·基础研究·

阿托伐他汀对脂多糖诱导人主动脉内皮细胞细胞间黏附分子-1表达的影响*

嵇云鹏[1,2]，张彦燕[1]，杨 红[1,3]，石廷雨[1,3]，徐旖旎[1]，陶 玲[1]，沈祥春[1,3]**
(1. 贵州医科大学 天然药物资源优效利用重点实验室，贵州 贵阳 550025；2. 贵州省人民医院 药剂科，贵州 贵阳 550002；3. 贵州医科大学 中药药理教研室，贵州 贵阳 550025)

[摘 要] **目的**：观察阿托伐他汀(Atv.)对脂多糖(LPS)诱导人主动脉内皮细胞(HAECs)细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响，并探讨其分子机制。**方法**：用1 mg/L LPS复制HAECs损伤模型，通过MTT和乳酸脱氢酶(LDH)外漏率实验观察5 μmol/L Atv.对LPS诱导HAECs损伤的保护作用，采用RT-PCR法检测Atv.对ICAM-1 mRNA表达的影响，Western blot检测Atv.对ICAM-1、IκBα及NF-κB蛋白表达水平的影响。**结果**：与LPS组比较，Atv.能有效抑制LPS诱导的HAECs损伤，细胞活力增加($P<0.01$)，LDH外漏率减少($P<0.01$)，Atv.可抑制LPS诱导的ICAM-1 mRNA($P<0.05$)和蛋白表达上调($P<0.01$)，还可抑制LPS诱导的IκBα蛋白表达水平的降低和phospho-NF-κB p65蛋白表达水平的升高($P<0.01$)。**结论**：阿托伐他汀对LPS诱导HAECs损伤具有保护作用，并有效抑制ICAM-1的表达，该作用与抑制IκBα降解及NF-κB p65磷酸化有关。

[关键词] 阿托伐他汀；人主动脉内皮细胞；细胞间黏附分子-1；核因子-κB
[中图分类号] R96 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)08-0882-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.08.004

Effect of Atorvastatin on the Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Cultured Human Aortic Endothelial Cells Induced by Lipopolysaccharide

JI Yunpeng[1,2], ZHANG Yanyan[1], YANG Hong[1,3], SHI Tingyu[1,3], XU Yini[1], TAO Ling[1], SHEN Xiangchun[1,3]
(*1. The Key Lab. of Optimal Utilization of Natrual Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Department of Pharmacy, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 3. Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To observe the effect and mechanism of atorvastatin on the expression of ICAM-1 in lipopolysaccharide (LPS)-induced injury of cultured human aortic endothelial cells (HAECs). **Methods**: Cultured HAECs were treated with LPS alone (1 mg/L) or in the presence of atorvastatin (Atv., 5 μmol/L). MTT and LDH leakage ratio were used to analyze the protective effect of atorvastatin against LPS. The RT-PCR was used to determine the mRNA expression of ICAM-1. The western blot was adopted to detect the protein expression of ICAM-1, IκBα, NF-κB in HAECs injury induced by LPS. **Results**: Compared with LPS group, atorvastatin could effectively inhibit LPS-induced injury by increasing cell activity($P<0.01$), decreasing LDH releasing ratio($P<0.01$), inhibiting the up-regulating mRNA($P<0.05$) and protein ($P<0.01$) expression of ICAM-1, inhibiting the decreasing of phospho-NF-κB p65 protein expression ($P<0.01$) and the increasing of IκBα pro-

*[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81360650、81560811)；贵州省留学人员科技活动项目[黔人资合(2013)02号]；贵州省高层次创新型人才[黔科合人才(2015)4029号]；贵阳市现代药业计划[筑科合同(2011204)17号]；贵州省中药现代化专项[黔科合中药字(2012)5051号]；贵州省高等学校创新团队[黔教合人才团队(2014)31号]；贵州省创新团队[黔科合人才团队(2015)4025号]

**通信作者 E-mail:shenxiangchun@126.com

网络出版时间:2016-08-23 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160823.1343.036.html

tein expression ($P<0.01$). **Conclusion**: Atorvastatin has a protective effect on LPS induced HAECs injury, and can effectively inhibit the expression of ICAM-1, which is related to the inhibition of IκBα degradation and NF-κB p65 phosphorylation.

[**Key words**] atorvastatin; human aortic endothelial cells; intercellular adhesion molecule-1; nuclear factor-κB

细胞－细胞间黏附作用在多种刺激诱导的免疫应答中起重要作用。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)与整合素家族成员淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)及巨噬细胞分化抗原(Mac-1)结合,介导LFA-1 阳性细胞发生黏附及其它生物学反应,在单核细胞与内皮细胞紧密黏附过程中发挥着极为重要的作用[1]。ICAM-1 在脑缺血、帕金森、癌症等疾病 ICAM-1 表达异常升高,认为 ICAM-1 表达异常与肝癌、肺癌及结肠癌等肿瘤的发生发展有关[2-4];研究还发现,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块中和缺血再灌注损伤后的内皮细胞中 ICAM-1 表达也升高[5-6],因此 ICAM-1 已成为预防和治疗多种疾病的潜在靶点。他汀类药物是目前临床广泛应用的调血脂药,除有调血脂的作用外,还具有改善血管内皮功能、抗炎及调节免疫功能等非调血脂的作用。阿托伐他汀(Atv.)具有血药浓度高、亲脂性及半衰期长等特点。本研究通过探讨 Atv. 对脂多糖(LPS)诱导人主动脉内皮细胞(human aortic endothelial cells, HAECs) ICAM-1 表达的影响,分析 Atv. 作用的分子机制,为 Atv. 发挥抗炎作用及临床作为非调血脂药物应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

HAEC 原代细胞购买自美国 Science cell 公司、内皮细胞培养基(ECM)、胰蛋白酶、中和液以及细胞冻存液(science cell research laboratories, USA),Atv. 标准品(中国食品药品检定研究院,Lot 为 100590－201303),LPS(Escherichia coli 055, B5,Sigma,USA),乳酸脱氢酶(LDH)测试盒(南京建成生物工程研究所,Lot 为 20130806BCA),蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,Lot 为 00041305),总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,Lot 为 M1726),逆转录试剂盒(thermo scientific,Lot 为 00132311),Taq PCR Master Mix(生工生物工程(上海)股份有限公司,Lot 为 13112606F),ICAM-1 抗体(Santa cruz,Lot 为 F0510),兔抗 IκBα 抗体、phospho-NF-κ B p65 抗体、NF-κ B p65 抗体(Cell signaling technology)。

1.2　方法

1.2.1　HAECs 培养　参照 Science cell 公司指定培养条件、培养过程培养 HAEC 原代细胞。以 5×10^7/L 接种于培养瓶(板)内,5% CO_2、37 ℃培养至细胞融合,用第 4～5 代细胞进行以下研究。

1.2.2　分组及处理　研究分为空白对照组、模型组及 Atv. 组,control 组以无血清培养基处理,模型组采用 1 mg/L 的 LPS 处理培养12 h,Atv. 组采用 5 μmol/L 的 Atv. 预处理细胞 1 h,然后加入 1 mg/L 的 LPS 后培养 12 h,收集细胞进行后续研究。

1.2.3　细胞损伤检测　(**1**)MTT 检测细胞存活率:取对数生长期的细胞消化后,调整细胞密度,以 1×10^4/孔 细胞接种于 96 孔板;待细胞贴壁融合后弃去上清液,各组药物干预后,吸去培养液,每孔加入无血清 DMEM 180 μL 及 MTT 液 20 μL,继续培养 4 h,分离上清液,向细胞沉淀中加入 150 μL DMSO 低速振荡 10 min,于 490 nm 波长处测定各孔吸光度值,计算细胞存活率。(**2**)LDH 外漏率:上清液 LDH 提取,取对数生长期的细胞接种于 24 孔板,各组药物干预 1 h 后,加 LPS(1 mg/L)共同孵育 12 h,吸取上清液,－20 ℃冰箱保存,以待检测;细胞内 LDH 提取,吸去上清后的细胞用 PBS 洗 3 遍,1% Triton-X100 冰上裂解细胞 20 min,取裂解液,4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,计算胞内蛋白浓度,－20 ℃保存。根据 LDH 检测试剂盒说明书检测上清液和细胞内 LDH 含量,计算 LDH 外漏率。

1.2.4　ICAM-1 mRNA 检测　采用 RT-PCR 法,将 HAEC 接种于 6 孔板培养,细胞融合后药物处理 12 h,使用总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取细胞总 RNA。以提取的 RNA 为模板,使用逆转录试剂盒(Thermo Scientific)合成 cDNA,由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成 ICAM-1 引物,上游引物序列为 5′-CCTCACACTTCACTGTCACCT-3′,下游引物序列为 5′-CGTGC-

CGCACTGAACTGGAC-3′;内参对照 GADPH 上游引物序列为 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′,下游引物序列为 5′-AGGGGCATCCACAGTCTTC-3′。扩增条件为 94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 35 s,共 30 次循环;72 ℃最后延伸 2 min;共重复 3 次。扩增结束后,取 1 × TAE 电泳缓冲液,配置 1.8% 琼脂糖凝胶溶液,加入无毒核酸染料,充分混匀,取 5 μL PCR 产物进行电泳,凝胶成像仪成像,Bandscan 分析灰度值,以 ICAM-1/GADPH 表示各组 ICAM-1 mRNA 表达。

1.2.5 ICAM-1 、NF-κ B 及 Iκ B α 蛋白表达检测采用 Western blot 法,取生长良好的 HAECs,各组药物干预后,弃除含药培养基,预冷的 PBS 洗 3 遍,加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液适量,冰上振荡 20 min,刮下细胞,取裂解液于 1.5 mL EP 管内,4 ℃,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,用 BCA 试剂盒蛋白定量后,-70 ℃保存。调整蛋白浓度,以含总蛋白 40 μg 的总体积 20 μL 体系上样。蛋白样品 95 ℃变性 5 min,用 10% ~12% 的变性 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转移至 PVDF 膜(300 mA,2 h)。转膜后,5% 的脱脂牛奶(TBST 配制)室温封闭 1 h。加入一抗稀释液(ICAM-1 1∶200,IκBα 1∶1 000,phospho-NF-κ B p65 1∶1 000,NF-κ B p65 1∶1 000,β-actin 1∶5 000),4 ℃孵育过夜。一抗孵育后,TBST 洗涤 3 次,5 min/次,二抗稀释液(1∶6 000)室温孵育 1 ~2 h,TBST 洗涤 3 次,5 min/次,通过 ECL 化学发光法显色,Bio-Rad 凝胶成像系统成像, Bandscan 软件分析蛋白条带灰度强弱。

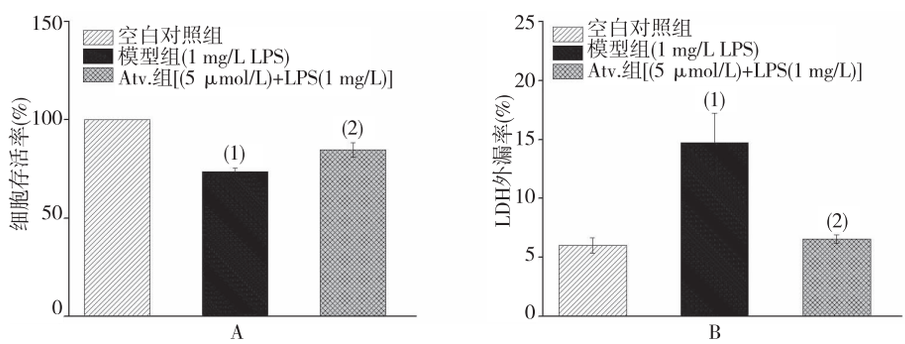
1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HAECs 细胞存活率与 LDH 外漏率

MTT 结果表明(图 1A),LPS 与 HAECs 作用 12 h 后,细胞活力较对照组细胞明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,Atv. 组对 LPS 诱导 HAEC 损伤 MTT 值降低具有抑制作用 ($P<0.01$)。LDH 外漏是细胞损伤的生物标志物之一,本研究结果显示(图 1B),与 control 组比较,模型组 LDH 外漏率明显增加 ($P<0.01$);与模型组比较,Atv. 组对可显著降低 LDH 外漏率($P<0.01$)。



(1) 与空白对照组比较,$P<0.01$; (2) 与模型组比较,$P<0.01$

图 1　各组细胞存活率与 LDH 外漏率的影响

Fig. 1　Effect of Atv. on cell viability and LDH releasing ratio

2.2 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达

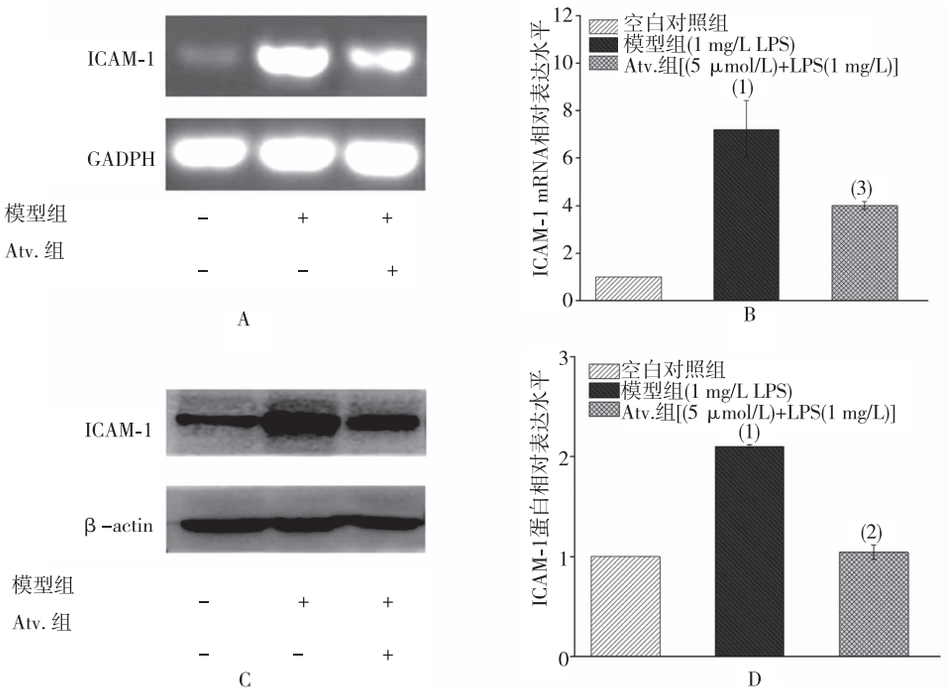
结果显示,模型组 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达明显增高($P<0.01$),Atv. 可抑制 LPS 诱导的 ICAM-1 mRNA($P<0.05$)和蛋白表达上调($P<0.01$),见图 2。

2.3 NF-κ B 及 Iκ B α 蛋白表达

与空白对照组比较,模型组 HAECs 中 IκBα 蛋白表达明显降低($P<0.01$),phospho-NF-κ B p65 表达明显升高($P<0.01$); Atv. 组 IκBα 蛋白表达水平高于模型组,但低于空白对照组,phospho-NF-κ B p6 蛋白表达水平低于模型组($P<0.01$),说明 Atv. 能抑制 LPS 诱导的 NF-κ B 的激活。

3 讨论

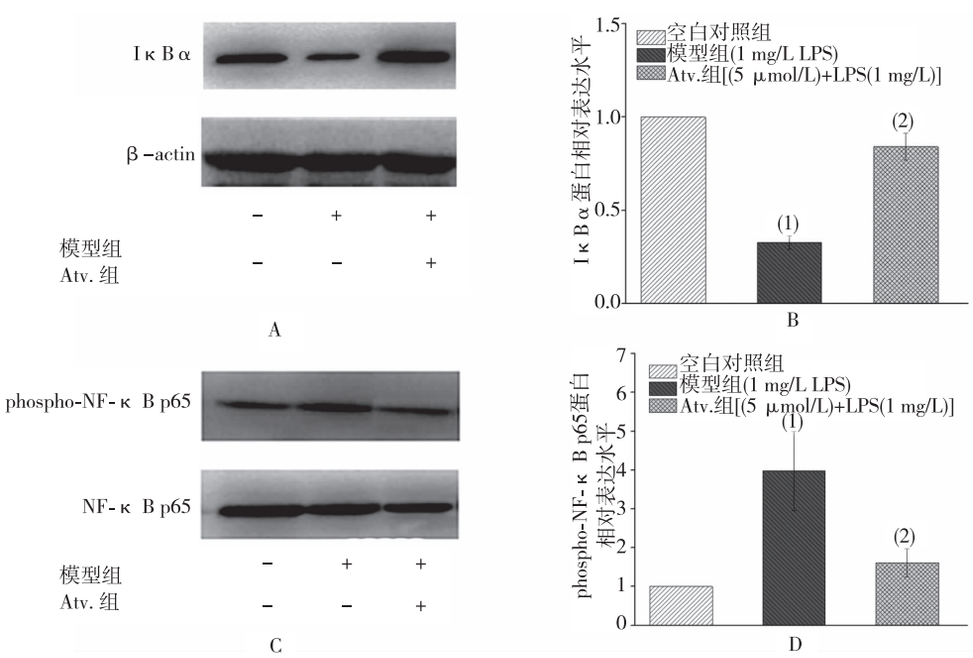
Atv. 作为 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,具有良好的调血脂作用,特别



(1)与空白对照组比较,$P<0.01$;(2)与模型组比较,$P<0.01$;(3)与模型组比较,$P<0.05$

图 2　Atv. 对 LPS 诱导 HAECs ICAM-1 mRNA 及蛋白表达的影响

Fig. 2　Impact of Atv. on LPS induced ICAM－1 mRNA and protein levels, respectively



(1)与空白对照组比较,$P<0.01$;(2)与模型组比较,$P<0.01$

图 3　Atv. 对 LPS 诱导 HAECs 中 IκBα 及 phospho-NF-κ B p65 蛋白表达的影响

Fig. 3　Impact of Atv. on LPS induced IκBα and phospho-NF-κ B p65 levels

是在高胆固醇血症的治疗中得到广泛应用。目前，Atv. 仍主要用于心血管系统疾病的治疗，如高脂血症、急性冠脉综合症、冠状动脉介入治疗等[7]。Atv. 的非调血脂作用近年来受到广泛关注，研究证实，通过抑制 TLR4/NF-κB 信号，Atv. 能够改善糖尿病伴高血压大鼠血管内皮功能，对三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠急性肠炎有保护作用[8-9]。体内、体外研究表明，他汀类药物亦具有抗癌活性[10]。

大量研究表明以抑制 ICAM-1 异常过表达为靶点，对于缓解炎症反应和免疫应答具有重要意义。本研究结果显示，Atv. 能有效的抑制 LPS 诱导的 HAECs ICAM-1 转录($P<0.05$)及蛋白表达水平($P<0.01$)。核因子-κ B(NF-κ B)在炎症反应和免疫应答中起关键作用，其激活可以诱导多种炎症因子表达，是内皮细胞炎症信号的重要通路之一，在炎症反应应答、细胞黏附、组织细胞凋亡有关基因表达的调控中起关键作用。研究证实，ICAM-1 的表达受到 NF-κ B 调控[11]。为阐明 Atv. 抑制 ICAM-1 表达的分子机制，本研究观察了与 NF-κ B 激活密切相关的蛋白 IκB 及磷酸化 NF-κ B p65 的表达情况。结果表明 Atv. 组较 LPS 组 IκBα 蛋白表达增加($P<0.01$)，而磷酸化 NF-κ B p65 表达降低($P<0.01$)，这表明，Atv. 对 ICAM-1 表达的抑制作用与抑制 NF-κ B 的激活有关，而该作用与稳定 IκBα，抑制 NF-κ B p65 磷酸化有关。

综上，Atv. 对 LPS 诱导的血管内皮细胞损伤具有保护作用，这可能与其抑制 ICAM-1 的表达有关。其对 ICAM-1 表达的抑制作用至少部分与抑制 NF-κ B 激活有关，这为 Atv. 抗炎作用提供了实验依据。但对 Atv. 在血管内皮细胞中调控 NF-κ B 信号通路的分子机制仍有待进一步研究。

4　参考文献

[1] Adam AP. Regulation of endothelial adherens junctions by tyrosine phosphorylation [J/OL]. Mediators Inflamm, 2015. http://dx. dio. org/10. 1155/2015/272858.

[2] Zhu XW, Gong JP. Expression and role of ICAM-1 in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma [J]. Asian Pacific J Cancer Prev, 2013 (3): 1579 - 1583.

[3] Gu X, Ma C, Yuan D, et al. Circulating soluble intercellular adhesion Molecule-1 in lung cancer: a systematic review [J]. Transl Lung Cancer Res, 2012 (1): 36 - 44.

[4] Ohtani H. Pathophysiologic significance of host reactions in human cancer tissue: desmoplasia and tumor immunity [J]. Tohoku J Exp Med, 1999 (3): 193 - 202.

[5] Jin L, Zhang LM, Xie KQ, et al. Paeoniflorin suppresses the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in endotoxin-treated human monocytic cell [J]. Br J Pharmacol, 2011 (2): 694 - 703.

[6] Yang M, Fu Z, Zhang Q, et al. Association between the polymorphisms in intercellular adhesion molecule-1 and the risk of coronary atherosclerosis: a case-controlled study [J]. PLoS One, 2014 (10): e109658.

[7] 赵冰. 阿托伐他汀临床研究进展[J]. 中国药房, 2010 (24): 2303 - 2304.

[8] Mason RP, Corbalan JJ, Jacob PF, et al. Atorvastatin enhanced nitric oxide release and reduced blood pressure, nitroxidative stress and rantes levels in hypertensive rats with diabetes [J]. J physiol Pharmacol, 2015 (1): 65 - 72.

[9] Rashidian A, Muhammadnejad A, Dehpour AR, et al. Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NFκB signaling pathway [J]. Inflammotharmacology, 2016 (2): 1 - 10.

[10] Xiao H, Yang CS. Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention [J]. Int J Cancer, 2008 (5): 983 - 90.

[11] Lee A, Jung Y, Thanh T, et al. Paricalcitol attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial inflammation by regulating the NF-κB signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2016 (4): 1023 - 1029.

(2016-02-13 收稿，2016-07-01 修回)
中文编辑：吴昌学；英文编辑：刘　华