

[文章编号] 1007-3949 (2011) 19-02-0121-04

• 实验研究 •

氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞 MMP-1、TIMP-1 和 ICAM-1 表达的影响

高歌¹, 郑丽丽¹, 杨 静¹, 李志臻¹, 叶启霞², 华海婴²

(1. 郑州大学第一附属医院, 2. 河南省医药科学研究所, 河南省郑州市 450052)

[关键词] 氟伐他汀; 内脏脂肪素; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶 1; 组织型金属蛋白酶抑制剂 1; 细胞间黏附分子 1

[摘要] **目的** 观察氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的人脐静脉内皮细胞基质金属蛋白酶 1、组织型金属蛋白酶抑制剂 1、细胞间黏附分子 1 表达的影响, 探讨他汀类药物降脂外抗动脉粥样硬化的作用机制。 **方法** 体外培养人脐静脉内皮细胞, 以不同浓度氟伐他汀和内脏脂肪素共同孵育 24 h, 用逆转录聚合酶链反应法检测基质金属蛋白酶 1、组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和细胞间黏附分子 1 的表达。 **结果** 与正常对照组比较, 内脏脂肪素组基质金属蛋白酶 1 和细胞间黏附分子 1 的表达显著升高, 组织型金属蛋白酶抑制剂 1 的表达量下降。氟伐他汀干预后, 基质金属蛋白酶 1 和细胞间黏附分子 1 的表达较内脏脂肪素组显著降低, 组织型金属蛋白酶抑制剂 1 的表达增加。 **结论** 氟伐他汀可能通过抑制内脏脂肪素的活性, 影响血管内皮细胞基质金属蛋白酶 1、组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和细胞间黏附分子 1 的表达, 由此稳定血管内皮环境, 抑制内皮细胞炎症反应, 起到抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Fluvastatin on the Expression of Matrix Metalloproteinase-1, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase-1 and Intracellular Adhesion Molecule-1 Induced by Visfatin in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

GAO Ge¹, ZHENG Li-Li¹, YANG Jing¹, LI Zhi-Zhen¹, Ye Qi-Xia², and HUA Hai-Ying²

(1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; 2. Henan Institute of Medical Science, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[KEY WORDS] Fluvastatin; Visfatin; Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinase-1; Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase-1; Intracellular Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of fluvastatin on the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) induced by visfatin in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and to explore the effect and mechanism of anti-inflammatory of fluvastatin. **Methods** HUVEC were cultured in vitro, the HUVEC were pretreated with fluvastatin at different concentrations (10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L) for 20 minutes before incubated with the visfatin of 800 μ g/L for 24 hours. The cellular total RNA were extracted by TRNzol reagent. The expression of MMP-1, TIMP-1 and ICAM-1 mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results of gel electrophoresis were analyzed with a computer scanning system. **Results** Different concentrations of fluvastatin could inhibit the expression of MMP-1 mRNA and ICAM-1 mRNA induced by visfatin in a dose-dependent manner. Different concentrations of fluvastatin could up-regulate the expression of TIMP-1 mRNA induced by visfatin. **Conclusion** Fluvastatin could inhibit inflammatory response in vascular endothelial cells induced by visfatin in a dose-dependent manner, which could protect endothelial cells against the functional disorder, and prevent the development of atherosclerosis.

[收稿日期] 2010-11-12

[作者简介] 高歌, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治, E-mail 为 gaoge@yahoo.cn。通讯作者郑丽丽, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治, E-mail 为 zhengli1012@126.com。杨静, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病血管并发症的防治, E-mail 为 187348371@qq.com。

研究证实,他汀类药物具有独立于降脂作用的心血管保护作用。此作用可能与低密度脂蛋白胆固醇的降低无直接联系,被称为他汀类药物的“多效性作用”^[1]。这些降脂外作用包括改善内皮功能、抑制炎症反应、抗氧化、影响凝血机制等。其中他汀类药物的抗炎作用越来越受到重视。脂肪细胞能分泌多种脂肪因子,这些脂肪细胞因子通过介导血管内皮的炎症状态导致动脉粥样硬化(As)的发生与发展^[2]。内脏脂肪素(visfatin)是新近发现的一种脂肪因子,其参与机体的多种炎症反应,与肥胖、胰岛素抵抗、As以及全身炎症状态等多种疾病的发生有关。他汀类药物的多效性作用是否与抑制内脏脂肪素所介导的炎症反应有关,目前尚未见此报道。为此,我们进行了如下研究。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自美国 ATCC 公司;内脏脂肪素购自美国 PEPROTECH 公司;氟伐他汀(fluvastatin)原粉由瑞士诺华公司惠赠;DMEM(高糖含双抗)培养基购自美国 GBICO 公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物科技公司;胰蛋白酶(trypsin)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)和琼脂糖购自 Sigma 公司;TRNzol 试剂、Quant cDNA 第一链合成试剂盒和 RealMasterMix (SYBR Green)购自北京天根生物公司;PCR 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

HUVEC 采用含 10%~15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,在 5% CO₂ 饱和湿度、37℃ 培养箱内培养,每两天换液一次。

1.3 实验分组及干预

取生长状态佳、对数生长期的 3 代 HUVEC 用于药物干预实验。将内皮细胞消化后以 10⁸/L 的浓度接种于 6 孔培养板。贴壁培养至密度为 80% 时换无血清培养基培养 24 h 后根据以下分组进行药物干预。实验共分 6 组,每组设平行测量 6 份:①正常对照组:细胞中不加其他干预试剂;②内脏脂肪素组:细胞中加入浓度为 800 μg/L 的内脏脂肪素溶液。③溶媒对照组:细胞中加入浓度为 800 μg/L 的内脏脂肪素溶液及终浓度为 0.07% 的 DMSO 液。④低、中、高剂量氟伐他汀组:分别给予 10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L 和 10⁻⁵ mol/L 的氟伐他汀干预 20 min,然后加入浓度为 800 μg/L 的内脏脂肪素溶液共同

孵育 24 h 后进行后续实验。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测基质金属蛋白酶 1、组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和细胞间黏附分子 1 的表达

Trizol 法提取总 RNA。MMP-1 引物为上游 5'-TTTCCTCAGA AAGAGCA GCATCG-3',下游 5'-AT-GCGAACAATCCCTTCTACC-3';TIMP-1 引物为上游 5'-GGCATCCCTGTTGTGCTGTGG-3',下游 5'-GACGGGA CTGAAGCCCTTTT-3';ICAM-1 引物为上游 5'-TAGCCAACCAATGTG CTATT-3',下游 5'-CAGCGTAGGGTAAGGTTCTTG-3';β₂-actin 为内参,引物为上游 5'-CGTGGACATCCGCAAAGAC-3',下游 5'-AAGAAAGGG TGTAACGCAACT-3'。反应条件:MMP-1 (247 bp) 为 94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,循环 35 次,72℃ 延伸 8 min;TIMP-1 (529 bp) 为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 40 s,54℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 60 s,循环 25 次,72℃ 延伸 8 min;ICAM-1 (145 bp) 为 94℃ 预变性 5 s,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,循环 35 次,72℃ 延伸 5 min;β₂-actin (307 bp) 为 94℃ 预变性 5 s,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,循环 35 次,72℃ 延伸 5 min。取 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。用凝胶电泳图象分析仪进行数据分析,以目的基因光密度值与内参照 β₂-actin 光密度值的比值表示目的基因的相对表达水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据均进行正态分布检验及方差齐性检验,组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的培养和鉴定

倒置相差显微镜下,可见培养 3~5 天后的 HUVEC 开始融合成排列紧密的单层细胞。细胞呈鹅卵石样镶嵌排列,无重叠生长现象,细胞胞浆丰满,为梭形或多角形,可见 1~2 个清晰的细胞核(图 1, Figure 1)。取生长状态佳、对数生长期的 3 代内皮细胞用于药物干预实验。

2.2 氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞基质金属蛋白酶 1、组织型金属蛋白酶抑制剂 1 和细胞间黏附分子 1 的 mRNA 表达的影响

与正常对照组比较,内脏脂肪素能明显增加

MMP-1 mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 预先用氟伐他汀干预后, 明显抑制内脏脂肪素诱导的 MMP-1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 并随着氟伐他汀浓度增加这种抑制作用增强, 呈剂量依赖性 (图 2 和表 1, Figure 2 and Table 1)。



图 1. 倒置显微镜下观察人脐静脉内皮细胞
Figure 1. The human umbilical vein endothelial cells were observed under inverted microscope

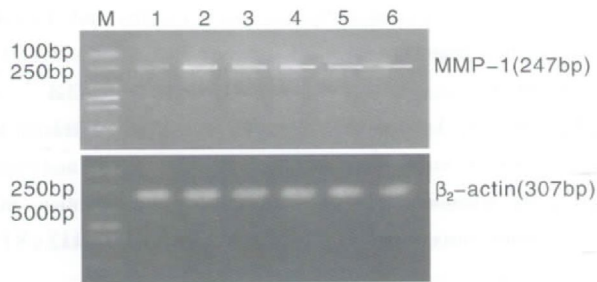


图 2. 氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞 MMP-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为正常对照组, 2 为内脏脂肪素组, 3 为溶媒对照组, 4~6 分别为低、中、高剂量氟伐他汀组。
Figure 2. Effects of fluvastatin on the mRNA expression of MMP-1 in HUVEC induced by visfatin

与正常对照组比较, 内脏脂肪素能抑制 TIMP-1 mRNA 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 用氟伐他汀干预后, 明显增加 TIMP-1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 并随着氟伐他汀浓度的增加 TIMP-1 mRNA 的表达增加, 呈剂量依赖性 (图 3 和表 1, Figure 3 and Table 1)。

与正常对照组比较, 内脏脂肪素能明显增加 ICAM-1 mRNA 的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 用氟伐他汀干预后, 明显抑制内脏脂肪素诱导的 ICAM-1 mRNA 表达的增加 ($P < 0.05$), 且随着氟伐他汀浓度的增加这种抑制作用增强, 呈剂量依赖性 (图 4 和表 1, Figure 4 and Table 1)。

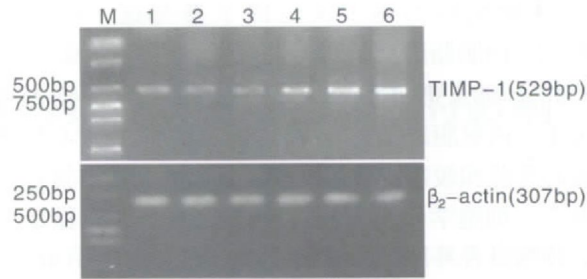


图 3. 氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞 TIMP-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为正常对照组, 2 为内脏脂肪素组, 3 为溶媒对照组, 4~6 分别为低、中、高剂量氟伐他汀组。

Figure 3. Effects of fluvastatin on the mRNA expression of TIMP-1 in HUVEC induced by visfatin

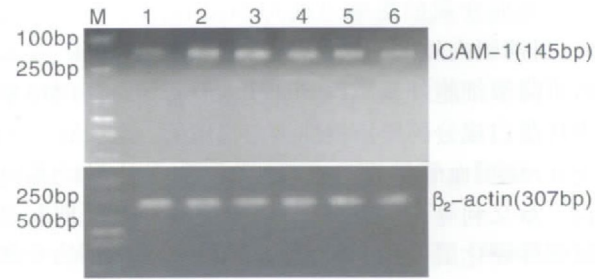


图 4. 氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响 M 为 Marker, 1 为正常对照组, 2 为内脏脂肪素组, 3 为溶媒对照组, 4~6 分别为低、中、高剂量氟伐他汀组。

Figure 4. Effects of fluvastatin on the mRNA expression of ICAM-1 in HUVEC induced by visfatin

表 1. 氟伐他汀对内脏脂肪素诱导的内皮细胞 MMP-1、TIMP-1 和 ICAM-1 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1. Effects of fluvastatin on the mRNA expression of MMP-1, TIMP-1 and ICAM-1 in HUVEC induced by visfatin

分 组	MMP-1	TIMP-1	ICAM-1
正常对照组	0.149 ± 0.037	0.191 ± 0.006	0.192 ± 0.045
内脏脂肪素组	0.479 ± 0.062 ^b	0.126 ± 0.035 ^a	0.603 ± 0.024 ^b
溶媒对照组	0.481 ± 0.107 ^b	0.130 ± 0.078 ^a	0.610 ± 0.017 ^b
低剂量氟伐他汀组	0.360 ± 0.021 ^c	0.262 ± 0.031 ^c	0.435 ± 0.098 ^c
中剂量氟伐他汀组	0.306 ± 0.033 ^{ce}	0.318 ± 0.024 ^{de}	0.318 ± 0.067 ^{ce}
高剂量氟伐他汀组	0.247 ± 0.083 ^{dfg}	0.410 ± 0.104 ^{dfg}	0.273 ± 0.025 ^{deg}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与内脏脂肪素组比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与低剂量氟伐他汀组比较; g 为 $P < 0.05$, 与中剂量氟伐他汀组比较。

3 讨 论

慢性炎症学说认为, As 是机体的一种炎症状

态,多种炎症细胞及炎症因子参与这一病理过程^[3]。内脏脂肪素是新近发现的一种脂肪因子,与肥胖、胰岛素抵抗、As等多种疾病的发展有着密切关系。内脏脂肪素在As斑块表达增加,在冠心病患者心外膜和腹部脂肪组织其表达显著高于非冠心病者^[4]。细胞学研究发现内脏脂肪素促进不稳定型心绞痛患者外周单核细胞表达白细胞介素8(IL-8)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的作用显著强于正常人的外周单核细胞^[5]。多项研究提示内脏脂肪素可能作为炎症因子介导As病变的发生与发展。

他汀类药物能够抑制多种炎症因子的表达,降低多种血清炎症标志物,对炎症反应过程的各阶段都有抑制作用。他汀类药物能否通过对内脏脂肪素这一炎症介质的影响进而抑制血管内皮的炎症反应,目前国内外关于这方面的报道较少。MMP是一组可降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中多种蛋白成分的锌依赖性蛋白水解酶,参与As时的炎症反应、血管壁重构、斑块破裂和血栓形成等过程。章义利等^[6]研究发现,阿托伐他汀可以抑制动脉粥样硬化鼠MMP的表达。TIMP是MMP的天然组织抑制因子,随着MMP活性增高而同步增加,当这一平衡被破坏,就会导致正常组织生理过程的紊乱。季彦等^[7]研究认为,辛伐他汀可促进TIMP的表达;曹雅等^[8]认为,辛伐他汀对TIMP-1和TIMP-2的表达表现为剂量依赖性的抑制作用。本实验发现,氟伐他汀可明显抑制内脏脂肪素介导的内皮细胞MMP-1 mRNA的表达,增加其介导的TIMP-1 mRNA表达。随着氟伐他汀浓度的增加,这种作用随之增强;由此提示氟伐他汀可能通过抑制内脏脂肪素的表达,减少内皮细胞MMP-1的产生,增加TIMP-1的表达,维持正常ECM降解与合成的动态平衡环境,抑制血管内皮炎症反应。

ICAM-1介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触和结合。Bernot等^[9]研究发现,阿托伐他汀上调TNF- α 诱导的HUVEC表面ICAM-1的表达。本实验中,我们观察到内脏脂肪素使内皮细胞ICAM-1 mRNA表达增加,用氟伐他汀预处理过的内皮细胞ICAM-1 mRNA表达显著下降,呈剂量依赖性。提示氟伐他汀通过抑制内脏脂肪素诱导的ICAM-1 mRNA表达,起到稳定血管内皮、抑制炎症

反应的作用。

综上所述,氟伐他汀对内脏脂肪素介导的内皮细胞炎症反应起到一定的抑制作用,提示抑制内脏脂肪素的表达可能是氟伐他汀抗As的机制之一。此外,其他他汀类药物是否也有类似的作用以及他汀类药物对动脉壁的钙化有无类似的抑制作用等问题还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Ariyaratnam V, Dawe DE, Khadem A. Is there a role for statins in atrial fibrillation [J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2009, 32(8): 1 063-072.
- [2] Chudek J, Wiecek A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction [J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(suppl): 81-88.
- [3] Jianglin Fan, Teruo Watanabe, 王燕翻, 等. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(7): 706-708.
- [4] Adya R, Tan BK, Punna A, et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 356-365.
- [5] Dahl TB, Yndestad A, Skjell M. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 972-980.
- [6] 章义利, 戴凌燕, 周秀云, 等. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶C的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(1): 29-32.
- [7] 季彦, 戚文航, 高平进, 等. 辛伐他汀对兔粥样硬化动脉基质金属蛋白酶组织抑制物-1表达的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30: 500-503.
- [8] 曹雅, 张志毅, 傅世英. 辛伐他汀对巨噬细胞基质金属蛋白酶-2、9及其组织抑制物-1、2基因表达调节的研究 [J]. *中国急救医学*, 2002, 22: 92-94.
- [9] Bernot D, Benoliel AM, Peiretti F, et al. Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003, 41(2): 316-324.

(此文编辑 许雪梅)