

氧化型低密度脂蛋白及阿托伐他汀对培养的人脐静脉内皮细胞血管紧张素转化酶 2 表达的影响

周 鹏¹, 李志樑¹, 徐春生², 严全能¹, 陈文忠¹, 范智文¹

(南方医科大学附属珠江医院 1. 心内科, 2. 急诊科, 广东省广州市 510280)

[关键词] 内科学; 血管紧张素转化酶 2; 氧化型低密度脂蛋白; 阿托伐他汀; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 探讨氧化型低密度脂蛋白对人血管内皮细胞血管紧张素转化酶 2 表达的影响及阿托伐他汀的干预作用。方法 用正常人新鲜血浆制备氧化型低密度脂蛋白, 人脐静脉内皮细胞株复苏、传代后取生长良好 3~6 代用于实验。分为空白对照组、不同浓度氧化型低密度脂蛋白组(终浓度分别为 20、40 及 80 mg/L)、不同浓度阿托伐他汀组(1.5 和 10 μmol/L)、不同时间组(40 mg/L 氧化型低密度脂蛋白和 5 μmol/L 阿托伐他汀分别刺激 6、12 和 24 h)及混合刺激组(5 μmol/L 阿托伐他汀+ 40 mg/L 氧化型低密度脂蛋白刺激 24 h)。提取细胞总 RNA 及蛋白, 逆转录聚合酶链反应检测血管紧张素转化酶 2 mRNA 的表达, 免疫印迹法检测血管紧张素转化酶 2 蛋白的表达。结果 氧化型低密度脂蛋白呈剂量和时间依赖性下调血管紧张素转化酶 2 mRNA 及蛋白的表达。与空白对照组比较, 不同浓度氧化型低密度脂蛋白组血管紧张素转化酶 2 mRNA 的表达分别降低为 73%、51% 和 33%, 蛋白的表达降低为 81%、50% 及 32%, 不同浓度组间比较差异亦有显著性($P < 0.01$); 氧化型低密度脂蛋白培养 6、12 和 24 h 时间组血管紧张素转化酶 2 mRNA 与对照组比较分别减少为 66%、55% 和 50%, 蛋白的表达与对照组比较降低为 63%、53% 及 49% ($P < 0.01$)。不同浓度阿托伐他汀及其培养不同时间组血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白的表达与对照组比较差异无统计学意义。阿托伐他汀能抑制氧化型低密度脂蛋白对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的下调, mRNA 表达增加为 1.63 倍, 蛋白表达增加为 1.60 倍 ($P < 0.01$)。结论 氧化型低密度脂蛋白呈剂量和时间依赖性下调血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白的表达, 阿托伐他汀能抑制这种作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and Atorvastatin on Angiotensin-Converting Enzyme-2 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZHOU Peng¹, LI Zhi-Liang¹, XU Chun-Sheng², YAN Quan-Neng¹, CHEN Wen-Zhong¹, and FAN Zhi-Wen¹

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Emergency, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[KEY WORDS] Angiotensin-Converting Enzyme-2; Oxidized Low Density Lipoprotein; Atorvastatin; Human Umbilical Vein Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and atorvastatin on gene and protein expression of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** HUVEC cultured with equal serum-free medium were used as control. Different concentration groups of ox-LDL and atorvastatin: HUVEC were treated with ox-LDL (20, 40 and 80 mg/L) and atorvastatin (1, 5 and 10 μmol/L) for 24 h, respectively.

In a time control experiment, HUVEC were treated with ox-LDL at final concentration of 40 mg/L and atorvastatin of 5 μmol/L for 6, 12 and 24 h, respectively. HUVEC were preincubated with atorvastatin (5 μmol/L) for 1 h and then cocultured with ox-LDL (40 mg/L) for 24 h. Changes in both gene and protein expression of ACE-2 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis technique, respectively. **Results** Ox-LDL induced a concentration and time dependent decrease in gene and protein expression of ACE-2. When compared with that of control group, ACE-2 mRNA expression decreased to 73%, 51%, 33% and protein expression decreased to 81%, 50% and 32%, respectively, after treated with different concentrations of ox-LDL ($P < 0.01$). When treated with ox-LDL for 6, 12 and 24 h at concentration of 40 mg/L ox-LDL, ACE-2 mRNA expression in HUVEC decreased to 66%, 55% and 50% when compared with that of control group ($P < 0.01$), and protein expression decreased to 63%, 53% and 49% ($P < 0.01$), respectively. Gene expression and protein expression of ACE-2 in groups treated with atorvastatin alone showed no significant difference when compared with that of control groups ($P > 0.05$). Pretreatment of HUVEC with simvastatin (5 μmol/L) for 1 h could obviously inhibited 40 mg/L ox-

[收稿日期] 2007-08-27 [修回日期] 2007-12-01

[基金项目] 广东省自然科学基金(06301193)

[作者简介] 周鹏, 硕士, E-mail 为 ZHOUPENG707707@sohu.com。通讯作者李志樑, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的免疫机制, E-mail 为 Liz06@163.com。徐春生, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病性心脏病。

LDL-induced gene and protein down-regulated expression of ACE-2 in HUVEC, which differed significantly from group without atorvastatin pretreated ($P < 0.01$). **Conclusions** Ox-LDL can down-regulate gene expression and protein expression of ACE-2 in HUVEC in both concentration and time dependent manners, while atorvastatin may play a role in inhibiting the down-regulation effects of ox-LDL to ACE-2 gene and protein expression.

肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)与脂代谢紊乱在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成中相互影响,阻断RAS可通过抗高血压、抗炎、抗增殖和氧化应激等产生强大的抗As作用^[1]。血管紧张素转化酶2(angiotensin converting enzyme, ACE-2)水解血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)生成血管紧张素(1-7),发挥与ACE相抗衡的作用。本研究采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及免疫印迹法观察氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及阿托伐他汀对培养的人脐静脉内皮细胞(human vascular endothelial cells, HUVEC)ACE-2表达的影响,并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

HUVEC细胞株购自Cascade Biologics公司,山羊抗人ACE-2多克隆抗体购自美国Sanata Cruz公司,鼠抗山羊多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术公司,内皮细胞生长添加物(endothelial cell growth supplement, ECGS)购自美国Sigma公司, M199培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青公司,阿托伐他汀由辉瑞制药有限公司提供。RT-PCR试剂盒购于Tiangen生化科技有限公司。CO₂培养箱为美国Thermo Forma公司产品,PCR仪和电泳仪为德国Biometra公司产品。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

正常人新鲜血浆经密度梯度超速离心(10℃、50 kr/min离心5 h)分离低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),吸取LDL后置于生理盐水中透析24 h(4℃,每6 h换液1次),LDL置于含50 μmol/L CuSO₄缓冲液中,37℃温育24 h,加EDTA终止氧化反应,4℃透析6 h×6次,以充分除去Cu²⁺和EDTA。制备的ox-LDL经4 g/L琼脂糖凝胶电泳,苏丹黑染色后观察迁移率以验证氧化程度,Bradford法进行蛋白定量。

1.3 阿托伐他汀溶液的配制

阿托伐他汀原料药60.47 mg,溶于1 mL 55℃无水乙醇中,加入0.1 mol/L NaOH 1.5 mL,静置15 min,以HCl调pH7.2,加PBS至总体积5 mL,过滤后

分装, -70℃冻存,贮存浓度为10 mmol/L。

1.4 人脐静脉内皮细胞株的复苏和传代

冻存细胞株复苏后接种于M199培养基(pH 7.4,含10% FBS、50 ng/L ECGS、5 ku/L肝素、100 ku/L青霉素和100 mg/L链霉素),置37℃、5% CO₂培养箱中培养,隔天换液一次,2~3天后铺满培养瓶。0.25%胰蛋白酶进行消化、传代,取3~6代增殖细胞制成细胞悬液。按2.0×10⁶个细胞/孔的细胞密度接种于6孔板,加含10% FBS的M199培养基置于37℃、5% CO₂孵箱中进行培养,待HUVEC生长呈亚汇合融合状态时,换以无血清培养基培养24 h,分别加入不同浓度ox-LDL及阿托伐他汀刺激。

1.5 实验分组

空白对照组为无血清培养基培养;不同浓度ox-LDL组为终浓度20、40和80 mg/L ox-LDL与HUVEC孵育24 h;不同浓度阿托伐他汀组为终浓度1、5和10 μmol/L阿托伐他汀与HUVEC孵育24 h;混合刺激组为5 μmol/L阿托伐他汀与HUVEC孵育1 h后加入40 mg/L ox-LDL孵育24 h;不同时间组为40 mg/L ox-LDL或5 μmol/L阿托伐他汀与HUVEC孵育6、12及24 h。各组均设6个复孔。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测血管紧张素转化酶2 mRNA的表达

提取总RNA, -70℃保存备用。所得RNA吸光度值A₂₆₀/A₂₈₀在1.8~2.0,纯度适合作RT-PCR模板。将RNA逆转录生成的cDNA作为模板进行扩增。ACE-2上游引物5'-CAT TGG AGC AAG TGT TGG ATC TC-3',下游引物5'-GAG CTA ATG CAT GCC ATT CTC A-3',目的产物扩增片段为108 bp,内参GAPDH上游引物5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',下游引物5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3',目的产物扩增片段为258 bp。PCR反应条件均为95℃预变性2 min,94℃变性30 s→55.5℃退火30 s→72℃延伸45 s,循环34次,最后延伸7 min。取12 μL扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶图像分析仪扫描分析各条带,测定其吸光度值,并与恒量表达的GAPDH相对比值作为半定量指标。

1.7 免疫印迹法检测血管紧张素转化酶2蛋白的表达

RIPA(使用前加入单去污裂解液)裂解组织总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度,分装后-70℃保存。

制备 8% 分离胶和 5% 浓缩胶, 取 50 μg 蛋白质煮沸持续 5 min 使蛋白质变性, 上样后分离胶 60 V, 浓缩胶 100 V 电泳, 总时间 3 h 左右, 转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 然后加入按 1: 250 稀释的一抗(山羊抗人 ACE-2 多抗), 4 $^{\circ}\text{C}$ 培育过夜, 用 0.1% 吐温 20 的 Tris 缓冲液洗 3 次, 加入按 1: 500 稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记鼠抗羊 IgG), 室温培育 1 h, 底物发光法进行显色发光。胶片扫描后分析光密度值, 各实验组之间进行半定量分析和比较。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用配对 t 检验, 多组均数间比较进行方差齐性检验和单因素方差分析。采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定及细胞活力

在倒置显微镜下, HUVEC 为单层生长, 呈梭形鱼贯状排列或呈多角形镶嵌排列。(1)因子单抗间接免疫荧光染色阳性率为 100%, 证明所培养的细胞为 HUVEC。且 HUVEC 存活率在 96% 以上。

2.2 不同浓度氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的影响

基础状态下, 培养的 HUVEC 即有 ACE-2 mRNA 和蛋白的表达。经 ox-LDL 刺激后, ACE-2 mRNA 和蛋白的表达减少, 呈剂量依赖性。对照组与各浓度阿托伐他汀组 ACE-2 mRNA 和蛋白的表达差异没有显著性。混合刺激组与 40 mg/L ox-LDL 组比较 ACE-2 mRNA 的表达增加为 1.63 倍, 蛋白表达增加为 1.60 倍($P < 0.01$; 表 1 和图 1)。

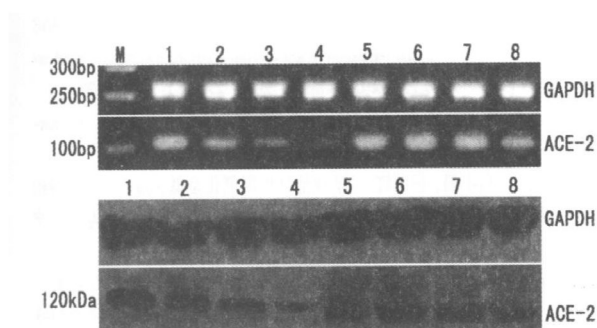


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的影响 M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为 20 mg/L ox-LDL 组, 3 为 40 mg/L ox-LDL 组, 4 为 80 mg/L ox-LDL 组, 5 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀, 6 为 5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀, 7 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 8 为混合刺激组。

表 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 6$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.697 \pm 0.087	0.646 \pm 0.096
ox-LDL 组		
20 mg/L	0.506 \pm 0.079 ^{ab}	0.525 \pm 0.085 ^{ab}
40 mg/L	0.355 \pm 0.057 ^{ab}	0.324 \pm 0.046 ^{ab}
80 mg/L	0.232 \pm 0.045 ^{ab}	0.209 \pm 0.055 ^{ab}
阿托伐他汀组		
1 $\mu\text{mol/L}$	0.737 \pm 0.071	0.659 \pm 0.081
5 $\mu\text{mol/L}$	0.784 \pm 0.087	0.710 \pm 0.059
10 $\mu\text{mol/L}$	0.779 \pm 0.079	0.706 \pm 0.083
混合刺激组	0.578 \pm 0.082 ^c	0.518 \pm 0.080 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 不同浓度组间比较; c 为 $P < 0.01$, 与 40 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组比较。

2.3 氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀作用不同时间对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达影响

经 ox-LDL 刺激后, ACE-2 mRNA 和蛋白的表达减少, 呈时间依赖性。不同时间点阿托伐他汀组 ACE-2 mRNA 和蛋白的表达差异没有显著性(表 2 和图 2)。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀作用不同时间对血管紧张素转化酶 2 mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 6$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.697 \pm 0.079	0.646 \pm 0.096
ox-LDL 组		
6 h	0.461 \pm 0.050 ^a	0.407 \pm 0.061 ^a
12 h	0.382 \pm 0.060 ^a	0.342 \pm 0.072 ^a
24 h	0.345 \pm 0.062 ^a	0.316 \pm 0.059 ^a
阿托伐他汀组		
6 h	0.703 \pm 0.072	0.631 \pm 0.070
12 h	0.724 \pm 0.081	0.681 \pm 0.097
24 h	0.765 \pm 0.068	0.684 \pm 0.081

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

血管紧张素转化酶 2(ACE-2) 在血管内皮细胞高表达, 目前被看成是一种血管舒张物质和心血管系统保护因子, 参与高血压、As、心力衰竭、糖尿病以及肾脏、生殖、呼吸等系统疾病的发生、发展过程^[2]。Zulli 等^[3]通过免疫组织化学方法证实, 在 As 病变内巨噬细胞、平滑肌细胞及新生内膜内皮细胞中均可

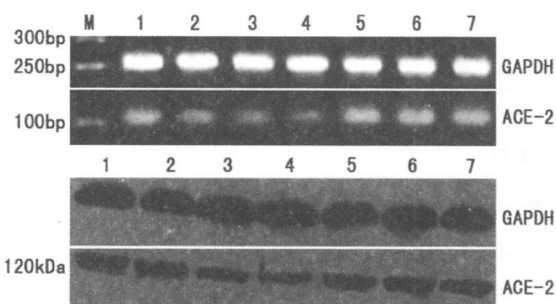


图2. 氧化型低密度脂蛋白和阿托伐他汀作用不同时间对血管紧张素转化酶2 mRNA 和蛋白表达的影响 M 为Marker, 1 为对照组, 2 为 α -LDL 刺激6 h, 3 为 α -LDL 刺激12 h, 4 为 α -LDL 刺激24 h, 5 为阿托伐他汀刺激6 h, 6 为阿托伐他汀刺激12 h, 7 为阿托伐他汀刺激24 h。

检测 Ang ② 型受体及 ACE-2 蛋白表达, 并认为 Ang ② 型受体及 ACE-2 参与 As 发生发展并具有抗 As 作用。

氧化型低密度脂蛋白(α -LDL)与 RAS 存在密切联系, 共同促进 As 发生和发展。已有研究发现 α -LDL 可上调 ACE 基因及 Ang ① 型受体基因表达, 增强 Ang ① 生物学效应^[4,5]。本研究发现, α -LDL 呈浓度及时间依赖性使 ACE-2 表达下调, 其作用不仅直接减少对底物 Ang iv 及 Ang ① 降解促进 As 等形成, 更使具有扩血管作用的 Ang(1-7) 生成减少, 导致血管收缩, 通过升高血压这一机械因素促进 As 的发生。近年的研究表明, Ang ① 无论在体内还是在体外都可促进 LDL 的氧化并诱导内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞表达 LOX-1, 增加 α -LDL 的摄取^[6,7], 同时, Ang ① 可下调 ACE-2 的表达^[8]。我们则认为 α -LDL、ACE-2、Ang ① 三者间彼此影响, 加重脂质沉积。

他汀类药物的临床益处不完全依赖于其调脂作用, Goode 等^[9] 对临床降脂治疗的研究资料进行回顾性分析发现高血脂患者血浆胆固醇水平的下降多伴有血压下降, 引起血压下降的药物大多为他汀类药物。郝文君等^[10] 发现他汀类药物可以减少 α -LDL 特异受体 LOX-1 表达发挥抗 As 作用。同时他汀类药物还通过下调 Ang ① 型受体 mRNA 表达及受体密度, 削弱 Ang ① 的生物学效应^[11]。本研究结果表明, 用阿托伐他汀预处理 HUVEC 后, 阿托伐他汀能显著抑制 α -LDL 对 ACE-2 mRNA 及蛋白表达的下调效应, 从而使 ACE-2 水解 Ang iv 和 Ang ① 增

加, 使具有缩血管效应的血管紧张素肽类含量减少及提高机体中舒血管物质 Ang(1-7) 发挥临床益处。阿托伐他汀单独刺激对 HUVEC ACE-2 表达无影响, 考虑与阿托伐他汀本身无活性, 口服吸收后的水解产物在体内竞争性地抑制胆固醇合成过程中的限速酶羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶而发挥作用有关, 其机制尚需进一步探讨。

本研究发现阿托伐他汀通过抑制 α -LDL 下调 ACE-2 表达而发挥心血管系统保护作用, 这种作用独立于其调脂效应, 为他汀类药物降低临床心血管病事件提供了又一可能的基础机制。目前关于 ACE-2 的研究尚处于起步阶段, 进一步探讨其分子机制、生理功能以及如何有效地调控它的表达, 有助于我们更全面系统地了解 RAS, 在心血管疾病的临床防治中具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk [J]. *Lancet*, 2007, **369** (9568): 1 208-219.
- [2] Thomas MC, Tikellis C. ACE-2: an ACE up the Sleeve [J]? *Current Enzyme Inhibition*, 2005, **1** (1): 51-63.
- [3] Zulli A, Louise M, Burrell, Robert E, Widdop, Black MJ, et al. Immunoregulation of ACE-2 and AT2 receptors in rabbit atherosclerotic plaques [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, **54** (2): 147-150.
- [4] Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin ① type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF- κ B [J]. *Circulation*, 2000, **102** (16): 1 970-976.
- [5] Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, Mehta JL, et al. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **57** (1): 238-243.
- [6] 张磊, 朱建华, 黄元伟, 姚航平. 血管紧张素 ① 对巨噬细胞(THP-1 细胞)凝集素样氧化低密度脂蛋白受体表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, **19** (2): 230-234.
- [7] Limor R, Kaplan M, Sawamura T, Sharon O, Keidar S, Weisinger G, et al. Angiotensin II increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human vascular smooth muscle cells via a lipoxygenase-dependent pathway [J]. *J of Hypertension*, 2005, **18** (3): 299-307.
- [8] Gallagher PE, Chappell MC, Ferrario CM, Tallant EA. Distinct roles for ANG ① and ANG(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290** (2): C420-C426.
- [9] Goode GK, Miller JP, Heagerty AM. Hyperlipidaemia, hypertension, and coronary heart disease [J]. *Lancet*, 1995, **345** (8946): 362-364.
- [10] 郝文君, 白小涓, 杨向红. 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凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (4): 309-312.
- [11] Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Iino N, Egashira K, Shimokawa H, et al. Downregulation of angiotensin ① type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (12): 1 896-901.

(此文编辑 文玉珊)