

阿托伐他汀对缺氧致人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用

叶武,毛威,华军益,刘艳(浙江省中医院心内科,杭州 310006)

摘要:目的 观察阿托伐他汀对缺氧导致人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的保护作用。方法 体外培养 HUVECs,建立缺氧模型,采用 MTT法测定细胞增殖,透射电子显微镜技术观察细胞的微观结构;检测细胞培养液中 LDH、NO、ET-1、AngII及 6-keto-PGF_{1α}水平。结果 阿托伐他汀能够促进缺氧 HUVECs的增殖,稳定细胞的微观结构,显著降低细胞内 LDH的释放及 ET-1的分泌($P < 0.01$),提高 NO、PGI₂的分泌($P < 0.01$)。结论 阿托伐他汀对缺氧导致 HUVECs损伤具有明显的保护作用。

关键词:阿托伐他汀;内皮细胞;缺氧

中图分类号:R972.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)04-0279-03

Protective effect of atorvastatin on cultured human umbilical vein endothelial cells injured by hypoxia

YE Wu, MAO Wei, HUA Jun-yi, LIU Yan(Department of Cardiology, Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of atorvastatin on cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) injured by hypoxia. **METHODS** Hypoxic models were established with cultured HUVECs, cell proliferation was determined with MTT method, ultrastructure of HUVECs were observed by electron microscope, levels of lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO), endothelin (ET), angiotension-II (Ang-II) and 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) in media were examined. **RESULTS** Atorvastatin could promote the growth of endothelial cells in hypoxic condition and lessen the damage induced by hypoxia, decrease release of LDH and secretion of ET-1 ($P < 0.01$), obviously; Otherwise, atorvastatin could significantly increase secretion of NO and PGI₂ ($P < 0.01$). **CONCLUSION** It is suggested that atorvastatin exert some protective effects on HUVECs injured by hypoxia.

KEY WORDS: atorvastatin; endothelial cells; hypoxia.

血管内皮细胞功能异常是动脉粥样硬化的早期环节,且有研究提示内皮细胞功能异常可能参与急性冠脉综合征的发病过程^[1]。阿托伐他汀是目前降低低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-C)作用最强的他汀类药物,最近 MIRACL研究证实早期应用阿托伐他汀,可以降低急性冠脉综合征患者再发性缺血事件的发生^[2],目前认为其作用机制除阿托伐他汀能够

有效调节血脂代谢外,可能还与其消除炎症、稳定和消退斑块、改善内皮功能等非调脂作用有密切关系。笔者通过观察阿托伐他汀对缺氧导致人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤及分泌血管活性物质的影响,尝试初步探讨阿托伐他汀改善血管内皮功能的部分机制。

1 材料与方法

1.1 HUVECs的培养及实验分组

HUVECs细胞株 ECV-304(中国预防医学科学院提供),用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(GIBCO 公司)置于 CO₂ 培养箱(Forma Scientific 产品)中培养,培养温度为 37℃,第 3~5 代用于实验,接种于 24 孔培养板(1×10⁵ 孔),换用无血清 DMEM(1mL/孔)液培养 12h 使细胞同步化,进行分组处理:①正常对照组:继续用无血清 DMEM 液培养 12h ②药物组:继续用含阿托伐他汀 50μmol/L(阿托伐他汀钙对照品由红惠制药有限公司惠赠,溶于二甲基亚砷中备用)的无血清 DMEM 液继续培养 12h ③缺氧模型组:于缺氧装置中用无血清 DMEM 液继续培养 12h ④缺氧+药物组:于缺氧装置中用含 50μmol/L 阿托伐他汀的无血清 DMEM 液继续培养 12h(缺氧装置参照文献^[3],持续通入 95% N₂-5% CO₂ 混合气体,多次抽气进行分析 PO₂<1.0kPa)。

1.2 MTT 法检测细胞增殖

培养后各孔细胞,加入 5mg/mL 的 MTT 继续培养 4h 吸弃上清夜,各孔加二甲基亚砷 150μL,室温避光震荡 10min 使结晶充分溶解后,上酶标仪(Ek800Q BioTek 公司),630nm 处测 A 值。

1.3 透射电镜观察

弃去上清夜,用 D-Hank 液洗涤、加 0.08% 胰蛋白酶(华美公司)消化、离心收集细胞、2.5% 戊二醛及 1% 四氧化锇固定、乙醇脱水、包埋、超薄切片、染色后,透射电镜下观察。

1.4 乳酸脱氢酶与血管活性物质检测

各组细胞均取上清夜分别检测乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、血管紧张素 II(AngII)及前列环素(PGI₂)的稳定代谢物 6-酮前列腺素(6-keto-PGF_{1α})。常规生化检测 LDH(HITACHI 7170A 自动生化分析仪);硝酸还原酶法检测 NO(试剂盒购自南京建成生物工程研究所);放免法检测 ET-1, AngII, 6-keto-PGF_{1α}(试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所)。实验操作均参照试剂盒说明进行。

1.5 统计学处理

实验结果均以均数±标准差表示,数据处理采用方差分析, P<0.05 统计学差异有显著性。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖水平

结果表明,缺氧模型组细胞增殖明显被抑制,与正常对照组相比有显著性差异(P<0.01);在缺氧环境下,加入阿托伐他汀(浓度为 50μmol/L),其细胞增殖过程则明显被促进,与缺氧模型组相比有显著性差异(P<0.05),与正常对照组比较已无统计学差异(P>0.05),见表 1。

2.2 透射电镜观察结果

表 1 阿托伐他汀对缺氧环境下 HUVECs 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of atorvastatin on the proliferation of HUVECs in the hypoxic condition($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HUVECs 增殖(A 值)
正常对照组	8	0.146 ± 0.018 [*]
药物组	8	0.150 ± 0.011 ^{**}
缺氧模型组	8	0.097 ± 0.023
药物低剂量组	8	0.133 ± 0.005 [#]

注:与缺氧模型组比较,^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01;与正常对照组比较,[#] P>0.05

Note compared with the hypoxia model group ^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01; compared with the normal control [#] P>0.05

正常对照组及药物组细胞形态正常,细胞核形态规则,核仁及线粒体等细胞器清晰,见图 1-A;缺氧模型组细胞体积缩小,细胞核形态不规则,核仁消失,部分细胞浆中有大小不一、数量不等的空泡形成,线粒体等细胞器形态模糊,见图 1-B 缺氧+药物组细胞体积缩小,但形态接近正常细胞,见图 1-C。

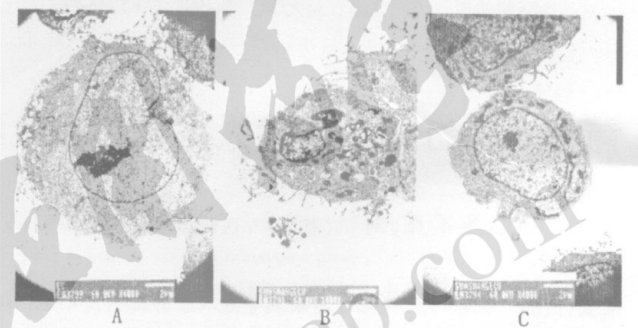


图 1 人脐静脉内皮细胞超微结构(×4000)

Fig 1 The ultrastructure of HUVECs(×4000)

2.3 各组 LDH, NO, ET-1, Ang-II 及 6-keto-PGF_{1α} 的检测水平与正常对照组比较,缺氧模型组 LDH 水平显著升高(P<0.01);而缺氧+药物组 LDH 水平明显降低,与缺氧模型组比较,有显著性差异(P<0.01),与正常对照组比较,无显著性差异(P>0.05);药物组与正常对照组比较亦无显著性差异(P>0.05)。

与正常对照组比较,缺氧模型组 NO, 6-keto-PGF_{1α} 水平显著降低(P<0.01); ET-1, Ang-II 水平显著升高(P 分别<0.01和 0.05)。缺氧+药物组 NO, 6-keto-PGF_{1α} 水平显著升高, ET-1 水平显著降低,与缺氧模型组比较,有显著性差异(P 分别<0.01); Ang-II 水平虽亦有降低,但与缺氧模型组比较,无显著性差异(P>0.05)。与正常对照组比较,缺氧+药物组 NO, 6-keto-PGF_{1α} 及 Ang-II 水平无显著性差异(P>0.05); ET-1 水平仍有显著性差异(P<0.01)。药物组与正常对照组比较 NO, ET-1, Ang-II 及 6-keto-PGF_{1α} 水平均无显著性差异(P>0.05),见表 2。

3 讨论

血管内皮细胞功能异常贯穿了动脉粥样硬化发生、发展的各个阶段,同时也是动脉粥样斑块破裂、血栓形成的促发因素之一。当内皮细胞受损时,导致内皮源性舒张和收缩因子的分泌不平衡,从而影响血管紧张度、粥样斑块稳定性及

表 2 阿托伐他汀对缺氧状态下 HUVECs释放 LDH, NO, ET-1, Ang-II 及 6-keto-PGF_{1α}的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of atorvastatin on the level of LDH, NO, ET-1, Ang-II and 6-keto-PGF_{1α} released by HUVECs in the hypoxic condition (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组 别	LDH (U/L)	NO(pg/mL)	ET-1 (pg/mL)	Ang-II (pg/mL)	6-keto-PGF _{1α} (pg/mL)
正常对照组	10.4 ± 3.57* *	3.86 ± 0.38* *	17.59 ± 3.84* *	108.32 ± 18.67*	206.39 ± 29.84* *
药物组	10.8 ± 2.7* * #	3.62 ± 0.43* * #	19.14 ± 4.42* * #	108.20 ± 18.08* #	223.11 ± 36.45* * #
缺氧模型组	26.5 ± 4.2	2.19 ± 0.29	63.32 ± 11.34	163.47 ± 65.86	101.37 ± 18.93
缺氧 + 药物组	12.8 ± 2.86* * #	3.87 ± 0.46* * #	24.36 ± 4.27* * ΔΔ	113.02 ± 45.45* #	181.20 ± 24.35* * #

注：与缺氧模型组比较，* P < 0.05, ** P < 0.01, + P > 0.05 ;与正常对照组比较，Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01, # P > 0.05

Note: compared with the hypoxia model group, * P < 0.05, ** P < 0.01, + P > 0.05; compared with the normal control, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01, # P > 0.05

血栓形成^[4]。而缺氧能够加速内皮细胞损伤,从而加重内皮功能的失调^[5],因此对缺氧内皮细胞的保护将阻止内皮功能的进一步恶化。

近年来,应用阿托伐他汀的大规模临床试验所获得的与降低 LDL-C不成比例的冠心病临床事件发生率与死亡率的显著下降,引起了医生对其调脂以外的抗动脉粥样硬化作用的重视。研究证实阿托伐他汀除调节血脂、消除炎症、消退和稳定斑块外,还与改善血管内皮细胞功能关系密切。为探讨阿托伐他汀改善血管内皮功能的机制,本实验观察阿托伐他汀对缺氧导致 HUVECs损伤及分泌血管活性物质的影响,通过和细胞增殖水平、LDH 检测和透射电镜观察发现,阿托伐他汀能够显著促进在缺氧状态下细胞的增殖活性,降低细胞内 LDH 的释放,稳定细胞的微观结构,提示阿托伐他汀对缺氧致内皮细胞损伤有明显的保护作用。而 HUVECs形态结构的完整性是维持正常功能的基础,进一步对 NO, ET-1, Ang-II 及 6-keto-PGF_{1α}等血管活性物质的检测发现,阿托伐他汀可以显著提高缺氧 HUVECs分泌 NO, PGI₂等舒血管因子,降低 ET-1 等缩血管因子的分泌,提示阿托伐他汀能够促

进缺氧内皮细胞的增殖,保护其结构完整,调节内皮源性舒、缩血管活性物质的分泌,这对于发挥内皮细胞维持血管稳态、防止血管痉挛及血栓形成有重要意义。

参考文献

[1] Huggins GS, Pastemak PC, Alpert NM, *et al*. Effects of short-term treatment of hyperlipidemia on coronary vasodilator function and myocardial perfusion in regions having substantial impairment of baseline dilator reserve [J]. Circulation, 1998, 98: 1291-1296.

[2] Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, *et al*. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes[J]. JAMA, 2001, 285: 1711-1718.

[3] 谢松,钱桂生,杨晓静.一种用于研究的经济实用缺氧小容器 [J].第三军医大学学报, 1998, 20(2): 92.

[4] de Meyer GR, Heman AG. Vascular endothelial dysfunction[J]. Prog Cardiovasc Dis, 1997, 39(4): 325-342.

[5] Maski K, Yuji T, Kenji I, *et al*. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(2): 797-804.