

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.06.002

辛伐他汀对脂多糖刺激人脐静脉内皮细胞 Tribbles 表达的影响

窦姗姗¹ 邓景惕² 高文明^{1△}⁽¹⁾ 济宁医学院基础与法医学院, 山东 济宁 272067; ⁽²⁾ 山东大学医学院, 山东 济南 250012

摘要 **目的** 研究脂多糖(LPS)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)肿瘤坏死因子(TNF- α)和 Tribbles mRNA 表达变化及辛伐他汀对其表达的影响。**方法** 实验分为 12h 组和 24h 组, 各组又分为空白对照组、脂多糖(100ng/ml)组、辛伐他汀(5 μ g/ml)组、辛伐他汀(5 μ g/ml)和脂多糖(100ng/ml)共作用组, 用实时荧光定量 PCR 测定 LPS 刺激后 12h 和 24h HUVECs TNF- α 和 Trb1、Trb2 及 Trb3 的 mRNA 表达变化。**结果** 与对照组相比, 脂多糖组 TNF- α 、Trb1 及 Trb3 的 mRNA 表达均明显增加($P_{\text{组}} < 0.05$); 与脂多糖组相比, 辛伐他汀和脂多糖共作用组 TNF- α 、Trb1 及 Trb3 的 mRNA 表达均明显降低($P_{\text{组}} < 0.05$)。**结论** 辛伐他汀可抑制 HUVECs 的 TNF- α 、Trb1 及 Trb3 的表达。

关键词 辛伐他汀; 脂多糖; Tribbles; 肿瘤坏死因子; 人脐静脉内皮细胞

中图分类号: R543.5 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)03-156-04

The effect of simvastatin on the expression of tribbles in HUVECs with LPS treatment

DOU Shan-shan, DENG Jing-ti, GAO Wen-ming

(College of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To explore the expression of TNF- α and Tribbles mRNA in HUVECs with LPS treatment and the effect of simvastatin on them. **Methods** HUVECs were cultured and divided into the following experimental groups: control group, LPS group(100ng/mL), simvastatin group(5 μ g/mL), and LPS(100ng/mL) + simvastatin(5 μ g/mL) group for 12h and 24h respectively. The expression of TNF- α , Trb1, Trb2, Trb3 mRNA in HUVECs with LPS treatment after 12h and 24h was measured using real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the control groups, the expression of TNF- α , Trb1 and Trb3 mRNA was significantly increased in LPS groups ($P < 0.05$). However, the expression of TNF- α , Trb1 and Trb3 mRNA was statistically decreased in LPS and simvastatin groups compared with LPS groups, ($P < 0.05$). **Conclusion** Simvastatin could inhibit the expression of TNF- α , Trb1, Trb3 in HUVECs induced by LPS.

Key words: Simvastatin; Lipopolysaccharides; Tribbles; TNF- α ; Human umbilical vein endothelial cells

在西方发达国家动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种主要的死亡原因, 随着我国人民生活水平提高, 该病也成为我国的一种主要死亡原因。AS 是动脉壁的一种炎症性疾病, 是血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、单核细胞和炎症介质相互作用的结果^[1]。这一慢性炎症过程的第一步是内皮功能紊乱。血管内皮细胞具有一系列重要功能, 如内分泌功能、屏障功能、接受及传递信息和抗黏

附性等。血液中的异常物质如 ox-LDL 可直接影响内皮细胞, 刺激内皮细胞分泌多种细胞因子, 加剧动脉粥样硬化。

脂多糖是(Lipopolysaccharides, 简称 LPS)一种炎症刺激物, 可激活内皮细胞, 活化 MAPK 及 NF- κ B 等信号传导途径, 使内皮细胞分泌各种细胞因子^[2]。MAPK 活化后可使胞浆和胞核中的转录因子磷酸化而活化, 导致目标基因的表达, 参与各种生物反应。

Tribbles 是最近在果蝇体内发现的与细胞增

△ [通信作者] 高文明, Email: ppc32960@yahoo.com.cn

殖和形态发生相关的一种基因^[3]。在哺乳动物体内有 3 种 Tribbles 基因家族成员: Trb1, Trb2, Trb3^[4]。Tribbles 在果蝇形态发生过程中调节 string 的表达, string 的表达与有丝分裂的进程相联系, Tribbles 可阻滞有丝分裂^[5]。有研究显示 MAPK 可调节 string 的表达, Tribbles 与 MAPK 之间存在联系。

Tribbles 和 LPS 都与 MAPK 联系, 而两者在 HUVECs 中是否有关系, Tribbles 的表达变化对 LPS 刺激的 HUVECs 有何影响是一个未知问题。

本实验应用分离培养的 HUVECs, 选用 LPS 作为刺激因素, 辛伐他汀作为保护因素, 检测 LPS 刺激人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, 简称 HUVECs)后炎症因子 TNF- α 及 Trb-1、Trb-2、Trb-3 的 mRNA 表达, 和辛伐他汀对其表达的影响, 推测 Tribbles 在激活的 HUVECs 中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药物

胎牛血清(Gibco)、青霉素、链霉素(Sigma)、一抗(兔抗人Ⅷ因子单克隆抗体)、生物素标记的二抗(羊抗兔 IgG)(武汉博士德公司)、DMEM、胶原酶 I 型、胶原(Gibco)、辛伐他汀、LPS(Sigma); RNeasy Mini Kit(Qiagen, West Sussex); 反转录 cDNA 试剂盒(Invitrogen); 引物序列号 Trb1 为 Hs00179769、Trb2 为 Hs00222224、Trb3 为 Hs00221754、TNF- α 为 Hs00174128(Applied Biosystems)。

1.2 细胞培养

参照文献^[6]的方法加以改进。取新鲜的脐带(山东大学齐鲁医院提供, 离体时间 <6 h, 已经产妇同意)20cm 左右, 冲洗干净, 灌入配制的 0.1% 胶原酶约 20ml, 消化 12min, 然后用离心得到的细胞加入 DMEM 培养液、20% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml(调整 pH 值至 7.2), 细胞密度约为 2×10^5 /ml, 用胶原包被的 25ml 培养瓶接种, 过 24h 观察内皮细胞贴壁, 换液, 然后每 3d 换液 1 次, 7d 细胞长满瓶底, 进行传代。取 2~3 代细胞进行分组实验。

1.3 细胞鉴定

采用形态学及Ⅷ因子相关抗原免疫酶 SABC 法 DAB 显色鉴定^[6-7]。

1.4 分组实验

将同一条脐带得到的 2~3 代细胞随机分为 12h、24h 两组, 然后分别用 2 个 6 孔板接种, 每板 4 孔, 分别为: 1) 空白对照组, 无血清培养液, 作对照; 2) LPS 组(100ng/ml), 只添加 LPS; 3) 辛伐他汀(5 μ g/ml)组, 只添加辛伐他汀; 4) 辛伐他汀(5 μ g/ml)和 LPS(100ng/ml)共作用组, 加入辛伐他汀先处理 8h 后再加入 LPS 共同作用。每板作用 12h、24h, 然后吸去上清液, 将培养板中的细胞储存于 -80℃ 备用做实时荧光定量 PCR。实验重复 6 次。

1.5 总 RNA 的抽提

按照 RNeasy Mini Kit(Qiagen, West Sussex, UK)试剂盒说明进行操作, 每孔获得 2~3 μ g RNA。

1.6 反转录

配制反转录的混合液, 加入 RNA 2~3 μ g、20 μ mol/L random primer 1 μ l、无 RNA 酶的 H₂O 6 μ l、RNA 酶抑制剂 1 μ l 和 2.5mmol/L dNTP 混合液 4 μ l, 混合液在 PCR 分析仪中按程序进行: 25℃ 10min, 37℃ 120min, 80℃ 15s, 得到 cDNA, 在 -80℃ 进行保存。

1.7 实时荧光定量 PCR

配制 realtime-PCR 反应液, 加入 TaqMan buffer 10 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, 引物 1.0 μ l 和纯水 7.0 μ l。溶液置于 RealtimePCR 仪上进行反应, 检测位点的反应条件为 50℃ 2 min, 95℃ 10 min, 95℃ 15 min 达到 40 个循环。结果分析时以 18s 为内参照。

1.8 统计学处理

所得数据采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果

HUVECs 的一般生长形态见图 1。倒置显微镜下可见到, 细胞单层均匀生长, 形态呈鹅卵石状或菊花状排列。用Ⅷ因子相关抗原的免疫酶 SABC 法 DAB 显色鉴定结果见图 2。倒置显微镜下可见到胞浆中布满棕黄色阳性反应物质, 证实得到的为内皮细胞。

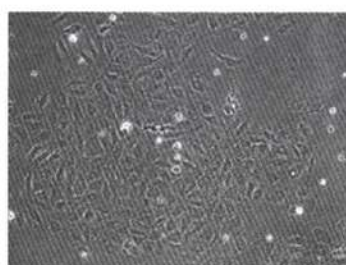


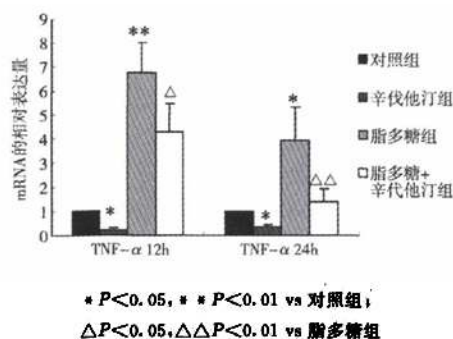
图1 HUVECs 光镜观察结果(X100)



图2 HUVECs 光镜观察结果(SABC X200)

2.2 TNF- α 的 mRNA 表达

与对照组相比, LPS 组 TNF- α mRNA 的表达在 12h、24h 均明显增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 辛伐他汀组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS 和辛伐他汀共作用组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 3。

图3 TNF- α 的 mRNA 表达

2.3 Trb1 的 mRNA 表达

与对照组相比, LPS 组 Trb1 mRNA 的表达在 12h、24h 均明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 辛伐他汀组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS 和辛伐他汀共作用组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 4。

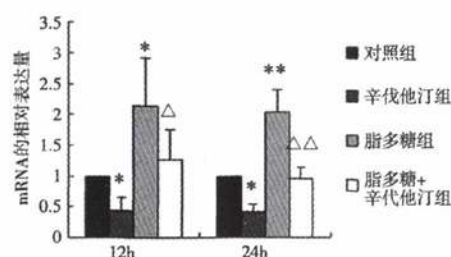


图4 Trb1 的 mRNA 表达

2.4 Trb3 的 mRNA 表达

与对照组相比, LPS 组 Trb3 mRNA 的表达在 12h、24h 均明显增加 ($P < 0.05$), 辛伐他汀组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS 和辛伐他汀共作用组在 12h、24h 的表达均明显减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 5。

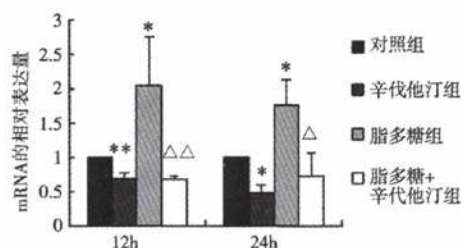


图5 Trb3 的 mRNA 表达

3 讨论

TNF- α 是一种促炎症细胞因子, 刺激内皮细胞后可使其释放某些炎症介质, 表达黏附分子, 促进白细胞和内皮细胞的黏附, 加剧炎症的发展^[8]。本实验结果显示, 与对照组相比, LPS 组的 TNF- α mRNA 表达均明显增加, 辛伐他汀组的 TNF- α mRNA 表达均明显减少; 与 LPS 组相比, 辛伐他汀和 LPS 共作用组的 TNF- α mRNA 表达均明显减少; 说明 LPS 具有致炎作用, 辛伐他汀可抑制 TNF- α 的表达, 具有抗炎作用。

本实验应用 LPS 刺激 HUVECs 后, 与对照组相比, LPS 组的 Trb1 和 Trb3 mRNA 表达明显增加。说明 LPS 促进了 Trb1 和 Trb3 的表达。

内皮细胞被脂多糖激活时, 启动了胞内信号传导途径, 3 条主要的信号传导途径可被激活, 分别

为 NF- κ B, MAPK, PI3k/Akt 信号传导途径。MAPK 酶促级联反应分为 MAPKKK, MAPKK, MAPK 三级。MAPK 活化后,胞浆和核内的转录因子如活化蛋白-1(activating protein-1,简称 AP-1)被磷酸化活化,导致生物反应中某些靶基因的表达。

在酵母 2 杂交系列中 MEK1 与 Trb1 和 Trb3 可相互作用,MKK7 与 Trb3 和 MKK4 与 Trb1 可特异性的相互作用^[9]。此研究说明 Tribbles 通过与 MAPKK 结合可调节 MAPK 的活化。

另有研究发现全长度的 Trb3 可阻止 Akt 的磷酸化^[10]。Akt 是一种丝/苏氨酸激酶,由磷脂酰肌醇 3 激酶途径激活,对细胞分化、凋亡和增殖中有重要的调节作用,可以抑制细胞凋亡,并且促进增殖^[11]。同时,Trb3 的过表达可促进人单核细胞源性巨噬细胞的凋亡^[12]。

综上所述,Tribbles 过表达时抑制细胞的有丝分裂,促进细胞的凋亡。推断 Tribbles 可通过调节 MAPKK 影响 MAPK 的信号传导途径,而且也可影响 Akt 信号传导途径。

在本实验中,推测是由于 LPS 激活了 MAPK 信号传导途径,反馈性的使 Trb1 和 Trb3 高表达,作用于 MAPKK,抑制了 MAPK 活化,促进 HUVECs 的凋亡。

在 Tribbles 的 mRNA 表达结果中,与对照组相比,辛伐他汀组的 Trb1 和 Trb3 mRNA 表达明显减少;与 LPS 组相比,LPS 和辛伐他汀共作用组的 Trb1 和 Trb3 mRNA 表达明显减少。可见,辛伐他汀抑制了 Trb1 和 Trb3 的表达,因此,推测辛伐他汀保护 HUVECs,抑制 HUVECs 凋亡。

虽然 Trb2 可影响 MAPKK,促进细胞的凋亡,但是在本实验中,各组的 Trb2 mRNA 表达无明显变化。

某些细胞炎症因子基因的表达有 MAPK 和 NF- κ B 的参与。研究表明,在炎症过程中 AP-1 可调节 T 细胞的分化,调节免疫应答,影响炎症介质的释放^[13]。Trb1 的过表达可以抑制 IL-8 刺激的 HeLa 细胞中 NF- κ B 和 AP-1 的基本活动。在 293 细胞中,依赖 NF- κ B 途径的基因活化可被 Trb3 抑制^[14]。

因此,Tribbles 的表达改变可能影响血管内皮

细胞的凋亡和其中炎症因子的表达,从而参与动脉粥样硬化的发生和发展。但是 Tribbles 作用的具体机制还不清楚。所以,Tribbles 的具体作用值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl J Med,1999,340(2):115-126.
- [2] Shauna M D, Aly K. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells[J]. Laboratory Investigation,2006,86(1):9-22.
- [3] Juan M, Silvia C, Anne E, et al. Tribbles Coordinates Mitosis and Morphogenesis in Drosophila by Regulating String/CDC25 Proteolysis[J]. Cell,2000,101(5): 511-522.
- [4] Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles; novel regulators of cell function; Evolutionary aspects[J]. Cell Mol Life Sci,2006,63(14):1632-1641.
- [5] Thomas C S, Maria L. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation[J]. Current Biology,2000,10(5):623-629.
- [6] Jaffe E A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. Cell Biol,1973,52(11):2745-2756.
- [7] Jaffe E A, Hoyer I W, Nachman R L. Synthesis of von Willebrand Factor by Cultured Human Endothelial Cells [J]. PNAS,1974,71(5):1906-1909.
- [8] Robert K, Susanne Z, Teake K, et al. Cytokines and atherosclerosis; a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovascular Research,2008,79(5):360-376.
- [9] Endre K T, Stephanie M B, Hye Y S, et al. Human Tribbles, a Protein Family Controlling Mitogen-activated Protein Kinase Cascades [J]. Biological Chemistry, 2004, 279 (41): 42703-42708.
- [10] Keyong D, Stephan H, Rohit N K, et al. TRB3; A tribbles Homolog That Inhibits Akt/PKB Activation by Insulin in Liver[J]. Science,2003,300(6):1574-1577.
- [11] Karleen M N, Neil G A. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy[J]. Cellular Signalling, 2002 (5),14:381-395.
- [12] Shang Y Y, Wang Z H, Zhang L P, et al. TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis[J]. The FEBS Journal,2009,276(4):2752-2761.
- [13] Rainer Z, Robert E, Clemens S, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease [J]. Arthritis Research & Therapy,2008,10(1):201-210.
- [14] Wu M, Xu L G, Zhai Z, et al. SINK Is a p65-interacting negative regulator of NF- κ B dependent transcription [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (29): 27072-27079.

(收稿日期 2011-04-17)