

· 实验研究 ·

# 氟伐他汀对人脐静脉内皮细胞的保护作用

刘芳<sup>1</sup>, 丁翊<sup>1</sup>, 周春蕾<sup>2</sup>

1. 解放军第四五四医院干部病房, 江苏 南京 210002; 2. 解放军第四五四医院航空医学科, 江苏 南京 210002

**摘要:** **目的** 研究氟伐他汀(Flu)对醛固酮环境下人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖、凋亡的影响及其可能的机制。**方法** 体外培养 HUVEC 细胞,分别以 25、50、100 nmol/L 醛固酮干预 HUVEC 细胞 24 h,细胞计数试剂盒(CCK-8)测定细胞增殖活力。以 100 nmol/L 醛固酮干预细胞 6、12、24 h,CCK-8 测定细胞增殖活力。100 nmol/L 醛固酮加不同浓度 Flu( $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  mmol/L)干预细胞 24 h,CCK-8 测定细胞增殖活力。在此基础上,100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,以不同浓度 Flu( $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-6}$  mmol/L)及加用细胞外信号调节激酶通路抑制剂 PD98059(ERK1/2 抑制剂)干预细胞,CCK-8 测定细胞增殖、流式细胞术测定细胞凋亡。**结果** 醛固酮可抑制内皮细胞的增殖活力,并呈浓度依赖性和时间依赖性。100 nmol/L 醛固酮干预细胞 24 h 可明显抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡。 $10^{-6}$  mmol/L Flu 可促进醛固酮环境下细胞增殖、抑制细胞凋亡,并且其作用可被细胞外信号调节激酶通路抑制剂 PD98059 阻断。**结论** 醛固酮可以抑制人脐静脉内皮细胞的增殖、促进其凋亡,Flu 可减轻醛固酮抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用,其作用可被 ERK/Z 抑制剂阻断。

**关键词:** 醛固酮; 人脐静脉内皮细胞; 氟伐他汀; 增殖; 凋亡

**中图分类号:** R-33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0675-04

## Protective effect of fluvastatin on human umbilical vein endothelial cells

LIU Fang\*, DING Yi, ZHOU Chun-lei

\* Cadre ward, Chinese PLA 454 Hospital, Nanjing, Jiangsu 210002, China

Corresponding author: ZHOU Chun-lei, E-mail: zhouchunlei1970@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of fluvastatin (Flu) on the proliferation and apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated by aldosterone and its potential mechanism. **Methods** HUVECs incubated in vitro were respectively treated by 25, 50, 100 nmol/L of aldosterone for 24 hours respectively, or by 100 nmol/L of aldosterone for 6, 12, 24 h respectively, or by  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  mmol/L of Flu after treatment with 100 nmol/L of aldosterone; after being treated by 100 nmol/L of aldosterone for 24 hours followed by  $10^{-6}$  mmol/L of Flu, the extracellular signal regulated kinase pathway 1/2 (ERK1/2) inhibitor-PD98059 was added to intervene. The cell counting kit-8 (CCK-8) and flowcytometry were used to respectively detect the cell proliferation and cell apoptosis. **Results** Aldosterone can inhibit the proliferation activity of HUVECs with concentration-dependent manner and time-dependent manner. Compared with pre-treatment, after being treated with 100 nmol/L of aldosterone for 24 hours, the cell proliferation was significantly inhibited, and cell apoptosis significantly increased, however,  $10^{-6}$  mmol/L of Flu can promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis, but the effect of Flu can be antagonized by ERK1/2 inhibitor-PD98059. **Conclusion** Aldosterone can inhibit HUVECs proliferation and promote HUVECs apoptosis, while Flu can decrease the effects caused by aldosterone, but the effects of Flu can be antagonized by PD98059.

**Key words:** Aldosterone; Human umbilical vein endothelial cells; Fuvastatin; Proliferation; Apoptosis

肾素-血管紧张素-醛固酮系统在维持人体内环境稳定及调节血压方面起着至关重要的作用<sup>[1]</sup>。醛固酮是肾素-血管紧张素-醛固酮系统的重要成

员。越来越多的证据证实,醛固酮参与动脉粥样硬化的发生过程<sup>[2-3]</sup>,但醛固酮的具体作用机制尚不明确。氟伐他汀(Flu)属于羟甲基戊二酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶抑制剂之一,是经典的降血脂药物,它能够通过影响甲羟戊酸等一系列中间产物的产生,影响细胞外信号向胞内的传递,从而影响细胞的多种功能<sup>[4]</sup>。大量

的研究表明他汀类药物的许多药理作用与其降胆固醇效应无关,这些作用也称为“非降脂相关的心血管保护作用”,主要包括抗氧化作用,改善血管内皮细胞功能,抗炎作用,抑制神经体液系统活性,提高动脉血管的顺应性等<sup>[5]</sup>。本实验通过醛固酮诱导内皮细胞损伤,研究氟伐他汀对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)增殖、凋亡的影响。

## 1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC 购自上海北诺生物科技有限公司,Flu(粉剂)北京诺华制药有限公司馈赠;醛固酮(美国 sigma),完全培养基为 DMEM 培养基、10% 胎牛血清、青霉素 100 U/L、链霉素 100 U/L(美国 Gibco);细胞计数试剂盒(CCK-8)(东京同仁化学);细胞外信号调节激酶通路(ERK1/2)抑制剂 PD98059(美国 CST);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人脐静脉内皮细胞株置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养。将细胞以 10<sup>4</sup> 个/ml 接种在 6 孔板,细胞贴壁融合达 70%~80% 时,更换为无血清 DMEM 培养液同步化 24 h。每次实验均采用同一代细胞,不同批次细胞重复实验 3 次。

1.2.2 0、25、50、100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h 后细胞增殖活力测定 以不含醛固酮的完全培养基作为对照组,其余用含有 0、25、50、100 nmol/L 醛固酮的完全培养基处理细胞 24 h 后,96 孔板中每孔加入 CCK-8 液 20 μl,继续在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下孵育 4 h,酶标仪 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值,测定细胞增殖活力。

1.2.3 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 6、12、24 h 后细胞增殖活力测定 用含有 100 nmol/L 醛固酮的完全培养基处理细胞 6、12、24 h 后,细胞计数试剂盒(CCK-8)测定细胞增殖活力。

1.2.4 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,不同浓度 Flu(10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mmol/L)干预后细胞活力测定 以不含醛固酮的完全培养基作为对照组,用含有 100 nmol/L 醛固酮的完全培养基处理细胞,同时予 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mmol/L Flu 干预 24 h,细胞计数试剂盒(CCK-8)测定细胞增殖活力。

1.2.5 Flu、细胞外信号调节激酶通路(ERK1/2)抑制剂 PD98059 干预下,100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,细胞增殖活力测定 以不含醛固酮的完全培养

基作为对照组,用含有 10 nmol/L 醛固酮的完全培养基处理细胞,同时予 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 或 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu + 20 μmol/L PD98059 干预 24 h,细胞计数试剂盒(CCK-8)测定细胞增殖活力。

1.2.6 Flu、PD98059 干预下,100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,细胞凋亡测定 同 1.2.5 方法处理细胞 24 h,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化并收集细胞,PBS 洗涤,Annexin V/PI 染色后流式细胞术检测细胞凋亡。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较进行方差分析及两两比较的 *q* 检验,两两比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

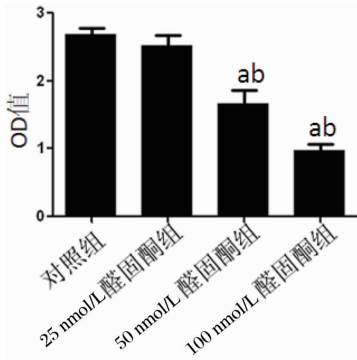
## 2 结果

2.1.1 25、50、100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h 后细胞增殖活力测定 以 0 nmol/L 醛固酮组为对照组,随着醛固酮浓度的增加,细胞增殖活力下降[25、50、100 nmol/L 醛固酮组 OD 值分别(2.521 ± 0.355)、(1.670 ± 0.474)、(0.980 ± 0.199)],并呈现浓度依赖性,组间差异有统计学意义(*F* = 15.936, *P* < 0.01)。见图 1。

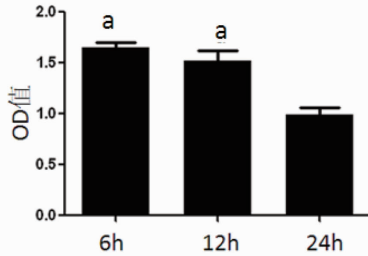
2.1.2 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 6、12、24 h 后细胞增殖活力测定 随着处理时间的增加,细胞增殖活力下降[6、12、24 h 组 OD 值分别(1.652 ± 0.110)、(1.516 ± 0.255)、(0.990 ± 0.164)],并呈现时间依赖性,组间差异有统计学意义(*F* = 10.676, *P* < 0.05)。见图 2。

2.1.3 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,不同浓度 Flu 对内皮细胞增殖活力影响 与 100 nmol/L 醛固酮组[OD 值(1.071 ± 0.335)]比较,10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 干预组[OD 值(1.741 ± 0.256)]可增加细胞增殖活力,差异有统计学意义(*P* = 0.001)。而 10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> mmol/L Flu 干预组[OD 值分别为(1.341 ± 0.210)、(1.249 ± 0.282)]与 100 nmol/L 醛固酮组比较,差异无统计学意义(*P* = 0.095, *P* = 0.265)。见图 3。

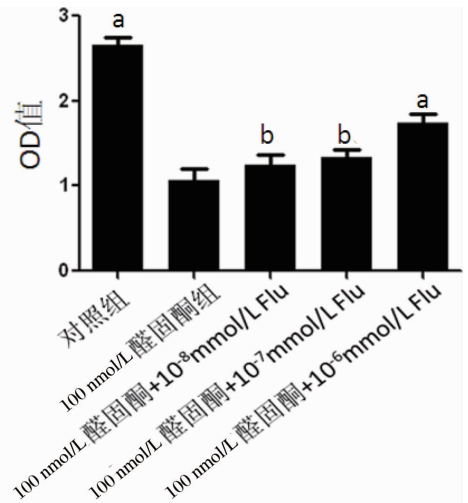
2.1.4 Flu、PD98059 干预下,100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h,对内皮细胞增殖活力及凋亡影响 与对照组相比,100 nmol/L 醛固酮组细胞增殖活力明显下降。100 nmol/L 醛固酮 + 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 干预组,增殖活力部分恢复,且可被 PD98059 抑制阻断(表 1)。与对照组比较,100 nmol/L 醛固酮可诱导细胞凋亡,而 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 干预可明显抑制细胞凋亡。并且,PD98059 可阻断 Flu 抗凋亡作用(表 1、图 4)。



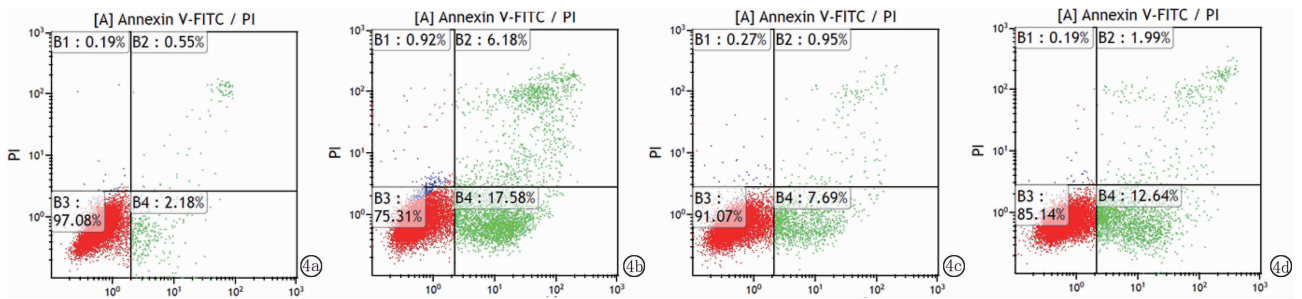
注:与对照组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与 25 nmol/L 醛固酮组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01。  
图 1 25、50、100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h 后细胞增殖活力比较



注:与 24 h 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01。  
图 2 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 6、12、24 h 后细胞增殖活力比较



注:与 100 nmol/L 醛固酮组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与 100 nmol/L 醛固酮 + 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01。  
图 3 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h, 不同浓度 Flu 对内皮细胞增殖活力影响



注:1a:对照组;1b:100 nmol/L 醛固酮组;1c:100 nmol/L 醛固酮 + Flu 组;1d:100 nmol/L 醛固酮 + Flu + PD98059 组。

图 4 有或无 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu, 20 μmol/L PD98059 干预下, 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h 对内皮细胞凋亡的影响

表 1 Flu, 20 μmol/L PD98059 干预下, 100 nmol/L 醛固酮处理细胞 24 h, 内皮细胞增殖、凋亡率结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值	凋亡率 (%)
对照组	2.522 ± 0.249 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.11 <sup>a</sup>
100 nmol/L 醛固酮	0.969 ± 0.136	16.37 ± 1.13
100 nmol/L 醛固酮 + 10 <sup>-6</sup> mmol/L Flu	1.714 ± 0.121 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.58 <sup>a</sup>
100 nmol/L 醛固酮 + 10 <sup>-6</sup> mmol/L Flu + PD98059	1.021 ± 0.217 <sup>b</sup>	12.43 ± 0.91 <sup>b</sup>

注:与 100 nmol/L 醛固酮组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与 100 nmol/L 醛固酮 + 10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01。

### 3 讨论

传统认为醛固酮只在肾上腺合成和分泌,现在发现醛固酮也能在肾上腺以外的器官合成,包括心脏和血管,并且醛固酮能够直接作用于心血管<sup>[6-9]</sup>。醛固酮是心血管系统独立的致病因素<sup>[10]</sup>。近年来,醛固酮对心血管的损害作用成为国内外研究的热点。内皮细胞是醛固酮的靶细胞<sup>[11]</sup>,内皮细胞与平滑肌细胞受损均参与动脉粥样硬化早期血管内膜病变过程,

但内皮细胞受损更早于平滑肌细胞。内皮细胞作为血管内皮基本的结构和功能单位,它的一个重要功能就是发挥屏障功能,调节血管内外的物质交换。受损血管内皮的修复主要依靠邻近的正常细胞迁移增殖来修复<sup>[12]</sup>。本研究发现,醛固酮可抑制内皮细胞增殖,并呈时间依赖性和浓度依赖性。

细胞凋亡异常是多种疾病产生的重要原因之一,见于肿瘤、自身免疫疾病、神经系统疾病和心血管系统疾病等。就心血管系统疾病而言,大量研究证实动脉粥样硬化、高血压病、冠心病、心肌病、心肌炎、心律失常及心力衰竭等疾病的发生均与细胞异常凋亡有关。在动脉粥样硬化斑块中发现内皮细胞、平滑肌细胞和免疫细胞凋亡增加,覆盖于血管病变处的内皮细胞促凋亡蛋白如 Fas 和 Bax 的表达增加,抗凋亡因子水平降低<sup>[13]</sup>。血管内皮细胞的凋亡在动脉粥样硬化形成过程中发挥着触发、维持与加速作用。因此内皮细胞的生长、增殖、凋亡和动脉粥样硬化的发生有着密切关系。本研究发现,醛固酮可诱导细胞凋亡。

Flu 属于 HMG-CoA 还原酶抑制剂之一,是经典

的降血脂药物,它能够通过影响甲羟戊酸等一系列中间产物的产生,干扰小 GTP 蛋白如 Ras、Rac 和 Rho 等的活化,影响细胞外信号向胞内的传递,从而影响细胞的多种功能<sup>[14]</sup>。Flu 有许多独立于降脂以外的作用,而这种作用主要是由于抑制了甲羟戊酸的二烯化产物如焦磷酸法尼酯(farnesylpyrophosphate, FPP)和牛龙牛儿基焦磷酸(geranylgeranylpyrophosphate, GGPP)的合成,这些物质对细胞多种功能的发挥着重要的作用。Flu 有抗炎及抗氧化的作用,对血管内皮细胞的保护作用较为突出,最终起到保护心血管减少动脉粥样硬化的作用<sup>[15]</sup>。本研究表明,10<sup>-6</sup> mmol/L Flu 可减轻醛固酮对人脐静脉内皮细胞抑制增殖作用,并能拮抗醛固酮诱导的内皮细胞的凋亡。并且,其促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用可被 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 阻断。ERK1/2 信号转导通路属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族,是生物体内重要的信号转导系统之一<sup>[16]</sup>,它在细胞生长、细胞周期、应激、凋亡等多种生理和病理过程中起重要作用。

本实验发现,醛固酮可抑制内皮细胞增殖、促进其凋亡,Flu 干预可部分恢复醛固酮作用下 HUVEC 的增殖活力、抑制其凋亡。这可以部分解释他汀类药物的“非降脂相关的心血管保护作用”,为他汀类药物在心脑血管病防治方面的使用提供参考依据。

#### 参考文献

- [1] FerTario CM, Strawn WB. Role of the rennin -angiotensin-aldosterone system and pro inflammatory mediator in cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 98(1): 121 - 128.
- [2] Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone[J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2213 - 2220.
- [3] Takai S, Jin D, Muramatsu M, et al. Eplerenone inhibits atherosclerosis

in nonhuman primates [J]. *Hypertension*, 2005, 46(5): 1135 - 139.

- [4] Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly reorganized type of immunomodulator[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1399 - 1402.
- [5] Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2007, 9(4): 281 - 285.
- [6] Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, et al. Vascular aldosterone Biosynthesis and a link to angiotensinII-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24316 - 24320.
- [7] Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Regulation of aldosterone synthase in Human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(8): 2797 - 2800.
- [8] Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, et al. Aldosterone biosynthesis in the rat brain [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(8): 3369 - 3373.
- [9] Silvestre JS, Robert V, HeyMeses C, et al. Myocardial Production of aldosterone and Corticosterone in the rat. Physiological regulation [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(9): 4883 - 4891.
- [10] Rossi G, Bosearo M, Roneoni V, et al. Aldosterone as a cardiovascular risk factor [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16(3): 104 - 107.
- [11] Oberleithner H, Ludwig T, Riethmiller C, et al. Human endothelium: target for aldosterone[J]. *Hypertension*, 2004, 43(5): 952 - 956.
- [12] Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, et al. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(2): 761 - 776.
- [13] Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(9): 1673 - 1690.
- [14] Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, et al. Statins as a newly reorganized type of immunomodulator[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1399 - 1402.
- [15] Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2007, 9(4): 281 - 285.
- [16] Lawrence MC, Jivan A, Shao C, et al. The roles of MAPKs in disease [J]. *Cell Res*, 2008, 18(4): 436 - 442.

收稿日期: 2015 - 11 - 12 修回日期: 2016 - 02 - 23 编辑: 周永彬