

非诺贝特对 LPC 诱导脐静脉内皮细胞增殖、 凋亡及 eNOS 基因表达的影响

孙国举¹, 谢秀梅^{1,*}, 邢莹², 鄢文海², 杨天岑¹, 余国龙¹

(1. 中南大学湘雅医院心内科, 长沙 410008 2. 郑州大学医学院干细胞研究中心, 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨非诺贝特对 LPC 诱导的脐静脉内皮细胞增殖、凋亡及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)基因表达的影响。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs)根据非诺贝特不同浓度分为正常对照组、LPC组、低浓度非诺贝特(10 $\mu\text{mol/L}$)组、中浓度非诺贝特(50 $\mu\text{mol/L}$)组、高浓度非诺贝特(100 $\mu\text{mol/L}$)组,根据非诺贝特不同干预时间分为正常对照组、LPC组、非诺贝特(50 $\mu\text{mol/L}$)干预6 h组、12 h组、24 h组、48 h组进行实验。分别观测不同浓度及不同时间非诺贝特内皮细胞增殖、凋亡、NO浓度及eNOS mRNA表达的变化。结果:与正常对照组比较,LPC抑制内皮细胞增殖,促进细胞凋亡,并使HUVECs eNOS mRNA表达降低,NO合成减少。非诺贝特可干预LPC对内皮细胞的作用,使内皮细胞增殖增强,细胞凋亡减少,eNOS mRNA表达升高,NO合成增加,且其作用呈时间-效应、浓度-效应依赖关系。结论:非诺贝特可改善LPC对HUVECs的影响,使内皮细胞增殖增强,凋亡减少,eNOS mRNA表达升高,NO合成增加,从而起到抗动脉硬化作用。

[关键词] 非诺贝特; 人脐静脉内皮细胞; 增殖; 凋亡; 内皮型一氧化氮合酶

[中图分类号] R541.4; R364.31 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)03-0373-06

Effects of fenofibrate on the proliferation and apoptosis and nitric oxide synthase expression of cultured human umbilical vein endothelial cells induced by lysophosphatidylcholine

SUN Guo-ju¹, XIE Xiu-mei^{1,*}, XING Ying², YAN Wen-hai², YANG Tian-lun¹, YU Guo-long¹

(1. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Stem Cell Research Center, Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of fenofibrate on the proliferation and apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by lysophosphatidylcholine (LPC). **Methods** HUVECs were cultured in vitro. The study was designated to 5 groups according to fenofibrate concentration: control group, LPC group, LPC + low-concentration fenofibrate (10 $\mu\text{mol/L}$), LPC + middle-concentration fenofibrate (50 $\mu\text{mol/L}$), and LPC + high-concentration fenofibrate (100 $\mu\text{mol/L}$). The study was designated to 6 groups according to the intervention time: control group, LPC group, LPC + fenofibrate (50 $\mu\text{mol/L}$) 6 h, LPC + fenofibrate 12 h, LPC + fenofibrate 24 h, and LPC + fenofibrate 48 h. The proliferation and apoptosis of HUVECs were evaluated by MTT assay, flow cytometry and fluorescence microscopy, respectively. eNOS mRNA were assayed by real time-PCR. **Results** Compared with the control group, LPC could inhibit the proliferation and induce apoptosis, and down-regulate eNOS mRNA expression and decrease NO production of HUVECs. Fenofibrate could increase the proliferation and decrease the apoptosis, and up-regulate eNOS mRNA expression and enhance NO production in HUVECs. **Conclusion** Fenofibrate could improve the proliferation and inhibit the

apoptosis, and up-regulate eNOS mRNA expression of HUVECs induced by LPC, which may be responsible for fenofibrate to prevent and treat atherosclerosis.

Key words: fenofibrate; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); proliferation; apoptosis; endothelial nitric oxide synthase

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(3):0373-06]

血管内皮细胞为衬覆于血管内腔面的单层扁平细胞,依靠其正常的增殖和凋亡平衡,保持血管的结构和功能正常。血管内皮细胞还具有多种内分泌功能,释放 NO 及其他血管活性物质参与全身及局部血管功能状态的调节。近年来的研究表明,许多心血管疾病的发生发展与细胞凋亡有关^[1,2]。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是核受体超家族的一员,活化后与抗炎、脂质代谢及细胞的增殖、分化、凋亡密切相关。贝特类调脂药是一类人工合成的 PPAR α 激动剂,近年来其改善非脂质性危险因素的作用引起了人们极大的兴趣。本研究探讨非诺贝特对 LPC 诱导的内皮细胞增殖和凋亡的影响以及 eNOS 基因表达的变化,为动脉粥样硬化防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及仪器

人脐静脉内皮细胞(HUVECs)株 CRL-1730 购自 ATCC 公司。RPMI 1640 培养基(GIBCO, USA),胎牛血清(杭州四季青公司),非诺贝特、LPC、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝、二甲基亚砷(Sigma, USA),Oligod(T)18、PCR 缓冲液、dNTP、Taq 酶、RNase 抑制剂(上海生工),琼脂糖、AMV(Promega, USA),Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(深圳晶美),NO 测试盒(南京建成),real time-PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM)(大连宝生物),Trizol 一步法 RNA 提取试剂盒(GIBCO, USA),酶联免疫检测仪(Biotek, USA),荧光显微镜(OLYMPUS, JAPAN),流式细胞仪(BD, USA),低温离心机(BECKMAN, USA),高速低温离心机(Eppendorf, USA),7000 型实时定量 PCR 仪(ABI, USA),凝胶图像分析仪(Syngene, USA)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及分组

将 HUVECs 解冻复苏在含 15% 胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺、0.1 g/L 肝素、0.05 g/L 内皮细胞生长因子的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱,每 2~3 d 换液 1 次。待细胞生长至单层融合状态后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取对数

生长期细胞,按传代方法制成单细胞悬液,根据非诺贝特不同浓度分为:①正常对照组:当细胞长至 60%~70% 融合时换 5% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液;②LPC 组:当细胞长至 60%~70% 融合换浓度为 10 mg/L 的 LPC 的 5% 胎牛血清培养液;③低浓度非诺贝特干预组:当细胞长至 60%~70% 融合时换用 5% 胎牛血清培养液,并加入浓度为 10 μ mol/L 的非诺贝特预处理 8 h 后,再加入 LPC(终末浓度 10 mg/L)共同孵育 24 h;④中浓度非诺贝特(50 μ mol/L)组:非诺贝特浓度为 50 μ mol/L,余同低浓度非诺贝特组;⑤高浓度非诺贝特干预组:非诺贝特浓度为 100 μ mol/L,余同低浓度非诺贝特组。根据非诺贝特不同干预时间分为:①正常对照组;②LPC 组;③非诺贝特干预 6 h 组:浓度为 50 μ mol/L 的非诺贝特预处理 8 h 后,再加入 LPC(终末浓度 10 mg/L)共同孵育 6 h;④非诺贝特干预 12 h 组:非诺贝特与 LPC 共同孵育 12 h,余同非诺贝特干预 6 h 组;⑤非诺贝特干预 24 h 组:非诺贝特与 LPC 共同孵育 24 h,余同非诺贝特干预 6 h 组;⑥非诺贝特(50 μ mol/L)干预 48 h 组:非诺贝特与 LPC 共同孵育 48 h,余同非诺贝特干预 6 h 组。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法

取对数生长期细胞,按传代方法制成单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔加细胞悬液 200 μ L(含 2×10^4 个细胞),按 1.2.1 分组及处理观测不同浓度及不同作用时间非诺贝特对内皮细胞增殖的影响。空白对照组以无血清 RPMI 1640 补足。细胞终浓度为 1×10^5 /mL,每孔总体积 200 μ L。在达各培养时间点前 4 h 时每孔加入 0.5% MTT 20 μ L,继续培养 4 h,倒去培养基,每孔加二甲基亚砷 150 μ L,震荡 10 min 后,用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度值(A₄₉₀)。实验重复 3 次,每组设 3 个复孔,取平均值为最终结果。

1.2.3 细胞凋亡的形态学观察

按 1.2.1 中不同浓度非诺贝特分组处理后,根据细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒(购于碧云天生物技术研究所)说明书操作。Hoechst 33258 染色后,其与染色

质结合, 荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。细胞发生凋亡时, 染色质固缩, 因此荧光显微镜下凋亡细胞的细胞核致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。

1.2.4 流式细胞仪观察 对照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。取对数生长期细胞, 按传代方法制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^4 个/mL, 接种于 6 孔板上, 每孔加细胞悬液 1 mL, 按 1.2.1 中不同浓度非诺贝特分组及处理后, 分别收集 6 孔板各组各孔细胞, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL。取 1 mL 细胞悬液, 1 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃上清。加入 1 mL 冷 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮。1 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃上清。重复 2 次, 将细胞重悬于 200 μ L 结合缓冲液, 加入 10 μ L FITC-Annexin V 和 5 μ L PI 双标记后, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 立即上流式细胞仪检测。

1.2.5 NO 测定 将 HUVECs 接种于 6 孔板, 按上述 1.2.1 实验分组进行干预后, 取上清液, 采用硝酸盐还原法测定 NO 浓度。按试剂盒说明书步骤测定 NO。根据公式 $NO(\mu\text{mol/L}) = (\text{样品管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度}(100 \mu\text{mol/L}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$ 计算各样品管浓度。

1.2.6 eNOS mRNA 检测 (real time-PCR) 用 Trizol 试剂盒分别提取各组细胞总 RNA (按说明书操作)。按下列体系配制逆转录混和反应液: 10 \times 逆转录缓冲液 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4.0 μ L, RNase 抑制剂 (40 U/ μ L) 0.5 μ L, AMV (20 U/ μ L) 0.75 μ L, Oligo-dT (50 mg/L) 1.0 μ L, 总 RNA 1.0 μ L。用 DEPC 处理水补足至总体积 20 μ L 混匀后置水浴箱。按如下条件进行逆转录合成: 30 °C 温育 10 min, 42 °C 逆转录 30 min, 95 °C 加热 5 min, 立即将反应管插入 0 °C ~ 5 °C 冰水中冰浴, 反应产物保存于 -20 °C 作 PCR 扩增用。

目的基因 eNOS 引物和管家基因 GAPDH 引物

由宝生物工程有限公司(大连)合成, 引物序列如下: eNOS 上游: 5'-GGACTGAAGGCTGGCATCTGG-3', 下游: 5'-CATGTTACTGTGCGTCCACTCTGC-3'; GAPDH 上游: 5'-CAACTTTGGTATCGTGAAGGA-3', 下游: 5'-GAGGCAGGGATGATGTTCTGG-3'。实时定量 PCR 反应条件: 反应体积为 25 μ L, 内含 cDNA 2 μ L (相当于 200 ng RNA), 引物各 0.5 μ L, SYBR Premix Ex Taq™ (2 \times) 12.5 μ L, ROX Reference Dye (50 \times) 0.5 μ L。反应条件为: 预变性 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 30 个循环。每组 cDNA 管家基因、目的基因各 3 管, 并设无模板的空白对照组, 同批次扩增。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验、方差分析, 由 SPSS 11.5 统计软件完成。以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 非诺贝特对 LPC 诱导 HUVECs 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, LPC 组吸光度值较正常对照组明显降低 ($P < 0.05$); 同一时间非诺贝特不同浓度组与 LPC 组比较, 低浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对内皮细胞的增殖改善作用不明显 ($P > 0.05$), 中浓度 (50 $\mu\text{mol/L}$) 及高浓度 (100 $\mu\text{mol/L}$) 时内皮细胞增殖明显增强 ($P < 0.01$), 呈浓度-效应依赖关系。非诺贝特孵育不同时间组内皮细胞增殖情况与 LPC 组比较, 6 h 时轻度增加, 24 和 48 h 增强最为明显, 呈时间-效应依赖关系。这表明, LPC 对内皮细胞增殖有抑制作用, 非诺贝特可改善 LPC 对内皮细胞增殖的抑制作用, 并呈时间-效应、浓度-效应依赖关系 (表 1)。

2.2 非诺贝特对 LPC 诱导 HUVECs 细胞凋亡的影响

2.2.1 荧光显微镜观察凋亡细胞的形态学变化 结果显示, 与正常对照组相比, LPC 作用后, 细胞核致密浓染的凋亡细胞明显增多。非诺贝特干预后, 凋亡细胞明显减少 (图 1)。

表 1 MTT 示非诺贝特对 LPC 诱导 HUVECs 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

	6 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	0.770 \pm 0.022	0.902 \pm 0.020	0.955 \pm 0.019	0.949 \pm 0.030
LPC 组	0.556 \pm 0.017 ^{##}	0.555 \pm 0.033 ^{##}	0.536 \pm 0.023 ^{##}	0.493 \pm 0.027 ^{##}
低浓度非诺贝特组	0.577 \pm 0.016	0.594 \pm 0.020	0.567 \pm 0.024	0.531 \pm 0.024
中浓度非诺贝特组	0.631 \pm 0.028 ^{**}	0.726 \pm 0.021 ^{**}	0.762 \pm 0.022 ^{**}	0.753 \pm 0.033 ^{**}
高浓度非诺贝特组	0.727 \pm 0.021 ^{**}	0.839 \pm 0.026 ^{**}	0.880 \pm 0.021 ^{**}	0.881 \pm 0.018 ^{**}

与正常对照组比较 ^{##} $P < 0.01$; 与 LPC 组比较, ^{*} $P < 0.01$

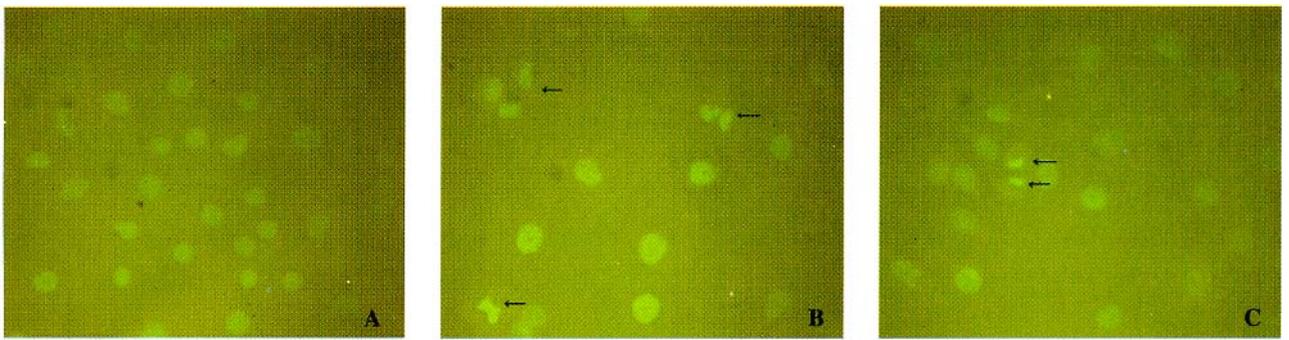


图1 Hoechst 染色示凋亡细胞的细胞核致密浓染,或呈碎块状致密浓染 A:正常对照组;B:LPC组;C:中浓度非诺贝特组($\times 400$)

Fig. 1 Hoechst 33258 staining for detecting apoptosis: chromatin condensation and nuclear fragmentation in nucleus were detected by fluorescence microscopy A: Normal control; B: LPC; C: middle-concentration fenofibrate ($\times 400$)

2.2.2 Annexin V-FITC/PI 双染定量分析凋亡细胞 在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸只分布在细胞膜脂质双层的内侧,细胞发生凋亡早期,膜磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,故可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。碘化丙啶(PI)不能通过正常细胞膜,但可通过晚期凋亡细胞及坏死细胞的细胞膜。因此,流式细胞术(FCM)可区分并定量分析4个细胞亚群,包括坏死细胞(Annexin-/PI+)、正常活细胞(Annexin-/PI-)、早期凋亡细胞(Annexin+/PI-)和晚期凋亡细胞(Annexin+/PI+)。

流式细胞仪结果显示,与正常对照组相比,LPC作用后,HUVECs早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞均明显增加($P < 0.01$)。非诺贝特干预后,则可见HUVECs的早期凋亡细胞及晚期凋亡细胞均明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并与非诺贝特浓度有关,呈浓度-效应依赖关系(表2)。

2.3 非诺贝特对LPC诱导的HUVECs NO及eNOS mRNA表达的影响

2.3.1 非诺贝特对LPC诱导的HUVECs NO浓度的影响 与正常对照组比较,LPC引起HUVECs培养上清液NO浓度降低($P < 0.01$)。非诺贝特干预后NO浓度升高,与LPC组比较,非诺贝特低浓度组、中浓度组、高浓度组及非诺贝特($50 \mu\text{mol/L}$)干预12,24,48 h NO浓度均明显升高($P < 0.01$),且其升高的程度和非诺贝特浓度及作用时间有关(图2)。

2.3.2 非诺贝特对LPC诱导的HUVECs eNOS mRNA表达的影响 在实时定量PCR检测中,Ct值是每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数,每个模板的Ct值与该模板的

起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,Ct值越小。结果显示,与正常对照组比较,LPC引起HUVECs eNOS mRNA表达降低($P < 0.01$)。非诺贝特干预后eNOS mRNA表达增强。与LPC组比较,10,50,100 $\mu\text{mol/L}$ 的非诺贝特组以及50 $\mu\text{mol/L}$ 的非诺贝特作用6,12,24和48 h内皮细胞eNOS mRNA表达均明显增强($P < 0.01$),呈浓度-效应、时间-效应依赖关系(图3A;表3A)。

表2 非诺贝特对LPC诱导的HUVECs凋亡的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	早期凋亡率(%)	中、晚期凋亡率(%)	总凋亡率(%)
正常对照组	2.73 \pm 0.33	4.72 \pm 0.60	7.45 \pm 1.67
LPC组	14.88 \pm 2.47 ^{##}	20.30 \pm 2.59 ^{##}	35.18 \pm 5.68 ^{##}
低浓度非诺贝特组	10.21 \pm 1.72 [*]	14.78 \pm 2.53 [*]	24.99 \pm 2.24 [*]
中浓度非诺贝特组	4.40 \pm 0.52 ^{**}	6.13 \pm 0.37 ^{**}	10.53 \pm 4.10 ^{**}
高浓度非诺贝特组	3.94 \pm 0.81 ^{**}	5.73 \pm 0.33 ^{**}	9.67 \pm 1.32 ^{**}

与正常对照组比较,## $P < 0.01$;与LPC组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表3 不同浓度非诺贝特对内皮细胞eNOS mRNA表达(Ct值)的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

	正常对照组	LPC	非诺贝特组($\mu\text{mol/L}$)		
			10	50	100
eNOS	13.64 \pm 0.25	21.04 \pm 0.19	16.10 \pm 0.21	15.45 \pm 0.22	15.71 \pm 0.21
eNOS/GAPDH	1.09	1.68 ^{##}	1.28 ^{**}	1.24 ^{**}	1.26 ^{**}

与正常对照组比较,## $P < 0.01$;与LPC组比较,** $P < 0.01$

表4 非诺贝特干预不同时间对内皮细胞eNOS mRNA表达(Ct值)的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

	正常对照组	LPC	非诺贝特组			
			6 h	12 h	24 h	48 h
eNOS	13.91 \pm 0.23	20.82 \pm 0.21	16.52 \pm 0.20	15.67 \pm 0.18	15.41 \pm 0.17	15.92 \pm 0.16
eNOS/GAPDH	1.11	1.66 ^{##}	1.32 ^{**}	1.25 ^{**}	1.23 ^{**}	1.27 ^{**}

与正常对照组比较,## $P < 0.01$;与LPC组比较,** $P < 0.01$

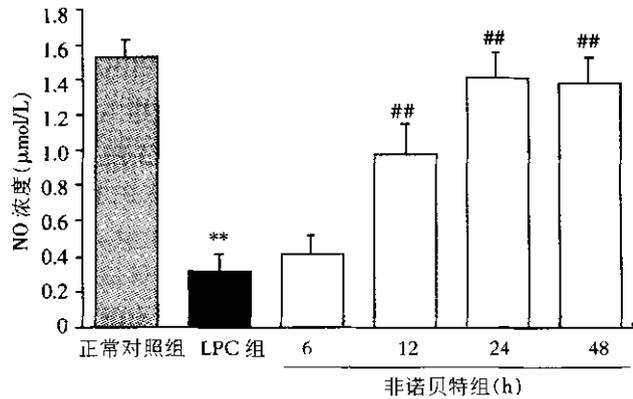
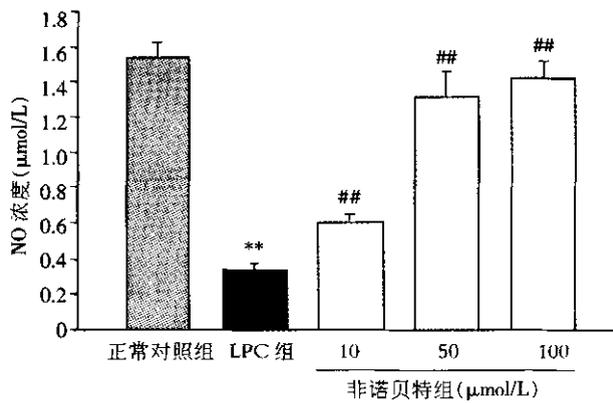


图2 不同浓度及不同干预时间非诺贝特对内皮细胞 NO 浓度的影响 与正常对照组比较, * P < 0.01 ; 与 LPC 组比较 ## P < 0.01

Fig.2 NO value of cell sample after treatment for the indicated periods and increasing concentrations of fenofibrate Compared with normal group, * P < 0.01 ; Compared with Group LPC, ## P < 0.01

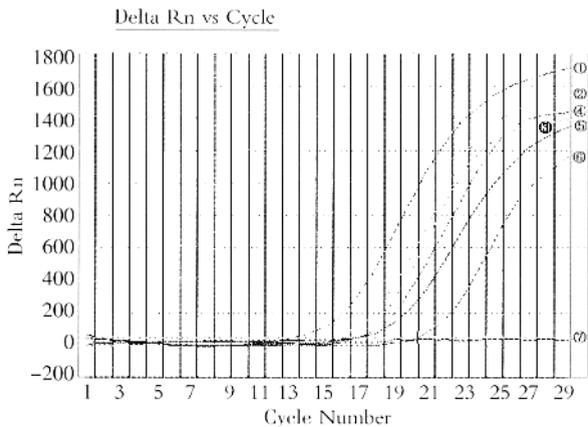


图3 不同浓度非诺贝特干预 24 h 后实时定量 PCR mRNA 扩增曲线 ① :管家基因 GAPDH mRNA 扩增曲线 ;②~⑥ :eNOS mRNA 扩增曲线 ②正常对照组 ;③高浓度非诺贝特组 ;④中浓度非诺贝特组 ;⑤低浓度非诺贝特组 ;⑥LPC 组 ;⑦空白对照组

Fig.3 mRNA real time-PCR amplification plot in HUVECs HUVECs were treated for 24 h with increasing concentrations of fenofibrate ① : housekeeping gene GAPDH ;②~⑥ :eNOS mRNA ② normal control ;③ : high-concentration fenofibrate ;④ : middle-concentration fenofibrate ;⑤ : low-concentration fenofibrate ;⑥ : Group LPC ;⑦ : No template control

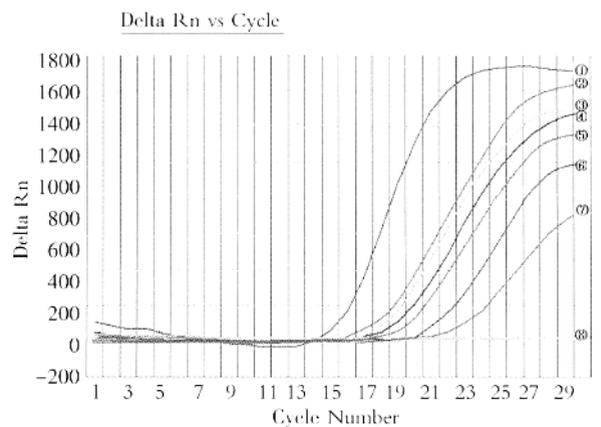


图4 非诺贝特(50 μmol/L)干预不同时间后实时定量 PCR mRNA 扩增图 ① :管家基因 GAPDH 扩增曲线 ;②~⑦ :eNOS 扩增曲线 ②正常对照组 ;③非诺贝特组作用 48 h ;④ :非诺贝特作用 24 h ;⑤ :非诺贝特作用 12 h ;⑥ :非诺贝特作用 6 h ;⑦ :LPC 组 ;⑧ :空白对照组

Fig.4 mRNA real time-PCR amplification plot in HUVECs HUVECs were treated for the indicated periods with 50 μmol/L fenofibrate ① : housekeeping gene GAPDH ;②~⑦ :eNOS mRNA ;② : normal control ;③ :48 h with 50 μmol/L fenofibrate ;④ :24 h with 50 μmol/L fenofibrate ;⑤ :12 h with 50 μmol/L fenofibrate ;⑥ :6 h with 50 μmol/L fenofibrate ;⑦ :Group LPC ;⑧ :No template control

3 讨 论

动脉粥样硬化是危害人类健康的主要疾病之一,内皮细胞损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成的始动环节。虽然 AS 是以增殖为主的血管疾病,但最近的研究证实细胞凋亡也是 AS 病变的主要特征^[1,2]。血管内皮细胞凋亡对 AS 的发生、发展具有重要意义^[3]。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)是内皮细胞损伤的关键因素之一,其作用于内皮细胞膜,引起一系列过氧化链式反应,产生大量的脂质过氧化物。这些脂质过氧化物不仅

直接损伤细胞的 DNA,还诱导内皮细胞凋亡^[4]。LPC 是 ox-LDL 的主要活性成分,在 ox-LDL 致病过程中起重要作用^[5,6]。本研究结果显示 LPC 孵育 HUVECs 后细胞增殖减弱,凋亡增加,因此破坏内皮的完整性,影响内皮的结构和功能,对 AS 的发生发展具有重要意义:①血管内皮覆盖的完整性破坏,有利于血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖及迁移至内膜。②内皮细胞损伤后内皮下基质和胶原暴露,促进血小板黏附聚集并释放活性物质,导致血栓形成及 VSMC 增殖;③内皮细胞损伤导致其本身功能障碍,释放血管活性物质减少等,这些

因素共同促进了动脉粥样硬化的发生发展。

本研究结果还显示, LPC 孵育 HUVECs 后, HUVECs eNOS mRNA 表达降低, NO 合成减少。NO 具有舒张血管, 抑制平滑肌细胞增殖和血小板聚集, 减少白细胞黏附, 减轻内皮细胞损伤等作用^[7,8]。NO 合成减少将导致内皮功能障碍, 受损内皮细胞合成 NO 减少, 从而形成恶性循环, 导致 AS 的发生发展。有研究显示在动脉粥样硬化发生发展过程中内皮细胞 eNOS mRNA 表达降低及 NO 生成减少^[9], 这和本研究结果一致。

许多心血管疾病及危险因素均可导致血管内皮功能损伤, 而血管内皮功能损伤又常伴发或加重心血管疾病, 因此保护血管内皮功能已成为目前治疗心血管疾病的重要策略之一。最近的研究显示贝特类调脂药除改善血脂异常外, 尚可抑制血小板黏附聚集、预防和延缓动脉粥样硬化进程、降低心血管急性事件的发生率^[10,11]。本研究显示非诺贝特可改善 LPC 诱导的血管内皮细胞损伤。非诺贝特干预后, 内皮细胞增殖增加, 凋亡减少, eNOS mRNA 表达上调, NO 合成增加, 且非诺贝特作用呈时间-效应、浓度-效应依赖关系。这与 Goya 等^[12]研究一致。内皮细胞增殖增强, 凋亡减弱, 可使受损内皮的完整性得以恢复, 从而维持内皮的结构和功能。eNOS mRNA 表达上调, NO 浓度增加, 可舒张血管, 抑制平滑肌细胞增殖和血小板聚集, 减少白细胞黏附, 改善血管内皮功能, 起到防治 AS 的作用。

非诺贝特的作用机制尚不十分清楚。贝特类不仅通过纠正异常脂蛋白血症来发挥抗动脉粥样硬化作用, 还具有改善非脂质性危险因素的作用, 研究较多的是其抗炎及抗氧化作用^[13,14]。而本实验则从内皮细胞增殖及凋亡的角度探讨了非诺贝特的抗 AS 作用。在内皮细胞中 NO 是通过激活鸟苷酸环化酶的活性来介导细胞凋亡的^[15]。本研究显示内皮细胞增殖及凋亡的变化与 eNOS mRNA 表达及 NO 浓度的改变有关, 但具体的机制需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2001, 96(1):11-22.
- [2] Kockx M, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease[J]. *J Pathol*, 2000, 190(3):267-280.
- [3] Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors

- on endothelial progenitor cells : limitations for therapy ? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(2):257-266.
- [4] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20(5):707-727.
- [5] Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, et al. Lysophosphatidylcholine is a major contributor to the synergistic effect of mildly oxidized low-density lipoprotein with endothelin-1 on vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *J Cardiol Pharm*, 2002, 39(3):449-459.
- [6] Liu SX, Zhou M, Chen Y, et al. Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low density lipoprotein may play an important role in foam cell formation[J]. *Atherosclerosis*, 1996, 121(1):55-61.
- [7] Van HC, Carreer BF, Geczy J, et al. Long-term treatment with the NO-donor molsidomine reduces circulating ICAM-1 levels in patients with stable angina [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 180(2):399-405.
- [8] Ohara N, Takeichi S, Naito Y, et al. Remnant-like particles from subjects who died of coronary artery disease suppress NO synthase activity and attenuate endothelium-dependent vasorelaxation [J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 338(1-2):151-156.
- [9] Yosefy C, Khamizer V, Viskoper JR, et al. Impaired nitric oxide production, brachial artery reactivity and fish oil in offspring of ischaemic heart disease patients [J]. *Br J Biomed Sci*, 2003, 60(3):144-148.
- [10] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5):717-726.
- [11] Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, et al. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease : the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS) [J]. *Circulation*, 2003, 107(13):1733-1737.
- [12] Goya K, Sumitani S, Xu X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(4):658-663.
- [13] Marx N, Duez H, Fruchart JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis : regulators of gene expression in vascular cells [J]. *Circ Res*, 2004, 94(9):1168-1178.
- [14] Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPAR alpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells [J]. *Circulation*, 1999, 99(24):3125-3131.
- [15] Aoki M, Nata T, Morishita R, et al. Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF-kappaB : antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells [J]. *Hypertension*, 2001, 38(1):48-55.