

洛伐他汀对氧化修饰低密度脂蛋白刺激 U937 细胞缺氧诱导因子-1 α 表达的影响

蒋国军¹, 张黎², 李铁军², 邱彦², 楼宜嘉³ (1 浙江萧山医院药剂科, 浙江 杭州 311201; 2 中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海 200433; 3 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

摘要 目的: 研究氧化修饰低密度脂蛋白 (ox-LDL) 刺激 U937 细胞表达缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的变化, 并观察洛伐他汀对其的影响。方法: 用油红染色的方法检测泡沫细胞的形成, 采用实时定量 PCR (Realtime PCR) 及蛋白印记杂交技术 (Western blotting) 检测细胞 HIF-1 α 表达的变化。结果: 未加 ox-LDL 刺激的 U937 细胞未见泡沫细胞形成; U937 细胞加入 ox-LDL 刺激 24 h 后, 全部转化为泡沫细胞。ox-LDL 刺激下, U937 细胞 HIF-1 α 表达量显著升高, 加入洛伐他汀后, HIF-1 α 的表达量显著降低, 随剂量增加, 抑制作用显著增强, 有明显的剂量依赖关系。结论: ox-LDL 氧化损伤导致巨噬细胞 HIF-1 α 高表达, 洛伐他汀可抑制 U937 细胞 HIF-1 α 的表达, 抑制泡沫细胞的形成。

关键词 洛伐他汀; 氧化修饰低密度脂蛋白; 缺氧诱导因子

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)03-0170-04

Effects of lovastatin on expression of hypoxia inducible factor 1 alpha on U937 cell induced by oxidized low density lipoprotein

JIANG Guojun¹, ZHANG Li², LITIE Jun², QUYan², LOUYijia³ (1 Department of Pharmacy, Zhejiang Xiaoshan Hospital, Hangzhou 311201, China; 2 School of Pharmacy, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3 College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT Objective To study the effects of expression of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) on U937 cell stimulated by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and the influence of lovastatin. **Methods** Foam cell formation was tested by oil red O-stain analysis and expression of HIF-1 α was measured by the method of Realtime PCR and Western blotting. **Results** Foam cell was not formed by U937 cell without ox-LDL stimulating. U937 cell with ox-LDL stimulating for 24 h was transformed to foam cell. After treated with ox-LDL, the expression of HIF-1 α was markedly increased on U937 cells. With the combined treatment of lovastatin ox-LDL, the expression of HIF-1 α was significantly decreased and this inhibitory effect was dose dependant. **Conclusion** Lovastatin could inhibit both the expression of HIF-1 α on U937 and the foam cell formation induced by ox-LDL.

KEY WORDS lovastatin; oxidized low density lipoprotein; hypoxia inducible factor 1

作为心脑血管疾病共同病理基础的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS), 一直是人们研究心脑血管疾病发病机制和寻找有效防治措施的突破口。AS 是一个慢性炎症过程, 包括细胞因子产生、内皮损伤、泡沫细胞形成等许多环节。普遍认为血浆中的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 及各种经修饰的 LDL 是引起 AS 的致病脂蛋白, 其中与发病关系最密切的是氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。目前研究表明缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) 在炎症

过程中起重要作用, 是炎症细胞功能的关键调节因子^[1], 可以促进炎症细胞浸润和活化, 可能会促进粥样斑块的发展^[2]。

3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂他汀类 (statins) 药物是临床上疗效确切的调血脂药和抗 AS 药, 目前研究表明他汀类药物在不降低高脂血症血浆脂蛋白情况下, 可减轻冠状动脉壁缺氧和滋养管血管生成^[3], 尤其是可抑制人血管内皮细胞和平滑肌细胞 HIF-1 表达^[4]。但他汀类药物、HIF-1 和 AS 的关系未见报道。本实验以人单核/巨噬细胞株 U937 为材料, 研究洛伐他汀体外对 ox-LDL 刺激 U937 细胞表达 HIF-1 α

的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器 垂直层流洁净工作台(上海净化设备有限公司, CA-1390); CO₂培养箱(美国 Forma公司); Rotor-gene 3000实时定量 PCR仪(Cobett Research公司); Powerbasic电泳仪、MP3蛋白电泳槽(美国 Bio-Rad公司); 杂交炉(美国 Pharmacia公司)。

1.2 材料 人类单核细胞株 U937(中科院上海细胞生物所); 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶等试剂(Invitrogen公司); RNA酶抑制剂、MMLV反转录酶体系(购于 promega公司); 细胞及组织总蛋白抽提试剂盒(KangChen KC-415); 免疫印迹化学发光试剂(ECL试剂)(上海普飞生物公司); 抗 HIF-1 α 抗体(Santa cruz公司)产品; 洛伐他汀(sigma公司)。

2 实验方法

2.1 人单核细胞株 U937的培养 从液氮罐中取出细胞冻存管, 迅速放入 37℃水浴锅中并充分摇动, 使其尽快融化, 用 75%酒精浸泡的棉球插拭消毒后, 用无菌吸管将细胞悬液移入离心管中, 加 5 mL完全细胞培养基(1640培养液添加 10% FBS), 缓慢混匀, 1 000 r/min离心 5 min, 去上清后用完全培养基重悬沉淀, 使用胎盘蓝染色计数后装入培养瓶中, 37℃和 5% CO₂条件下过夜培养, 次日换液, 以后按常规方法培养。

2.2 ox-LDL的制备 10 mg LDL于透析袋中, 置 20倍体积含 0.35 mmol/L EDTA的 0.9% NaCl溶液(pH7.4)中, 4℃条件下透析 24 h, 每 6 h换一次透析液。

2.3 泡沫细胞形成的量效及时效关系 ox-LDL加入 U937细胞中(1×10^6 cell/well), ox-LDL终浓度分别为 20、40、80、200 mg/L, 分别孵育 12、24、48 h后, 离心, 做油红染色。

2.4 洛伐他汀对 ox-LDL刺激 U937细胞 HIF-1 α 表达的影响 挑选生长状况良好的 U937细胞, 接种到 6孔培养板中(每孔细胞为 1×10^6 个), 使用新鲜的添加 5% FBS的 RMPD1640培养基, 37℃, 5% CO₂条件下过夜培养。24小时后按以下分组实验: 空白组(U937不加任何刺激), ox-LDL组(40 mg/L), 洛伐他汀 1×10^{-7} g/L组, 洛伐他汀 1×10^{-6} g/L组, 洛伐他汀 1×10^{-5} g/L组和洛伐他汀 1×10^{-4} g/L组。孵育 24 h后, U937细胞离心, 所得细胞分两部分: 抽提总 RNA后 Real-time PCR测 HIF-1 α mRNA

的表达和抽提蛋白后 Western blot测 HIF-1 α 蛋白的表达。

引物设计采用 Primer Premier 5.0软件, β -actin引物为 CCTGTACGCCAACACAGTGC/ATACCTCTCTGCTGCTGATCC, 产物长度为 211bp, HIF-1 α 引物为 GCCCTAACGTGTTATCTGTCTCG/TTGCTCCATTC-CATTCTGTTC, 产物长度为 245 bp。

2.5 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 ANOVA检验分析差异的显著性。

3 实验结果

3.1 泡沫细胞形成的量效及时效关系 20 mg/L ox-LDL 12 h基本无泡沫细胞形成, 孵育 24、48 h后可形成部分泡沫细胞(A1、B1、C1); 40 mg/L ox-LDL, 孵育 12 h后, 即有泡沫细胞形成, 24、48 h后 U937细胞完全转化为泡沫细胞, 细胞内红色脂肪滴非常明显(A2、B2、C2); 80 mg/L ox-LDL与 40 mg/L相似, 但 24、48 h有部分细胞出现凋亡(A3、B3、C3); 200 mg/L ox-LDL, 孵育 12 h后, 泡沫细胞形成并有部分细胞出现凋亡, 孵育 24、48 h后大部分细胞都不同程度出现凋亡(A4、B4、C4)。综上所述, 从剂量及时间双重角度考虑, 最终确定选择 ox-LDL终浓度为 40 mg/L, 孵育时间为 24 h, 结果见图 1。

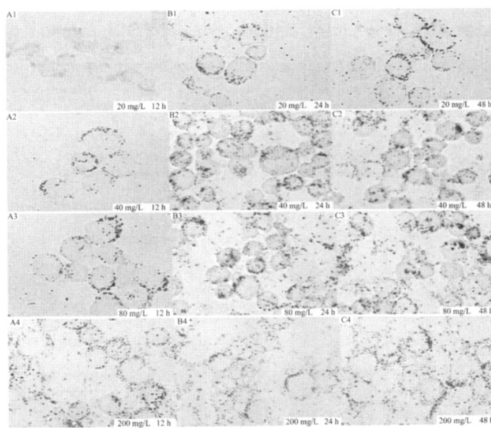


图 1 泡沫细胞形成的量效及时效关系

3.2 洛伐他汀对 ox-LDL刺激 U937细胞 HIF-1 α 表达的影响 Real-time PCR结果显示 ox-LDL刺激下, U937细胞中 HIF-1 α 表达量显著升高, 约为空白对照组的 3~4倍, 加入洛伐他汀后, HIF-1 α 的表达量显著降低, 随剂量增加, 抑制作用显著增强, 有明显的剂量依赖关系。Western blot实验结果与 Real-time PCR相似。结果见图 2、图 3。

4 讨论

近年来提出, AS可能是一种多因素引起的炎症反应。这些危险因素参与 AS的发病机制虽然尚未完全明了。但大量资料表明, 血浆 LDL 浓度升高, 尤其是 ox-LDL 是 AS的主要危险因素。越来越多的证据表明, 氧化应激、巨噬细胞大量摄取 ox-LDL 及泡沫细胞形成与 AS 发生发展密切相关^[5]。

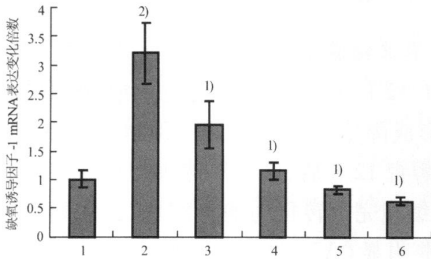


图2 Real-time PCR 检测洛伐他汀对 U937 细胞 HIF-1 α 表达的影响

- 1-空白对照; 2-氧化低密度脂蛋白;
3-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-7} g/L);
4-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-6} g/L);
5-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-5} g/L);
6-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-4} g/L);
1) $P < 0.01$, 与氧化低密度脂蛋白比较;
2) $P < 0.01$, 与空白对照比较。

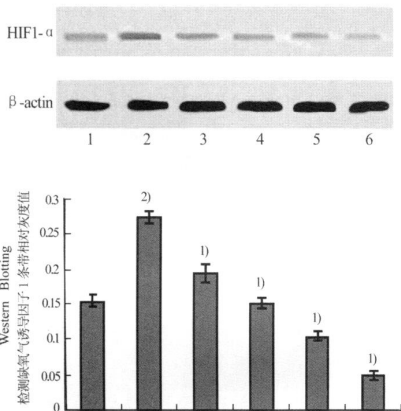


图3 Western blotting 检测洛伐他汀对 U937 细胞 HIF-1 α 表达的影响

- 1-空白对照; 2-氧化低密度脂蛋白;
3-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-7} g/L);
4-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-6} g/L);
5-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-5} g/L);
6-氧化低密度脂蛋白 + 洛伐他汀(1×10^{-4} g/L);
1) $P < 0.01$, 与氧化低密度脂蛋白比较;
2) $P < 0.01$, 与空白对照比较。

1992年, Semenza对经缺氧处理的 Hep3B和 HepG2 细胞株的核提取物进行电泳位移分析发现了一种与促红细胞生成素基因 3增强子特异性结合的蛋白质, 即 HIF-1^[6]。HIF-1由 α 亚基和 β 亚基组成的异二聚体, 其中 HIF-1蛋白是 HIF-1DNA 结合活性的主要决定因素, 是具有广泛作用的重要调节因子。HIF-1具有多种生物学效应, 这些生物效应反映在由缺氧诱导的靶基因的表达上。AS缺氧学说认为动脉壁氧的供需不平衡是诱发 AS的原因之一。目前有大量证据表明 AS斑块中的缺氧区是由于斑块厚度引起的氧扩散容量损伤及泡沫细胞的高氧耗所造成的。体内动脉壁确有缺氧区存在, 这也直接支持了 AS缺氧学说^[7]。近来有文献研究表明, 在人 MM6巨噬细胞中, ox-LDL 刺激可诱导 HIF-1 α 累积, 提示 HIF-1可能在 AS和 ox-LDL所致的病理状态中起作用^[8]。我们前期研究结果表明, 对 U937 细胞进行 RNA 干扰抑制 HIF-1 α 表达后, 可以下调与 AS密切相关基因的表达, 非常显著地抑制泡沫细胞的形成^[9]。

他汀类药物为 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 主要药理作用是抑制胆固醇合成, 为临床最常用的调血脂药物。近年来, 人们逐渐认识到 AS是一种炎症疾病, 而临床他汀类应用获得了极大益处, 提示其尚具有抗炎作用^[10]。他汀类药物因能降低血脂, 减少脂质浸润和泡沫细胞形成, 对延缓 AS病例进程非常有利; 该类药物降低高脂血症患者血清内皮粘附分子水平, 并可调节白细胞粘附分子的表达和细胞因子的生成, 长期应用可延缓 AS进展, 甚至可使粥样硬化病灶缩小或消退。实验证明, 对于那些无论有无冠心病或有无高胆固醇血症的患者, 他汀类药物均可使冠状动脉事件的相对危险性减少 30%^[11]。

基于上述机制以及洛伐他汀可轻度减少单核细胞的巨噬细胞抗原复合物 1 (macrophage antigen compound-1, MAC-1) 表达, 并使 MAC-1 依赖的单核细胞对内皮细胞的粘附降低。本研究选用洛伐他汀作进一步相关研究。应用人单核细胞株 U937 体外模型, 检测了洛伐他汀对 HIF-1 α 表达的影响。前期实验结果表明, 对 U937 进行 RNA 干扰抑制 HIF-1 α 表达后, 可以非常显著地抑制泡沫细胞形成, 而洛伐他汀可显著抑制 U937 细胞中 HIF-1 α 表达, 这可能是其防治 AS作用机制之一, 但其具体作用机制及分子传导途径有待进一步研究。

参考文献:

transcription factor HIF-1 α : critical regulation of inflammatory cell function [J]. *Cell cycle* 2003, 2(3): 192

[2] Cramer T, Yamashita Y, Clausen BE, *et al* HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation [J]. *Cell* 2003 112(5): 645.

[3] Dichtl W, Dulak J, Frick M, *et al* HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 23(1): 58

[4] Wilson SH, Hermann J, Lemann 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.

[5] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34): 20963

[6] Semenza GL, Agani F, Feldser D, *et al* Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology common human diseases [J]. *Adv Exp Med*

Biol 2000 475 123

[7] Björnheden T, Levin M, Ewaldsson M. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19(4), 870.

[8] Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J *et al* Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) accumulation via redox-dependent mechanisms [J]. *Blood*, 2003 101(12): 4847.

[9] Jiang G, Li T, Qiu Y, *et al* RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro [J]. *Eur J Pharm*, 2007 562(3): 183

[10] Rilker PM. Inflammatory biomarkers, statins, and the risk of stroke: cracking a clinical conundrum [J]. *Circulation* 2002 105(22): 2583.

[11] 杨胜利, 薛爱英, 刘惠亮. 他汀类药物抗炎作用研究进展 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2006, 15(4): 409.

收稿日期: 2008-06-03

(上接第 166 页)

[6] Föhn O, Kopka J, Domann P, *et al* Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. *Nat Biotechnol* 2000 18(11): 1157.

[7] Robosky LC, Robertson DG, Baker JD, *et al* In vivo toxicity screening programs using metabolomics [J]. *Comb Chem High Throughput Screen* 2002, 5(8): 651.

[8] Heijne WH, Kienhuis AS, van Ommen B, *et al* Systems toxicology: Applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology [J]. *Expert Rev Proteomics* 2005, 2 767

[9] Williams RE, Lock EA. Sodium benzoate attenuates d-serine induced nephrotoxicity in the rat [J]. *Toxicology*, 2005, 207(1): 35

[10] D Silva C, Williams CH, Massey V. Electrophilic amination of a single methionine residue located at the active site of d-amino acid oxidase by O-(2,4-dinitrophenyl) hydroxylamine [J]. *Biochemistry*, 1986 25(19): 5602

[11] Piñne MS. d-Amino acid oxidase new findings [J]. *Cell Mol Life Sci* 2000, 57(12): 1732

[12] Slim RM, Robertson DG, Ajbassan M, *et al* Effect of dexamethasone on the metabolomics profile associated with phosphodiesterase inhibitor-induced vascular lesions in rats [J]. *Toxicol Appl Res* 2003 183(2): 108

[13] 彭双清, 廖 艳, 颜贤忠. 药物毒性作用机制的代谢

组学研究 [J]. *毒理学杂志*, 2005 19(3): 175

[14] Soga T, Baman R, Suenatsu M, *et al* Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption [J]. *J Bio Chem*, 2006, 281(24): 167.

[15] Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, *et al* Contemporary issues in toxicology: the role of metabolomics in toxicology and its evaluation by the COMET project [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 187(3): 137.

[16] Lindon JC, Keun HC, Ebbs TM, *et al* The Consortium for Metabolomic Toxicology (COMET): aims, activities and achievements [J]. *Pharmacogenomics* 2005, 6(7): 691

[17] Bollard AW, Keun HC, Beckonert O, *et al* Comparative metabolomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, 204 135

[18] Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, *et al* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations [J]. *Nat Biotechnol* 2001, 19 45

[19] Li L, Sun B, Yan XZ, *et al* Metabolomics study on the toxicity of Her Shun-Pian: the processed lateral root of *Aconitum carmichaeli* Debx (Ranunculaceae) [J]. *J Ethnopharmacology*, 2008 110 1.

[20] 赵剑宇, 颜贤忠, 彭双清. 关木通肾毒性的代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 725

收稿日期: 2009-02-23