

## 内脂酶对人脐静脉内皮细胞黏附分子表达的影响

方玉强 黄岚 赵晓辉 尹阳光 康华丽 邓梦杨

**【摘要】** 目的 研究人脐静脉内皮细胞(HUVECs)表达黏附分子与内脂酶(EL)的关系,以及 EL 对内皮细胞黏附分子表达的影响。方法 以肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) $10 \mu\text{g/L}$  刺激 HUVECs,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管内皮黏附分子-1(VCAM-1)和 E-选择素的 mRNA 表达变化,以  $50 \mu\text{g/L}$  的抗 EL 抗体进行预处理,再检测黏附分子 mRNA 表达的变化。利用凝胶成像系统拍照、分析、计算黏附分子产物相对含量。结果 TNF- $\alpha$  作用于 HUVECs 后,黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的 mRNA 表达均增高,与正常对照组比较差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ );该作用可被  $50 \mu\text{g/L}$  的抗 EL 抗体所拮抗( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 EL 参与了内皮细胞黏附分子表达的调控,推测它可能通过影响内皮细胞黏附分子表达而参与动脉粥样硬化的病理生理过程。

**【关键词】** 内脂酶; 人脐静脉内皮细胞; 黏附分子; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**Effects of endothelial lipase on mRNA expression of adhesion molecule of human umbilical vascular endothelial cells** FANG Yu-qiang, HUANG Lan, ZHAO Xiao-hui, YIN Yang-guang, KANG Hua-li, DENG Meng-yang. Research Institute of Angiocardiopathy, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: HUANG Lan (Email: huanglans@21cn.com)

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) and endothelial lipase (EL), and the effect of EL on expression of endothelial cell adhesion molecule (ICAM). **Methods** HUVECs was treated with tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ )  $10 \mu\text{g/L}$  and the mRNA of adhesion molecules [intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM - 1), vascular cellular adhesion molecule - 1 (VCAM - 1) and E - selectin] were detected by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). Then the effect of  $50 \mu\text{g/L}$  anti - endothelial lipase (anti - EL) antibody on the influence of TNF -  $\alpha$  on these adhesion molecules was observed. **Results** After being treated with TNF -  $\alpha$ , the mRNA of adhesion molecules expressed by HUVECs were significant up - regulated, there was significant difference compared with control group (all  $P < 0.01$ ). These effects of TNF -  $\alpha$  were significantly abolished by  $50 \mu\text{g/L}$  anti - EL antibody ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** EL can affect the expression of adhesion molecules on endothelial cell adhesion molecule. This effect of EL may play a role in the pathophysiological process in the pathogenesis progress of atherosclerosis.

**【Key words】** endothelial lipase; human umbilical vascular endothelial cells; adhesion molecules; tumor necrosis factor -  $\alpha$

动脉粥样硬化(AS)的发病过程中,内皮细胞(EC)受损、黏附分子表达、单核细胞等炎性细胞与血管内膜黏附并引起血管炎症反应是 AS 的关键和始动环节<sup>[1]</sup>。内脂酶(EL)是 1999 年发现的脂肪酶家族成员<sup>[2]</sup>,由血管内皮细胞(VEC)分泌并作用于血管内皮,具有较强的磷脂酶活性和较弱的甘油三酯酶活性,是高密度脂蛋白代谢的关键酶<sup>[3]</sup>。当受到致炎因素如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )作用后,EC 可高表达 EL<sup>[4]</sup>。研究

发现 EL 可促进单核细胞与 VEC 黏附,而此作用与酶促作用无关<sup>[5]</sup>。EL 是否通过影响内皮细胞黏附分子表达而参与此过程,目前尚无研究报道。为此,本研究中以 TNF- $\alpha$  和抗 EL 抗体为工具,研究人脐静脉内皮细胞(HUVECs)表达黏附分子与 EL 的关系,以期了解 EL 对内皮细胞黏附分子表达的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞、药品、试剂:** HUVECs 购自美国 ACTT 公司, TNF- $\alpha$  购自美国 Sigma 公司, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, RNAse 购自上海华舜生物工程有限公司。

**1.2 引物序列:** 根据文献方法分别设计黏附分子引物。①细胞间黏附分子-1(ICAM-1, 943 bp), 正向: 5'-GTC CCC CTC AAA AGT CAT CC-3'; 反向: 5'-AAC CCC ATT CAG CGT CAC CT-3'。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470729)

作者单位: 400037 重庆第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所

通信作者: 黄岚(Email: huanglans@21cn.com)

作者简介: 方玉强(1971-), 男(汉族), 四川省人, 医学博士, 讲师, 主治医师, 主要研究冠心病发病基础及防治(现于第三军医大学大坪医院心内科工作)。

②血管内皮黏附分子-1 (VCAM-1, 700 bp), 正向: 5'-AGT GGT GGC CTC GTG AAT GG-3'; 反向: 5'-CTG TGT CTC CTG TCT CCG CT-3'。  
 ③E-选择素 (900 bp), 正向: 5'-GGG ACA ACG AGA AGC CAA CG-3'; 反向: 5'-CCG AAG CCA GAG GAG AAA TG-3'。  
 ④三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 309 bp, 为内参照), 正向: 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC-3'; 反向: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TT-3'。

**1.3 细胞样品制备和总 RNA 的提取纯化:** 采用 RNArose 法。复苏 HUVECs 细胞株, 采用体积分数为 10% 的胎牛血清 (FCS) 低糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM-L), 37 °C、体积分数为 5% 的二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 培养。细胞生长至对数生长期, 分到 3 瓶直径为 8 cm 的培养瓶中继续培养; 待细胞生长至 80% 融合时, 在 A 瓶中加入 TNF-α (终浓度为 10 μg/L), 在 B 瓶中同时加入 TNF-α (终浓度为 10 μg/L) 和抗 EL 多克隆抗体 (终浓度为 50 μg/L), C 瓶中加入等量的无血清培养基, 继续培养 16 h 收获细胞, 根据 RNArose 试剂盒说明书进行细胞总 RNA 提取及纯化, 并采用紫外分光光度仪测定浓度及纯度。

**1.4 逆转录 (RT) 合成 cDNA 和聚合酶链反应 (PCR):** 根据试剂盒说明书建立 RT 反应体系, 并按 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 5 °C 5 min 进行 RT 反应, 总计 1 个循环。按试剂盒说明书建立 PCR 反应体系。94 °C 2 min, 1 个循环; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 10 min, 1 个循环进行 PCR 扩增。反应完毕后取出反应产物进行琼脂糖凝胶电泳。反应体系中每次均设 GAPDH (单独反应管) 内参对照。

**1.5 凝胶成像、分析:** 利用凝胶成像系统进行拍照、软件进行分析, 以 GAPDH 灰度值进行标准校正, 计算黏附分子产物的相对含量。所有操作重复 3 次, 分别计算相对量。

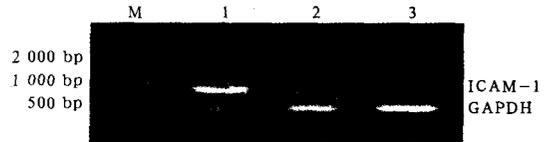
$$\text{黏附分子相对量} = \frac{\text{黏附分子 mRNA 条带灰度值}}{\text{GAPDH mRNA 条带灰度值}}$$

**1.6 统计学分析:** 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间资料进行正态分布检验和方差齐性检验, 采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

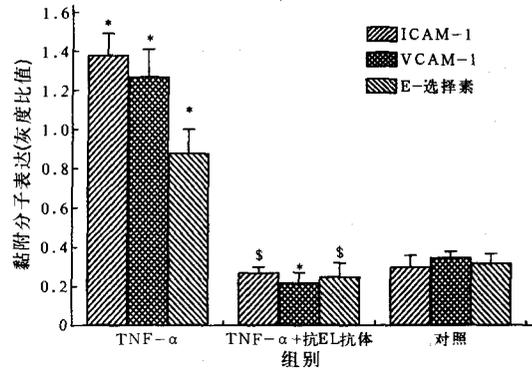
**2 结果**

**2.1 TNF-α 对 HUVECs 表达 ICAM-1 的促进作用及抗 EL 抗体的拮抗作用 (图 1, 图 2):** 正常情况下 HUVECs 能低水平表达 ICAM-1, 10 μg/L

的 TNF-α 能增加 ICAM-1 mRNA 表达约 3.6 倍, 50 μg/L 抗 EL 抗体可显著抑制 TNF-α 引起的 ICAM-1 mRNA 表达, 抑制率约 80% ( $P < 0.05$ )。



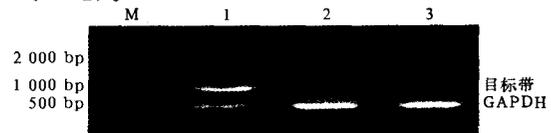
M: Marker; 1~3 依次为: TNF-α、TNF-α+抗 EL 抗体和对照  
**图 1 TNF-α 诱导 HUVECs 表达 ICAM-1 及抗 EL 抗体的作用**  
**Figure 1 Expression of ICAM-1 on HUVECs induced by TNF-α and the depressing effect of anti-EL antibody**



注: 与对照比较: \$P < 0.05, \*P < 0.01

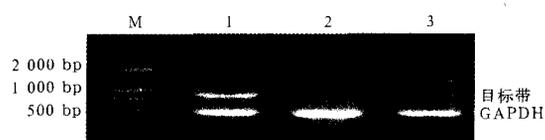
**图 2 TNF-α 诱导 HUVECs 表达黏附分子及抗 EL 抗体的作用**  
**Figure 2 Expression of adhesion molecules in HUVECs induced by TNF-α and the depressing effect of anti-EL antibody**

**2.2 TNF-α 对 HUVECs 表达 VCAM-1 的促进作用及抗 EL 抗体的拮抗作用 (图 2, 图 3):** 正常情况下 HUVECs 可低水平表达 VCAM-1; 10 μg/L 的 TNF-α 能增加 VCAM-1 mRNA 表达约 2.6 倍; 50 μg/L 的抗 EL 抗体可显著抑制 TNF-α 引起的 VCAM-1 mRNA 表达增强, 抑制率约 83% ( $P < 0.01$ )。



M: Marker; 1~3 依次为: TNF-α、TNF-α+抗 EL 抗体和对照  
**图 3 TNF-α 诱导 HUVECs 表达 VCAM-1 及抗 EL 抗体的作用**  
**Figure 3 Expression of VCAM-1 on HUVECs induced by TNF-α and the depressing effect of anti-EL antibody**

**2.3 TNF-α 对 HUVECs 表达 E-选择素的促进作用及抗 EL 抗体的拮抗作用 (图 2, 图 4):** 正常情况下 HUVEC 可低水平的表达黏附分子 E-选择素; 10 μg/L 的 TNF-α 能增加 E-选择素 mRNA 表达约 1.7 倍; 50 μg/L 的抗 EL 抗体可显著抑制 TNF-α 引起的 E-选择素 mRNA 表达, 抑制率约 71% ( $P < 0.05$ )。



M: Marker; 1~3 依次为: TNF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ +抗 EL 抗体和对照  
 图 4 TNF- $\alpha$  诱导 HUVECs 表达 E-选择素及抗 EL 抗体的作用  
 Figure 4 Expression of E-selectin on HUVECs induced by TNF- $\alpha$  and the depressing effect of anti-EL antibody

### 3 讨论

研究也发现冠心病患者血中炎症指标 C-反应蛋白与冠心病的临床危险性显著正相关<sup>[6]</sup>。Ishida 等<sup>[7]</sup>发现, apoE 和 EL 双基因敲除小鼠的 AS 发生率较 apoE 基因敲除小鼠下降 70%; 体外血管单核细胞黏附实验发现, EL 缺乏小鼠血管中巨噬细胞数量下降。Kojma 等<sup>[5]</sup>发现, 高表达 EL 的 COS7 和 Pro5 细胞可增强单核细胞的黏附作用, 转 EL 基因小鼠动脉带上黏附的单核细胞数显著高于野生型小鼠, 而在 EL 基因敲除鼠中明显低于野生型小鼠。这些结果均提示 EL 可促进单核细胞黏附到血管内膜, 引起 AS 的早期反应。

Hirata 等<sup>[4]</sup>研究发现, TNF- $\alpha$  和剪切力诱导 HUVECs 表达的 EL mRNA 在刺激后 6 h 分别增加 3.6 倍和 2.7 倍, 24 h 增加 4.8 倍和 3.2 倍。我国学者林勇等<sup>[8]</sup>发现, TNF- $\alpha$  呈浓度依赖性地增加单核细胞与 EC 的黏附, 6 h 后增加 2.85 倍, 而 24 h 后增加约 3.4 倍。两个研究结果虽然增加倍数不一, 但其增加趋势却非常一致, 提示 EL 表达增加与单核细胞黏附 EC 的增加间存在某种联系。单核细胞的黏附主要通过 EC 表达黏附分子实现的。EL 是否可通过调控 EC 黏附分子的表达来参与 AS 的形成, 目前尚未见报道。

为此, 我们按照文献<sup>[4]</sup>报道的方法, 采用促进内皮细胞表达 EL 的 TNF- $\alpha$  浓度 (10  $\mu$ g/L) 作用于培养的 HUVECs, 同时用 50  $\mu$ g/L 的抗 EL 多克隆抗体进行干预。结果发现, TNF- $\alpha$  可使 HUVECs 黏附分子基因表达增加, 其中 ICAM-1 mRNA 表达增加约 3.6 倍, VCAM-1 mRNA 表达增加约 2.6 倍, E-选择素 mRNA 表达增加约 1.7 倍; 50  $\mu$ g/L 的抗 EL 抗体可抑制 TNF- $\alpha$  引起的黏附分子表达增强, 其中 ICAM-1 mRNA 抑制率约 80%, VCAM-1 mRNA 抑制率约 83%, E-选择素 mRNA 抑制率约 71%。结果证实 EL 能促进内皮细胞黏附分子的表达。

在 AS 发病过程中, EC 受损和功能障碍是其中

心环节。受损 EC 表达黏附分子, 促进单核细胞等与血管内膜黏附是 AS 发病的重要始动环节; 在 AS 发生早期, 高血压、高血脂、高血糖、吸烟、氧化应激等各种因素均可引起冠状动脉 VEC 损伤, 受损的 VEC 基因结构发生改变, 启动转录因子核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 从而产生大量黏附分子<sup>[9]</sup>, 促使单核细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞与 VEC 黏附并激活, 这一过程被视为 AS 形成过程中炎症反应的开始。激活的单核细胞通过一系列机制促进内皮损伤, VEC 功能障碍, 进一步促进黏附分子表达, 从而吸引更多的炎性细胞黏附, 引发病变<sup>[10]</sup>。

研究表明, 黏附分子通过介导 EC 与单核细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞之间的相互黏附、相互作用, 在冠心病的发生发展中有着重要的作用。我们的研究发现, EC 表达 EL 后可促进 EC 黏附分子表达, 推测它可能通过此机制促进单核细胞等炎性细胞与 VEC 黏附, 从而参与 AS 的发病, 阻断 EL 表达可能对 AS 的早期防治有一定作用。

### 参考文献:

- 1 Aird W C. Endothelial cell heterogeneity and atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2006, 8(1): 69-75.
- 2 Jaye M, Lynch K J, Krawiec J, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(4): 424-428.
- 3 Jin W J, Sun G S, Marchadier D, et al. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase [J]. *Circ Res*, 2003, 92(6): 644-650.
- 4 Hirata K, Ishida T, Matsushita H, et al. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(1): 90-93.
- 5 Kojma Y, Hirata K, Ishida T, et al. Endothelial lipase modulates monocyte adhesion to the vessel wall: a potential role in inflammation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54032-54038.
- 6 田晓岚, 姚力. 冠心病患者血清 C-反应蛋白检测的临床意义 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(4): 249.
- 7 Ishida T, Choi S Y, Kundu R K, et al. Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 45085-45092.
- 8 林勇, 黎健, 孙颂三, 等. 单核细胞及中性粒细胞与内皮细胞黏附的区别 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7(3): 244-247.
- 9 Selwyn A P, Kinlay S, Ganz P. Atherogenesis and ischemic heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80(8B): 3H-7H.
- 10 Martin A, Foxall T, Blumberg J B, et al. Vitamin E inhibits low-density lipoprotein induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cell in vitro [J]. *Atheros Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(3): 429-446.

(收稿日期: 2007-07-20 修回日期: 2007-08-18)

(本文编辑: 李银平)