

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0599-04

• 实验研究 •

## 瑞舒伐他汀抑制 C 反应蛋白诱导的血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 mRNA 表达

王海蓉<sup>1</sup>, 朱刚艳<sup>2</sup>, 陈德良<sup>1</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 巢升平<sup>1</sup>, 干学东<sup>1</sup>, 熊世熙<sup>1</sup>

(1 武汉大学中南医院心内科; 2 武汉大学人民医院老年病科, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] C 反应蛋白; 血小板反应蛋白 1; 血管内皮细胞; p38MAPK

[摘要] 目的 研究瑞舒伐他汀对 C 反应蛋白诱导的人血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 表达的影响。方法 体外培养人血管内皮细胞, ELISA 和 RT-PCR 检测 C 反应蛋白对血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 表达的剂量与时间效应。Western blotting 检测信号蛋白 p38MAPK 的表达水平。结果 C 反应蛋白以剂量和时间依赖方式显著增加血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 mRNA 表达, p38MAPK 表达增加, 其抑制剂 SB203580 减少 p38MAPK 的磷酸化及血小板反应蛋白 1 mRNA 表达水平, 瑞舒伐他汀显著抑制 p38MAPK 表达及血小板反应蛋白 1 mRNA 和蛋白的表达。结论 C 反应蛋白至少通过 p38MAPK 磷酸化途径直接诱导血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 表达, 促进细胞炎症反应, 而瑞舒伐他汀抑制 C 反应蛋白的这种效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Rosuvastatin Inhibited the Expression of Thrombospondin-1 mRNA Induced by C-Reactive Protein in Vascular Endothelial Cells

WANG Hai-Rong, ZHU Gang-Yan, CHEN De-Liang, ZHANG Lin, CHAO Sheng-Ping, GAN Xue-Dong and XIONG Shi-Xi

(Department of Cardiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

[KEY WORDS] C-Reactive Protein, Thrombospondin-1, Human Vascular Endothelial Cells, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase

[ABSTRACT] Although C-reactive protein (CRP) is widely used as an inflammatory marker of cardiovascular disease, statins showed a variety of additional effects that may contribute to their protective vascular benefit. However, it is not fully understood whether CRP exerts direct proinflammatory effects on human vascular endothelial cells (HUVEC).

**Methods** Thrombospondin-1 (TSP-1) plays a critical role in the development of atherosclerosis and thrombosis. Vascular endothelial cells were incubated with purified CRP at clinically relevant concentrations (5, 10, 20 and 40 mg/L).

The protein and transcript levels of the TSP-1 were determined by ELISA and RT-PCR respectively. Also, the phosphorylation of p38MAPK was studied via Western blotting analysis.

**Results** In HUVEC, purified CRP significantly induced the protein release and mRNA expression of TSP-1 in a dose- and time-dependent manner respectively. SB203580 (a specific p38MAPK inhibitor) efficiently suppressed these effects of CRP as well as rosuvastatin (10 μmol/L). CRP triggered the phosphorylation of p38MAPK signal transduction.

**Conclusion** CRP induces TSP-1 protein release and mRNA expression from vascular endothelial cells via activation of the p38MAPK signaling pathways, suggesting that CRP plays an important role in the propagation and prolongation of inflammation in vascular inflammation.

血清高敏 C 反应蛋白 (high sensity C-reactive protein, hs-CRP) 水平在冠心病人群中显著增加<sup>[1]</sup>, CRP 对血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等具有直接炎症刺激效应<sup>[2,3]</sup>。但是尚无研究报道 CRP 对人血管内皮细胞 (HUVEC) 血小板反应蛋白 1 (thrombospondin-1, TSP-1) 表达的影响。TSP-1 是调节血管

生成的重要因子<sup>[4]</sup>。除血小板 α 颗粒外, 体内多种细胞均可生成 TSP-1。TSP-1 具有强烈抑制内皮细胞增殖, 并直接独立驱动内皮细胞凋亡, 以及激活转化生长因子 β1 (TGF-β1) 等作用, 是主要的内源性血管新生抑制物<sup>[4]</sup>。他汀类药物可以通过多种机制, 如抑制超氧化物形成, 减轻单核细胞与内皮细胞之间的相互作用, 上调抗氧化蛋白<sup>[5]</sup>等, 防止内皮功能障碍。本研究拟从血管内皮细胞水平检测瑞舒伐他汀对 CRP 诱导的 TSP-1 表达的影响, 探讨 CRP 致炎症作用的相关机制及其信号调控过程。

[收稿日期] 2010-08-02 [修回日期] 2010-08-20

[基金项目] 湖北省自然科学基金 (2009CDB059) 和中国科学院淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金 (2010FB12) 资助

[作者简介] 王海蓉, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病。朱刚艳, 博士, 副主任医师, 研究方向为老年心脏病。陈德良, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心脏病。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

CRP、小鼠抗人 TSP-1 和  $\beta$  肌动蛋白单抗购自 Sigma 公司, 人血管内皮细胞系购于 ATCC 公司, RPMI 1640 培养基、小牛血清和胰蛋白酶购于 Gibco BRL 公司, 兔抗人 p-p38MAPK 多抗购于 Calbiochem 公司, RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司, 人 TSP-1 免疫检测试剂盒购于 R&D 公司, 瑞舒伐他汀由阿斯利康公司提供。

### 1.2 血管内皮细胞的培养

$2 \times 10^5$  个血管内皮细胞接种于 6 孔细胞培养板, 置含 10% 小牛血清 RPMI 1640 细胞培养液中, 于 37℃ 含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。待细胞长至亚汇合状态时, 更换为无血清的 RPMI 1640 细胞培养液, 使细胞生长同步化 24 h。将上述同步化细胞分 3 组: 对照组: 加入 PBS 为阴性对照; ④CRP 刺激组: 分别加入 CRP 5、10、20 及 40 mg/L; ④干预组: 预先加入 10  $\mu\text{mol/L}$  瑞舒伐他汀或 5  $\mu\text{mol/L}$  p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理 30 min, 加入 20 mg/L CRP。

### 1.3 C 反应蛋白的纯化

人 CRP 纯化以除去可能的污染物质。Limulus 毒性分析纯化 CRP 中的 LPS 浓度低于 5 ng/L。CRP 纯度经 12.5% SDS-PAGE 电泳检测显示 25 kDa 单一条带。

### 1.4 ELISA 检测

CRP (0、5、10、20 和 40 mg/L) 分别培养细胞 12 h 提取细胞培养液上清。干预实验中, 细胞预先用 CRP 抗体或 SB203580 孵育 30 min, 再用 CRP 干预 12 h 提取细胞培养液上清。培养液上清用以检测 TSP-1 水平, 采用 ELISA 检测试剂盒, 严格按照使用说明书进行操作。

### 1.5 RT-PCR 检测血小板反应蛋白 1 mRNA 的表达

Trizol 提取各组细胞总 RNA, RT-PCR 反应严格按照试剂盒说明书进行。引物序列: TSP-1 上游 5'-AAA GCG TCT TCA CCA GAG ACC-3', 下游 5'-GCA GAT GGT AAC TGA GTT CTG ACA-3', 产物长度 496 bp。GAPDH 上游 5'-CCA TGG AAG GCT GGG G-3', 下游 5'-CAA AGT TGT CAT GAC C-3', 产物长度 250 bp。引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应条件为 94℃ 3 min, 35 个循环包括 94℃ 变性 60 s, 55℃ 复性 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 3~5 V/cm 电压下电泳约 30 min 后, 于紫外灯下观察并

用计算机图像分析系统扫描和分析, 以 GAPDH 吸光值进行校正。

### 1.6 Western blotting 测定磷酸化 p38MAPK 蛋白

细胞孵育 30 min, 收集各组细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 加入预冷的细胞裂解液, 冰上放置 30 min, 4℃、15000 g 离心 10 min。12% SDS-PAGE 电泳, 免疫印迹分析仪将蛋白转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭处理印迹 60 min, 磷酸化 p38MAPK 抗体 4℃ 过夜, 抗羊 IgG/HRP 二抗室温下 2 h, DAB 显色。凝胶成像扫描系统行密度扫描, 以扫描值表示磷酸化 p38MAPK 的蛋白量。

### 1.7 统计学方法

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用  $q$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。所有实验均重复 3 次。

## 2 结果

### 2.1 C 反应蛋白对血管内皮细胞血小板反应蛋白 1 水平的影响

TSP-1 在无 CRP 干预时少量释放; 5 mg/L CRP 可明显增加其表达 ( $P < 0.05$ ), 随 CRP 剂量增加, TSP-1 水平呈剂量依赖方式增加。TSP-1 在 CRP 干预 6 h 即可检测到, 24 h 明显增加, 呈时间依赖性。p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 与瑞舒伐他汀均能有效抑制 CRP 诱导的血管内皮细胞 TSP-1 释放 (表 1 和 2)。

表 1 不同浓度 C 反应蛋白对血管内皮细胞 TSP-1 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$  ng/L)

分 组	TSP-1
CRP	
0 mg/L (对照组)	122 $\pm$ 38
5 mg/L	233 $\pm$ 47 <sup>a</sup>
10 mg/L	380 $\pm$ 42 <sup>a</sup>
20 mg/L	430 $\pm$ 34 <sup>a</sup>
40 mg/L	596 $\pm$ 89 <sup>a</sup>
SB203580	246 $\pm$ 56 <sup>b</sup>
瑞舒伐他汀	330 $\pm$ 73 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$  与对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与 20 mg/L CRP 组比较。

### 2.2 C 反应蛋白对血管内皮细胞血小板反应蛋白 mRNA 表达的影响

5 mg/L CRP 能诱导血管内皮细胞 TSP-1 mRNA 表达; 与阴性对照组比较, TSP-1 mRNA 表达明显增

加 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。瑞舒伐他汀预处理血管内皮细胞后, TSP-1 mRNA 表达较对照组下降, SB203580 干预血管内皮细胞后 TSP-1 mRNA 表达降低 (图 1 和表 3)。

表 2 CRP 干预不同时间对血管内皮细胞 TSP-1 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)

时间	TSP-1
0 h(对照组)	120 $\pm$ 30
6 h	240 $\pm$ 42 <sup>a</sup>
12 h	366 $\pm$ 34 <sup>a</sup>
16 h	418 $\pm$ 44 <sup>a</sup>
24 h	550 $\pm$ 65 <sup>a</sup>
48 h	200 $\pm$ 47 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

表 3 CRP 对血管内皮细胞 TSP-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	TSP-1 mRNA
CRP	
0 mg/L(对照组)	1.7 $\pm$ 0.2
5 mg/L	2.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
10 mg/L	3.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
20 mg/L	4.2 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
40 mg/L	5.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
SB203580	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
瑞舒伐他汀	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 20 mg/L CRP 组比较。

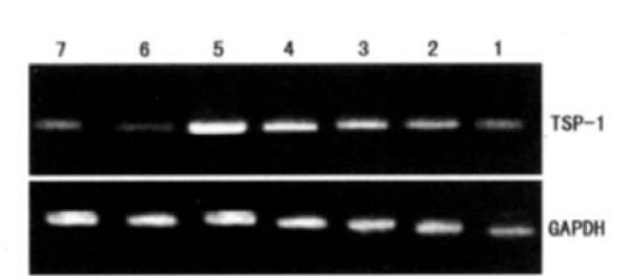


图 1 CRP 显著诱导血管内皮细胞 TSP-1 mRNA 表达 1 为阴性对照, 2-5 分别为 5、10、20 和 40 mg/L CRP 组, 6 为瑞舒伐他汀组, 7 为 SB203580 组。

2.3 磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达

CRP 以剂量依赖方式增加血管内皮细胞 p38MAPK 磷酸化水平 (图 2)。与 20 mg/L CRP 组比较, 瑞舒伐他汀组或 SB203580 干预组 p38MAPK 磷酸化水平降低 ( $P < 0.05$ , 表 4)。

表 4 C 反应蛋白对血管内皮细胞 p38MAPK 磷酸化表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	p38MAPK 磷酸化
CRP	
0 mg/L	1.4 $\pm$ 0.2
5 mg/L	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
10 mg/L	2.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
20 mg/L	3.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
40 mg/L	4.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
SB203580	1.9 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
瑞舒伐他汀	2.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 20 mg/L CRP 组比较。

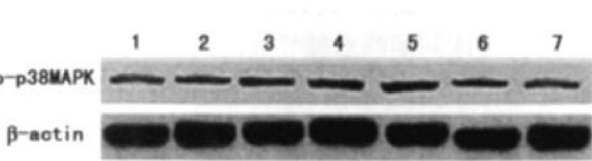


图 2 p38MAPK 磷酸化参与 CRP 诱导的血管内皮细胞 TSP-1 表达 1 为阴性对照, 2-5 分别为 5、10、20 和 40 mg/L CRP 组, 6 为 SB203580 组, 7 为瑞舒伐他汀组。

3 讨论

CRP 是非特异性炎症反应中最敏感的炎症因子, 被认为是未来心血管事件最强有力的炎性标记物。近年来越来越多的研究表明, CRP 不仅是心血管疾病的预测指标, 更有可能是动脉粥样硬化的致病因素<sup>[6]</sup>。

本研究中, 纯化后的 CRP 以剂量和时间依赖方式诱导血管内皮细胞释放 TSP-1 及其 mRNA 表达。TSP-1 可被多种细胞分泌, 作为体内天然的抗新生血管因子, 是多肽类内源性血管新生抑制物中的重要一员<sup>[7]</sup>。TSP-1 本身可促进血管内皮细胞、平滑肌细胞、中性粒细胞等激活, 血管活性物质、氧代谢产物释放增加, 纤维蛋白原沉积等, 启动或加重血栓形成<sup>[8]</sup>。TSP-1 的激活还间接影响炎性细胞和成肌纤维细胞的活性, 多形核细胞的激活和趋化作用直接导致血管内皮细胞功能的变化, 直接抑制细胞移行, 诱导细胞凋亡, 抑制新生血管生成。

既往研究表明, CRP 可通过激活血管内皮细胞 NF- $\kappa$ B 信号, 诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等前炎症因子表达, 上调 ICAM-1 等黏附分子、巨噬细胞集落刺激因子、IL-8 等<sup>[9]</sup>, 诱发一系列炎症反应。心血管疾病患者 CRP 浓度范围多在 5~40 mg/L。本研究中, 临床剂量范围 (5~40 mg/L) 的 CRP 能直接刺激血管内皮

细胞 TSP-1 mRNA 表达,提示 CRP 的一定致炎症效应中包括诱导 TSP-1 活化,进而影响转化生长因子,发挥在动脉粥样硬化增殖性病变中的致纤维化作用。采用 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 能抑制 CRP 诱导的血管内皮细胞 TSP-1 分泌及其 mRNA 表达。p38MAPK 的活化可诱导许多关键的炎症因子如 TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[10]</sup> 表达,进一步恶化 CRP 的炎症效应。研究显示,CRP 诱导血管内皮细胞 TSP-1 mRNA 和蛋白表达可被瑞舒伐他汀抑制。瑞舒伐他汀可明显下调 CRP 诱导的血管内皮细胞 p38MAPK 活化途径。

相关研究显示,瑞舒伐他汀稳定内皮祖细胞但不能防止其在急性炎症期间的下降<sup>[11]</sup>。瑞舒伐他汀对持续或间断高血糖导致的内皮细胞炎症具有保护作用<sup>[12]</sup>。本研究结果进一步证实,瑞舒伐他汀有效抑制 CRP 诱导的血管内皮 p38MAPK 途径激活带来的炎症反应,下调 TSP-1 mRNA 转录和蛋白表达,有助于抑制血管间质炎症及纤维化进程。

#### [参考文献]

- [1] Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, et al. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2006 **440** (7088): 1217-221.
- [2] 王海蓉,黄从新,江洪,等. C反应蛋白直接刺激人单核细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  与白细胞介素 6 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005 **13** (2): 199-202.
- [3] Wang HR, Li JJ, Huang CX, et al. Fluvastatin inhibits the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and activation of nuclear factor- $\kappa$ B in human endothelial cells stimulated by C-reactive protein [J]. *Clinical Chimica Acta*, 2005 **353** (1-2): 53-60.
- [4] Nesselroth W, Illis AJ, Fuse S. The C-terminal domain of thrombospondin-1 induces vascular smooth muscle cell chemotaxis [J]. *J Vasc Surg*, 2001 **33** (3): 595-600.
- [5] Haas MJ, Horani MH, Parseghian SA, et al. Statins prevent dextrose-induced endothelial barrier dysfunction, possibly through inhibition of superoxide formation [J]. *Diabetes*, 2006 **55** (2): 474-479.
- [6] Rikker P, Danielson E, Fonseca F, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial [J]. *Lancet*, 2009 **373** (9670): 1175-182.
- [7] Stenina O I, Krukavets I, Wang K, et al. Increased expression of thrombospondin-1 in vessel wall of diabetic Zucker rat [J]. *Circulation*, 2003 **107** (3): 209-215.
- [8] Bonnefoy A, Moura R, Hoylaerts ME. The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008 **65**: 713-727.
- [9] Verna S, Badiwala MV, Weisel RD, et al. C-reactive protein activates the nuclear factor- $\kappa$ B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003 **126** (6): 1886-891.
- [10] Ikeda Y, Young LH, Lefler AM, et al. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, protects ischemic reperfused myocardium in normocholesterolemia rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003 **41** (4): 649-656.
- [11] Piconi L, Cognigni M, Di Rosa R, et al. The protective effect of rosuvastatin in human umbilical endothelial cells exposed to constant or intermittent high glucose [J]. *J Diabetes Complications*, 2008 **22** (1): 38-45.
- [12] Desjardins F, Sekkali R, Verreth W, et al. Rosuvastatin increases vascular endothelial PPAR $\gamma$  expression and corrects blood pressure variability in obese dyslipidaemic mice [J]. *Eur Heart J*, 2008 **29** (1): 128-137.

(此文编辑 文玉珊)