

阿托伐他汀对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中 Wnt 信号通路及相关因子表达的影响

李艳伟^{1*}, 于晓玲^{1#}, 申玉超²(1. 辽宁医学院附属第一医院老年病科高级医疗服务中心, 辽宁锦州 121001; 2. 沧州市中心医院重症医学科, 河北沧州 061001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1574-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.12

摘要 目的: 研究阿托伐他汀对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中 Wnt 信号通路及相关因子 Wnt1、 β -连环蛋白(β -catenin)及蓬乱蛋白 1(dvl-1)表达的影响。方法: 将体外培养的 HUVECs 分为空白对照组、ox-LDL(50 mg/L)组和低、高剂量(ox-LDL 50 mg/L+阿托伐他汀 0.5、10 μ mol/L)组, 分别加入相应药物培养 24 h 后, 用硝酸还原酶法测定各组细胞中一氧化氮(NO)含量, 用免疫组化法和蛋白质印迹法检测各组细胞中 Wnt1、 β -catenin 及 dvl-1 蛋白的表达。结果: 与空白对照组比较, 其他 3 组细胞中 NO 含量明显减少($P < 0.01$), Wnt1、 β -catenin、dvl-1 蛋白表达均明显增强($P < 0.01$); 与 ox-LDL 组比较, 低、高剂量组细胞中 NO 含量均明显增加($P < 0.01$), Wnt1、 β -catenin、dvl-1 蛋白表达均明显减弱($P < 0.01$)。结论: 阿托伐他汀能抑制 ox-LDL 诱导的 HUVECs 中 Wnt 信号通路及相关因子表达, 其可能是阿托伐他汀抗动脉粥样硬化的机制之一。

关键词 阿托伐他汀; 人脐静脉内皮细胞; Wnt 信号通路; 氧化型低密度脂蛋白

Effects of Atorvastatin on Wnt Signaling Pathway and the Expression of Related Factors in ox-LDL Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells

LI Yan-wei¹, YU Xiao-ling¹, SHEN Yu-chao²(1. Senior Medical Center for Senile Disease, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China; 2. ICU, Cangzhou Central Hospital, Hebei Cangzhou 061001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of atorvastatin on Wnt signaling pathway and the expression of related factors Wnt1, β -catenin and dvl-1 in oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). METHODS: HUVECs cultured *in vitro* were divided into blank control group, ox-LDL group (50 mg/L), low-dose and high-dose groups (ox-LDL 50 mg/L+atorvastatin 0.5, 10 μ mol/L). They were cultured with relevant drugs for 24 h; nitrate reductase method was adopted to determine the content of NO; and Wnt1, β -catenin and dvl-1 protein expressions were determined by immunohistochemical method and Western blotting assay. RESULTS: Compared with blank control group, the content of NO decreased significantly in other 3 groups ($P < 0.01$), while Wnt1, β -catenin and dvl-1 protein expressions increased significantly ($P < 0.01$); compared with ox-LDL group, the content of NO in ox-LDL low-dose and high-dose groups increased significantly ($P < 0.01$), while Wnt1, β -catenin and dvl-1 protein expressions decreased significantly ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: Atorvastatin can inhibit Wnt signaling pathway and the expression of related factors in ox-LDL induced HUVECs, which may be one of anti-atherosclerosis mechanisms of atorvastatin.

KEYWORDS Atorvastatin; Human umbilical vein endothelial cells; Wnt signaling pathways; Oxidized low density lipoprotein

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是具有较长一段无症状阶段的慢性进展性炎症疾病, 疾病进展最终可致不稳定型心绞痛、心肌梗死、心源性猝死等急性心血管事件。近年来, 内皮功能不全被多数学者认为是 AS 发生机制中的始动环节, 因此对内皮细胞损伤进行药物干预治疗, 也成为心血管疾病领域研究的一个新的趋势^[1]。有研究证实, 在高胆固醇血症所致的兔腹主动脉粥样斑块中 β -连环蛋白(β -catenin)的 mRNA 和蛋白表达明显升高, 提示 β -catenin 参与了 AS 的形成^[2], 因此推断 Wnt/ β -catenin 信号通路可能与 AS 的发生机制有关。本文拟通过研究阿托伐他汀对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱

导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)Wnt 信号通路及相关因子 Wnt1、 β -catenin、蓬乱蛋白 1(dvl-1)表达, 探讨 AS 与 Wnt/ β -catenin 信号通路的关系及阿托伐他汀抗 AS 的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

CO₂培养箱(美国 Thermo forma 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 超速离心机(美国 Sigma 公司)。

1.2 药品与试剂

阿托伐他汀原料药(美国 Sigma 公司, 批号: PZ0001, 纯度: >98%); 胎牛血清、1640 培养基、胰蛋白酶购自北京海克隆生物有限公司; ox-LDL(广州奕源生物科技有限公司, 批号: YB-002, 规格: 2.0 mg/ml); 兔抗人 Wnt1 抗体(巴傲得生物科技有限公司); 鼠抗人 β -catenin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); 兔抗人 dvl-1 抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

* 医师。研究方向: 动脉粥样硬化与心血管疾病。电话: 0416-4197632。E-mail: wenze2004222@126.com

通信作者: 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 动脉粥样硬化与心血管疾病。电话: 0416-4197632。E-mail: gtxiaolingyu@163.com

1.3 细胞

HUVECs购自美国ATCC公司。

2 方法

2.1 细胞培养与分组

取HUVECs置于含10%胎牛血清的1640细胞培养液中,5%CO₂细胞培养箱中培养,1~2 d换液1次,以0.25%胰蛋白酶消化及传代,并在倒置显微镜下观察细胞形态,选择生长良好的4~6代细胞用于试验。将细胞分4组,分别为(1)空白对照组,只有培养液,不加任何干预;(2)ox-LDL组:在培养液中加入终浓度为50 mg/L的ox-LDL;(3)低剂量组:在培养液中加入终浓度为50 mg/L的ox-LDL和0.5 μmol/L的阿托伐他汀;(4)高剂量组:在培养液中加入终浓度为50 mg/L的ox-LDL和10 μmol/L的阿托伐他汀。各组细胞加药培养24 h。

2.2 细胞形态学观察

用倒置显微镜观察各组细胞加药培养24 h后的形态学变化。

2.3 NO含量的检查

用硝酸还原酶法^[3],特异性将NO³⁻还原成NO²⁻,通过显色深浅测定各组细胞中NO的含量。

2.4 免疫组织化学法检测蛋白的表达

将第4代细胞接种在有盖玻片(经多聚赖氨酸处理)的6孔板中,进行细胞爬片,4℃10%福尔马林固定30 min,30% H₂O₂-纯甲醇(1:9)室温浸泡15 min,封闭液37℃孵育30 min,加兔抗人Wnt1、鼠抗人β-catenin、兔抗人dvl-1抗体(1:600)于4℃过夜;加二抗A液37℃孵育30 min,加二抗B液37℃孵育30 min,显色、复染。以上每步之间用PBS冲洗3次,每次4 min,显色、复染,脱水、封片。镜下观察各组细胞中相应蛋白的表达。

2.5 蛋白质印迹(Western blot)法检测蛋白表达

收集各组细胞,超声裂解细胞,4℃1 000×g离心2 min,取上清液,用考马斯亮蓝法对蛋白进行定量。取20 μl蛋白样品行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别滴加兔抗人Wnt1、鼠抗人β-catenin、兔抗人dvl-1抗体(1:400),4℃孵育过夜,相应碱性磷酸酶标记的二抗室温孵育2 h,碱性磷酸酶法显色。于扫描仪上成像,并用GENE GENIUS软件对条带进行灰度值半定量进行分析。以β-肌动蛋白(β-actin,分子质量为43 kDa)为内参,Wnt1(分子质量为40 kDa)、β-catenin(分子质量为92 kDa)及dvl-1(分子质量为76 kDa)与β-actin条带灰度值的比值代表各蛋白表达的相对量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件进行统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,组间两两差异采用SNK检验。 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞形态学变化

镜下,空白对照组细胞呈单层铺路石状镶嵌排列,互不重叠,细胞边界清晰,呈多角形;ox-LDL组细胞收缩变圆,细胞间隙增宽,边界不清,部分细胞脱落;高、低剂量组细胞间隙较ox-LDL组窄,细胞形态趋于对照组,且高剂量组较低剂量组细胞形态更趋于对照组。各组细胞的倒置显微镜图见图1。

3.2 细胞中NO含量比较

与空白对照组比较,ox-LDL组和高、低剂量组细胞中NO含量均明显减少($P < 0.01$);与ox-LDL组比较,高、低剂量组细胞中NO含量均明显增加($P < 0.01$),且高剂量组比低剂量组增加更明显($P < 0.01$),具体结果见表1。

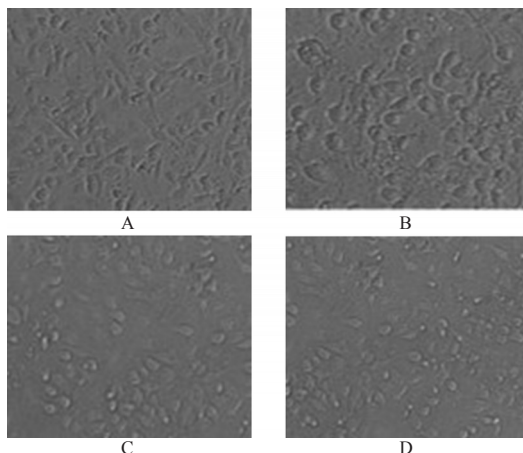


图1 各组细胞的倒置显微镜图

A.空白对照组;B.ox-LDL组;C.低剂量组;D.高剂量组

Fig 1 Inverted micrograph of cells

A. blank control group; B. ox-LDL group; C. low-dose group; D. high-dose group

表1 各组细胞中NO含量和Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 The protein expressions of Wnt1, β-catenin and dvl-1 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	NO, μmol/L	Wnt1/β-actin	β-catenin/β-actin	dvl-1/β-actin
空白对照组	47.18 ± 0.013	0.188 ± 0.004	0.130 ± 0.003	0.185 ± 0.007
ox-LDL组	15.37 ± 0.90 [*]	0.370 ± 0.002 [*]	0.248 ± 0.002 [*]	0.301 ± 0.006 [*]
低剂量组	26.33 ± 0.58 ^{**}	0.267 ± 0.005 ^{**}	0.203 ± 0.004 ^{**}	0.257 ± 0.004 ^{**}
高剂量组	27.23 ± 0.72 ^{**Δ}	0.230 ± 0.004 ^{**Δ}	0.166 ± 0.007 ^{**Δ}	0.221 ± 0.003 ^{**Δ}

与空白对照组比较: * $P < 0.01$;与ox-LDL组比较:[#] $P < 0.01$;与低剂量组比较:^Δ $P < 0.01$

vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. ox-LDL group: [#] $P < 0.01$; vs. low-dose group: ^Δ $P < 0.01$

3.3 细胞中Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白的表达

空白对照组细胞质内均出现了Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白的棕黄色淡染颗粒。与空白对照组比较,ox-LDL组细胞质内出现大量棕色颗粒聚集、浓染。高、低剂量组较空白对照组细胞质内出现较多棕黄色颗粒,但较ox-LDL组细胞棕黄色颗粒明显减少,且高剂量组较低剂量组细胞质内棕黄色颗粒减少。各组细胞中Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白表达的光镜图见图2。

利用Western blot法,与空白对照组比较,ox-LDL组和高、低剂量组细胞中Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白定量明显升高($P < 0.01$);与ox-LDL组比较,高、低剂量组细胞中Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白定量明显降低($P < 0.01$),且高剂量组较低剂量组降低更明显($P < 0.01$)。各组细胞中Wnt1、β-catenin、dvl-1蛋白的表达见表1。

4 讨论

血管内皮受损是AS发病的始动环节,尤其是对ox-LDL的摄取是AS起始和进展中的关键。Ross R^[4]认为,AS的发生是由于血管内皮细胞和平滑肌细胞受各种危险因素,尤其是ox-LDL的损伤,使血管局部产生的一种过度的慢性炎症增生反应。已有大量研究证实,ox-LDL通过其特异性受体氧化型低密度脂蛋白受体1(LOX-1)的介导激活多条炎症信号通路,在AS的形成及进展中对血管内皮造成炎症刺激损伤^[5-7]。Wnt信号通路高度保守,与基因的表达、细胞的极性及细胞的黏附有关,它分为经典的Wnt信号通路(即Wnt/β-catenin信号

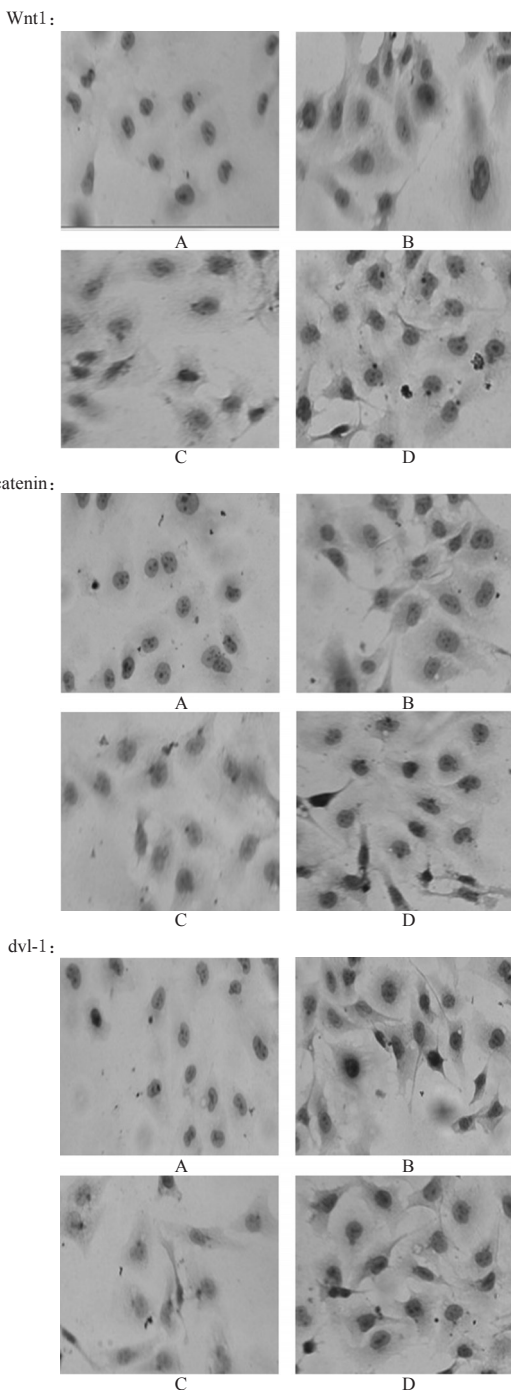


图2 各组细胞中Wnt1、 β -catenin、dvl-1蛋白表达的光镜图

A.空白对照组;B.ox-LDL组;C.低剂量组;D.高剂量组

Fig 2 Light micrograph of Wnt1, β -catenin and dvl-1 protein expressions

A. blank control group; B. ox-LDL group; C. low-dose group; D. high-dose group

通路)和非经典Wnt信号通路(包括非经典Wnt/Ca²⁺和Wnt/JNK通路)^[8]。本研究主要探讨Wnt/ β -catenin信号通路。Wnt/ β -catenin信号通路活化时,Wnt与Frizzled受体结合激活细胞内的dvl,磷酸化的dvl将信号传至细胞内,抑制 β -catenin等组成的复合物酶的活性,引起 β -catenin在细胞内的积累,并进入细胞核与T细胞因子(TCF)、淋巴细胞增强因子家族的转录因子形成复合物^[9],它可与钙联蛋白(Calnexin)启动子区结合,从

而下调calnexin的表达^[10]。calnexin表达减少,calnexin/catenin复合体减少,使内皮细胞间黏附功能下降,细胞间缝隙形成、通透性增加,从而导致炎症细胞易侵入血管内皮下而导致AS的形成。综上推断,Wnt/ β -catenin信号通路激活与AS的形成有关。

阿托伐他汀通过抑制3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(HUG-CoA)还原酶,阻碍L-甲羟戊酸的生成达到降低胆固醇的目的。研究表明,他汀类药物在抑制炎症反应、修复受损血管、恢复血管内皮完整性、稳定斑块等方面发挥着关键作用^[11-12],从而预防心血管事件的发生。在实验中发现,他汀类药物能抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)诱导的人脐静脉内皮细胞细胞间黏附分子1(ICAM-1)的表达^[13];阿托伐他汀钙能够上调内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的表达,增加eNOS mRNA的稳定性,减少ox-LDL对eNOS的负向调节;阿托伐他汀钙可以选择性地维持NO介导的内皮依赖性动脉松弛^[14]。

本研究显示,被ox-LDL诱导的HUVECs分泌的NO明显减少,同时Wnt1、 β -catenin、dvl-1蛋白表达明显升高,由此推测ox-LDL有可能激活Wnt/ β -catenin信号通路。在ox-LDL诱导HUVECs的同时加入阿托伐他汀,发现内皮细胞分泌的NO明显增加,同时Wnt1、 β -catenin、dvl-1蛋白表达明显降低,因此推测被ox-LDL激活的Wnt/ β -catenin信号通路被阿托伐他汀抑制;并且阿托伐他汀高剂量组较低剂量组内皮细胞分泌的NO明显增加,同时Wnt1、 β -catenin、dvl-1蛋白表达明显降低,因此推测阿托伐他汀呈剂量依赖性抑制ox-LDL诱导的HUVECs的wnt信号通路及相关因子表达。本研究结果提示,Wnt/ β -catenin信号通路激活可能与AS的形成有关,而阿托伐他汀抗AS可能与其抑制Wnt/ β -catenin信号通路及相关因子表达有关,并且这一作用随剂量增加而更加明显。

参考文献

- [1] Schwartz BG, Economides C, Mayeda GS, et al. The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy[J]. *Int J Impot Res*, 2010, 22(2):77.
- [2] 王育林,江森,赵欣,等. β -钙联蛋白在兔腹主动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. *中华实验外科学杂志*, 2006, 23(9): 1 110.
- [3] 张秀梅,于晓玲,申玉超,等.阿托伐他汀对ox-LDL诱导的人脐静脉内皮细胞缝隙链接的影响[J]. *中国药房*, 2013, 24(5):412.
- [4] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2):115.
- [5] Murphy JE, Vohra RS, Dunn S, et al. Oxidised LDL internalisation by the LOX-1 scavenger receptor is dependent on a novel cytoplasmic motif and is regulated by dynamin-2[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 13): 2 136.
- [6] Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(5):738.
- [7] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein[J]. *Nature*, 1997, 386(6 620):73.
- [8] Xing Y, Clements WK, Kimelman D, et al. Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(22):2 753.
- [9] Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*,

II°烧烫伤模型大鼠体内TGF-β、p38 MAPK、IL-1β的表达分析

林小凤*, 石鹤坤, 郑健生, 林秀丽, 陈秋红, 陈锦珊#(解放军第175医院/厦门大学附属东南医院, 福建漳州 363000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1577-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.13

摘要 目的:探讨II°烧烫伤模型大鼠体内转化生长因子β(TGF-β)、p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和白细胞介素1β(IL-1β)的表达情况。方法:取大鼠分为4组,每组14只,分别为正常对照组、NaOH烧伤组、水烫伤组和乙醇烧伤组,分别建立相应的II°烧烫伤模型,24h后观察各组大鼠病理变化,酶联免疫吸附剂测定法检测各组大鼠建模后第1、4、7天血清中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β的水平。结果:与正常对照组比较,其余3组大鼠均可见表皮及真皮有不同程度的缺损或坏死,炎性细胞向肌层组织浸润,其中水烫伤组和乙醇烧伤组大鼠皮下水肿明显;NaOH烧伤组大鼠血清中TGF-β和p38 MAPK水平在第4、7天均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-1β表达无明显变化;水烫伤组大鼠血清中TGF-β水平在第1、4、7天均明显升高($P<0.05$),p38 MAPK和IL-1β水平在第4、7天明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);乙醇烧伤组大鼠血清中TGF-β水平在第4天明显升高($P<0.05$),p38 MAPK和IL-1β水平在第1、4、7天均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:水烫伤和乙醇烧伤可致大鼠II°烧烫伤模型中TGF-β、p38 MAPK和IL-1β水平均有不同程度的升高,并可能激发TGF-β、p38 MAPK和IL-1β参与的炎症信号通路。

关键词 烧烫伤;大鼠;转化生长因子β;p38丝裂原活化蛋白激酶;白细胞介素1β

Analysis of the Expressions of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° Burn and Scald Model Rats

LIN Xiao-feng, SHI He-kun, ZHENG Jian-sheng, LIN Xiu-li, CHEN Qiu-hong, CHEN Jin-shan (No. 175 Hospital of PLA/The Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Fujian Zhangzhou 363000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the expressions of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° burn and scald injury model rats. METHODS: Rats were divided into 4 groups with 14 rats in each group, such as normal control group, NaOH burn group, water scald group and ethanol burn group. II° burn and scald models were established, and the pathological changes of rats were observed 24 h later; the expression of serum TGF-β, p38 MAPK and IL-1β were determined with ELISA 1, 4 and 7 days after modeling. RESULTS: Compared with normal control group, there were varying degrees of impairment or necrosis in epidermis and dermis, inflammatory cell infiltration to the muscle tissue in three burn and scald groups, and water scald and ethanol burns groups showed obvious tissue edema. The serum levels of TGF-β and p38 MAPK increased significantly in NaOH burn group on the 4th and 7th day ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of IL-1β had no significantly change. The serum levels of TGF-β increased significantly in water scald group on the 1st, 4th and 7th day ($P<0.05$); the serum levels of p38 MAPK and IL-1β increased significantly on the 4th and 7th day ($P<0.05$ or $P<0.01$). The level of serum TGF-β increased significantly in ethanol burn group on the 4th day ($P<0.05$); the serum levels of p38 MAPK and IL-1β increased significantly on the 4th and 7th day ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Water scald and ethanol burn can cause different degree of the increase of TGF-β, p38 MAPK and IL-1β in II° scald and burn injury model rat, which may stimulate the inflammation signaling pathways associated with TGF-β, p38 MAPK and IL-1β.

KEYWORDS Burn and scald injury; Rats; TGF-β; p38 MAPK; IL-1β

- 2003,1 653(1):1.
- [10] Birchmeier W. Cell adhesion and signal transduction in cancer: conference on cadherins, catenins and cancer[C]. EMBO Rep, 2005, 6(5):413.
- [11] Kaneyuki U, Ueda S, Yamagishi S, et al. Pitavastatin inhibits lysophosphatidic acid-induced proliferation and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic smooth muscle cells by suppressing rac-1-mediated reactive oxygen species generation[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46(4):286.
- [12] Krum H, Bailey M, Meyer W, et al. Impact of statin therapy on clinical outcomes in chronic heart failure patients according to beta-blocker use: results of CIBIS II [J]. *Cardiology*, 2007, 108(1):28.
- [13] Leung WH, Lau CP, Wong CK, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation in hypercholesterolaemic patients[J]. *Lancet*, 1993, 41(8 859):1 496.
- [14] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in romocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species[J]. *Hypertension*, 2001, 37(6): 1 450.
- (收稿日期:2013-12-18 修回日期:2014-01-31)

*药师, 硕士。研究方向:分子药理学。电话:0596-2975804。E-mail:linxiaofeng_16@163.com

#通信作者:主管药师。研究方向:医院药学。电话:0596-2975795。E-mail:cjs1223@sohu.com