

辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子表达影响的初步研究

张 路¹, 吴宗贵^{1*}, 黄越承², 杨 平², 韩 玲²

(1. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003; 2. 海军医学系放射医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体表达的影响。方法: 将人脐静脉内皮细胞分为辛伐他汀组、TNF- α 组、辛伐他汀+TNF- α 组、IL-1 β 组、辛伐他汀+IL-1 β 组和空白对照组。采用免疫细胞化学方法, 观察 TNF- α 和 IL-1 β 对细胞中 VEGF 及其受体表达的影响, 并观察辛伐他汀的干预作用。结果: TNF- α 组和 IL-1 β 组的 VEGF 及其受体表达明显高于空白对照组($P < 0.05$), 辛伐他汀+TNF- α 组和辛伐他汀+IL-1 β 组表达分别明显低于 TNF- α 组和 IL-1 β 组($P < 0.05$)。结论: 辛伐他汀可以抑制炎症刺激导致的人脐静脉内皮细胞 VEGF 及其受体的表达。

[关键词] 血管内皮生长因子; 动脉粥样硬化; 人脐静脉内皮细胞; 辛伐他汀

[中图分类号] R 541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0626-03

Effects of simvastatin on expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells

ZHANG Lu¹, WU Zong-Gui^{1*}, HUANG Yue-Cheng², YANG Ping², HAN Ling² (1. Department of Cardiovasology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Radiology, Faculty of Navy Medicine, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of simvastatin on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods:** Cells were randomly divided into simvastatin group, tumor necrosis factor- α (TNF- α) group, simvastatin + TNF- α group, interleukin-1 β (IL-1 β) group, simvastatin + IL-1 β group and control group. The effects of TNF- α , IL-1 β and simvastatin on the protein levels of VEGF and its receptor in HUVEC were studied by immunocytochemistry. **Results:** The protein levels of VEGF and its receptor in TNF- α group and IL-1 β group were significantly higher than those of control group, and simvastatin decreased the protein levels of VEGF and its receptor in TNF- α group and IL-1 β group. **Conclusion:** Simvastatin can decrease the protein levels of VEGF and its receptor in HUVEC.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; atherosclerosis; human umbilical vein endothelial cells; simvastatin
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 626-628]

血管新生(angiogenesis)是动脉粥样硬化重要的病理学特征,其最重要的临床意义可能在于导致粥样斑块稳定性下降,引发不稳定性心绞痛、心肌梗死等严重心血管事件^[1,2]。目前其确切机制尚不清楚,但可以肯定的是血管内皮细胞增殖是其重要始动环节。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的惟一特异性促进血管内皮细胞增殖的生长因子,在血管新生过程中具有重要作用。血管新生同时也是动脉粥样硬化病理过程中炎症反应的重要表现,故某些炎症因子,如 TNF- α 和 IL-1 β ,可直接或通过促进 VEGF 表达影响血管新生^[3,4],进而有可能影响动脉粥样硬化进程。目前国内外关于 TNF- α 和 IL-1 β 对 VEGF 表达的体外实验报道很多^[5-7],但多集中于血管内皮细胞以外的细胞。此外,他汀类药物对动脉粥样硬

化进程的影响是近年心血管病研究热点,但他汀类药物对 VEGF 表达影响的研究报道很少^[8,9]。为此,本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),采用免疫细胞化学方法,观察 TNF- α 和 IL-1 β 对 VEGF 及其受体 Flk-1 表达的影响,及辛伐他汀(simvastatin)对此的干预作用,旨在探讨他汀类药物抗动脉粥样硬化作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器及药物 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 购自中国科学院上海生物化学和细胞研

[基金项目] 上海市科委基金资助项目(02DJ14018)。
[作者简介] 张 路(1972-),男(汉族),博士,主治医师。

*Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn

研究所, TNF- α 、IL-1 β 、RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶、细胞培养瓶、6孔细胞培养板均购自 Sigma 公司,小鼠抗人 VEGF 单抗购自 Santa Cruz 公司,兔抗人 VEGFR-2(Flk-1)单抗购自武汉博士德生物工程公司,其余试剂均为国产分析纯。乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,721型分光光度计为国营东方仪器厂产品,辛伐他汀原料药由默沙东制药有限公司提供,Smartscape 生物显微图像处理系统由上海复日公司出品。

1.2 细胞株的培养和鉴定 将人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 置 37℃、5% CO₂ 下培养。次日用 0.25% 胰蛋白酶消化传代、计数,以 5×10^5 /ml 的密度接种于 25 ml 培养瓶中,加 RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、2 mg 葡萄糖酰胺)。再分别接种于其他培养瓶,置 37℃、5% CO₂ 下培养,隔天换液 1 次,培养 24~48 h 即可用于实验。待 HUVEC 铺满瓶底后,在倒置显微镜下观察,2% 锥虫蓝染色。

1.3 实验细胞分组 将培养板中的细胞随机分为以下 6 组($n=6$):(1)空白对照组,不含任何干预因子的 HUVEC 悬液 1.0 ml,孵育 24 h;(2)辛伐他汀组,1.0 ml HUVEC 悬液与 1 μ mol/L 辛伐他汀共孵育 24 h;(3)TNF- α 组,1.0 ml HUVEC 悬液与 10 ng/ml TNF- α 共孵育 24 h;(4)辛伐他汀+TNF- α 组,1.0 ml HUVEC 悬液预先与 1 μ mol/L 辛伐他汀孵育 2 h,再加 10 ng/ml TNF- α 共孵育 24 h;(5)IL-1 β 组,1.0 ml HUVEC 悬液与 10 ng/ml IL-1 β 共孵育 24 h;(6)辛伐他汀+IL-1 β 组,1.0 ml HUVEC 悬液预先与 1 μ mol/L 辛伐他汀孵育 2 h,再加 10 ng/ml IL-1 β 共孵育 24 h。

1.4 HUVEC 培养上清液 LDH 活性测定 将培养的 HUVEC 接种于 6 孔板中,按上述各组处理后,最后收集培养上清液,采用常规生化法,测定各组 LDH 活性。

1.5 免疫细胞化学检查 将培养的 HUVEC 接种于含盖玻片的 6 孔板中,按上述各组处理后,取出盖玻片,PBS 洗 2 次后于 95% 乙醇中固定 30 min,取出晾干,分别利用小鼠抗人 VEGF 单抗和兔抗人 VEGFR-2(Flk-1)单抗行 VEGF 和 Flk-1 免疫细胞化学检查,DAB 显色。以 PBS 代替抗体作为阴性对照。请 2 位病理学专业人员将免疫细胞化学检查结果按强阳性、弱阳性和阴性进行分级。

1.6 统计学处理 各组培养上清液 LDH 活性采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,各组 VEGF 和 Flk-1 信号强度间比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 HUVEC 的观察 HUVEC 在倒置显微镜下观察,可见细胞呈多角形,折光性强,呈卵石样或星芒状排列,2% 锥虫蓝染色提示活细胞数大于 95%。

2.2 HUVEC 培养上清液 LDH 活性的测定 空白对照组、辛伐他汀组、TNF- α 组、辛伐他汀+TNF- α 组、IL-1 β 组和辛伐他汀+IL-1 β 组 HUVEC 培养上清液中的 LDH 活性(U/L)分别为 81.80 ± 2.68 、 82.74 ± 3.50 、 289.16 ± 8.27 、 171.35 ± 7.47 、 236.45 ± 6.64 、 147.87 ± 7.18 。空白对照和辛伐他汀组间 LDH 活性无显著差异($P > 0.05$),TNF- α 组和 IL-1 β 组 LDH 活性显著高于空白对照组($P < 0.05$),辛伐他汀+TNF- α 组、辛伐他汀+IL-1 β 组 LDH 活性分别显著低于 TNF- α 组、IL-1 β 组($P < 0.05$)。

2.3 免疫细胞化学结果 空白对照组和辛伐他汀组基本未见 VEGF 及 Flk-1 阳性表达,其他各组可见不同程度的 VEGF 及 Flk-1 阳性表达信号,主要沿细胞膜周围及细胞核分布。对各组细胞 VEGF 和 Flk-1 免疫化学染色信号强度进行分级,经统计学处理后结果表明辛伐他汀+TNF- α 组、辛伐他汀+IL-1 β 组 VEGF 及 Flk-1 阳性表达信号强度分别明显弱于 TNF- α 组、IL-1 β 组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组 VEGF、Flk-1 免疫细胞化学染色结果分析

Tab 1 Levels of VEGF/Flk-1 by immunocytochemistry

Group	Signal number of VEGF(n)			Signal number of Flk-1(n)		
	Strongly positive	Weakly positive	Negative	Strongly positive	Weakly positive	Negative
Control	0	0	6	0	0	6
Simvastatin	0	0	6	0	1	5
TNF- α	6	0	0	5	1	0
Simvastatin+TNF- α	1	5	0	1	5	0
IL-1 β	4	2	0	4	2	0
Simvastatin+IL-1 β	0	6	0	2	4	0

3 讨论

本研究结果显示,体外培养的 HUVEC 未见 VEGF 明确表达,而 TNF- α 或 IL-1 β 作用后 HUVEC 均呈现 VEGF 强表达,表明 TNF- α 和 IL-1 β 可一定程度地促进 VEGF 在 HUVEC 中的表达。进

一步研究结果显示,辛伐他汀联合 TNF- α 或 IL-1 β 作用后 VEGF 信号强度分别显著低于 TNF- α 组和 IL-1 β 组,而辛伐他汀组信号强度与空白对照组无显著差异,说明正常生理状态下辛伐他汀对 VEGF 表达无明确影响,但可一定程度抑制 TNF- α 和 IL-1 β 所造成的 VEGF 表达增强。相应地,各组 Flk-1 表达结果和 VEGF 是一致的,提示正常生理状态下辛伐他汀对 Flk-1 表达亦无明确影响,但可一定程度抑制 TNF- α 和 IL-1 β 刺激导致的 Flk-1 表达增强。

炎性反应是动脉粥样硬化病理过程中的重要机制,血管新生也是炎性反应的重要特征,炎性因子促进血管新生正是这一特征的具体表现。虽然 TNF- α 和 IL-1 β 对于血管内皮细胞的直接作用是导致其损伤,理论上似应抑制血管新生,但本研究结果提示 TNF- α 和 IL-1 β 促进 HUVEC 中 VEGF 表达,这和已有绝大多数研究的结果也是一致的^[3],因此可推测 TNF- α 和 IL-1 β 促进血管新生具有多重机制,其中部分是通过促进 VEGF 表达实现的。另一方面,由于 TNF- α 和 IL-1 β 同时促进 HUVEC 中 Flk-1 表达,我们推测 TNF- α 和 IL-1 β 的上述作用可能是由 VEGFR-2 即 Flk-1 所介导的,当然这还需要使用 Flk-1 拮抗剂干预后方能进一步证实。

近年来关于他汀类药物抗动脉粥样硬化的调脂外作用研究很多,增加斑块稳定性和抗炎反应是其中的重要内容。本研究结果提示辛伐他汀可一定程度抑制 TNF- α 和 IL-1 β 所造成的 VEGF 及其受体 Flk-1 表达增强。由于 VEGF 引起的血管新生可一定程度促进动脉粥样硬化之进程,降低斑块稳定性,故推测辛伐他汀可通过抑制 VEGF 及其受体 Flk-1 的表达达到稳定粥样斑块,延缓动脉粥样硬化进程的作用,已有部分他汀类药物抑制 VEGF 表达、抑制血管新生的报道^[8,10]。此外,TNF- α 和 IL-1 β 是两种重要的炎性因子,所以我们可推测辛伐他汀对 TNF- α 和 IL-1 β 所造成的 VEGF 及其受体 Flk-1 表达增强的拮抗作用可能也是其抗炎性反应的一种表现。

本研究结果还显示 TNF- α 组和 IL-1 β 组 LDH 活性显著高于空白对照组,而辛伐他汀+TNF- α 组,辛伐他汀+IL-1 β 组 LDH 活性分别显著低于 TNF- α 组、IL-1 β 组,提示 TNF- α 和 IL-1 β 对培养的

HUVEC 有直接的损伤作用,而辛伐他汀对 TNF- α 和 IL-1 β 的这种损伤有一定的保护作用。

[参考文献]

[1] Tenaglia AN,Peters KG,Sketch MH, *et al.* Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina[J]. *Am Heart J*,1998,135(1):10-14.

[2] O'Brien ER,Garvin MR,Dev R, *et al.* Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques[J]. *Am J Pathol*,1994,145(4):883-894.

[3] Oh H,Takagi H,Takagi C, *et al.* The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,1999,40(9):1891-1898.

[4] Bottomley MJ,Webb NJ,Watson CJ, *et al.* Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid[J]. *Clin Exp Immunol*,1999,117(1):171-176.

[5] El-Awad B,Kreft B,Wolber EM, *et al.* Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tuberlar cells[J]. *Kidney Int*,2000,58(1):43-50.

[6] Tsuji F,Matsuoka H,Aono H, *et al.* Effects of sulfhydryl compounds on interleukin-1-induced vascular endothelial growth factor production in human synovial stromal cells[J]. *Biol Pharm Bull*,2000,23(5):663-665.

[7] Cho CS,Cho ML,Min SY, *et al.* CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor[J]. *J Immunol*,2000,164(10):5055-5061.

[8] Wilson SH,Herrmann J,Lerman LO, *et al.* Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering[J]. *Circulation*,2002,105(4):415-420.

[9] 张路,吴宗贵.辛伐他汀对家兔动脉粥样硬化斑块血管内皮生长因子表达的影响[J]. *第二军医大学学报*,2004,25(5):560-562.

Zhang L,Wu ZG. Effects of simvastatin on vascular endothelial growth factor expression in rabbit aortic atherosclerotic plaques[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao(Acad J Sec Mil Med Univ)*,2004,25(5):560-562.

[10] Loic V,Claudine S,Farroch M, *et al.* Cerivastatin,an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase,inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors *in vitro* and angiogenesis in *in vivo* models [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2002,22(4):623-629.

[收稿日期] 2003-10-26

[修回日期] 2004-03-04

[本文编辑] 李丹阳