细胞和平滑肌细胞表面的清道夫受体发挥其生物学效应。Sawamura 等^[7]于 1997 年在牛主动脉内皮细胞上发现一种新型的 ox-LDL 特异受体, 即 LOX-1。LOX-1 属于 C 型血凝素家族, ①型膜蛋白结构, 和已知的 ox-LDL 的清道夫受体没有任何同源性, 主要存在于

内皮细胞表面。近来的研究显示, LOX-1 介导 ox-LDL 诱导的粘附分子表达、基质金属蛋白酶表达以及 CD40/CD40L 信号通路的激活等^[2,4]生物学活性, 而且, LOX-1 在 As 斑块内表达水平明显升高, 斑块内可检测到 LOX-1 的配体^[8]。这些研究结果均提示 LOX-1 在 As 发生、发展过程中起着重要的作用。对 LOX-1 及其配体的检测以及抗 LOX-1 治疗可能为心血管疾病的防治提供新思路。

本实验在培养的人脐静脉内皮细胞基础上, 从 mRNA 水平和蛋白水平观察到 ox-LDL 呈浓度依赖性诱导 LOX-1 表达, 提示 ox-LDL 可能通过上调受体 LOX-1 表达, 激活细胞内信号传导通路, 从而改变内皮细胞的分泌活性, 推动 As 发生和发展。本实验同时观察了 LDL 对 LOX-1 表达的影响, 结果发现 LDL 与对照组无明显差异。

他汀类药物即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 他汀类药物的发展是冠心病治疗史上的重要里程碑。大规模的临床试验结果表明, 这类药物可显著减少冠状动脉事件的发生, 并降低总死亡率^[9, 10]。他汀类药物的临床益处不完全依赖于其调脂作用^[5, 11], 其调脂外的作用更是近年心血管领域研究的热点。本实验结果表明, 辛伐他汀可明显抑制 ox-LDL 诱导的 LOX-1 表达, 并呈浓度依赖性, 这和目前他汀类药物在临床应用剂量加大趋势相一致。提示辛伐他汀可能通过抑制 LOX-1 的表达发挥抗 As 作用。

总之, 本研究通过体外实验证实他汀类药物可以减少 ox-LDL 特异受体 LOX-1 的表达, 揭示了他汀类药又一可能的非调脂抗动脉粥样硬化机制, 这对于进一步阐明他汀类药物的作用机理具有重要的意义。当然, ox-LDL 对内皮细胞损伤机制及 LOX-1 介

导内皮损伤的信号传导通路和他汀类药物调脂以外的作用机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Grafe M, AudrSchwelk W, Hertel H, Terbeek D, Steinheider G, Loebe M, et al. Human cardiac microvascular and macrovascular endothelial cells respond differently to oxidatively modified LDL[J]. *Atherosclerosis*, 1998, **137**: 87-95
- [2] Li DY, Chen HJ, 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]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, **302** (2): 601-605
- [3] Li DY, Liu L, Chen HJ, Sawamura T, Ranganathan S, Mehta JL. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells[J]. *Circulation*, 2003, **107** (4): 612-617
- [4] Li DY, Liu L, Chen HJ, Sawamura T, Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (5): 816-821
- [5] 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 234-237
- [6] Li D, Mehta JL. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction[J]. *Endothelium*, 2003, **10** (1): 17-21
- [7] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, et al. An endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein[J]. *Nature*, 1997, **386**: 73-77
- [8] Kakutani M, Ueda M, Naruko T, Masaki T, Sawamura T. Accumulation of LOX-1 ligand in plasma and atherosclerotic lesion of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: Identification by a novel enzyme immunoassay[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **282** (1): 180-185
- [9] Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS[J]. *JAMA*, 1998, **279** (20): 1615-1622
- [10] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) [J]. *Lancet*, 1994, **344** (8934): 1383-1389
- [11] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31** (3): 684-691

(此文编辑 文玉珊)