

# ghrelin 抑制 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞粘附分子表达

蒋 艳<sup>1,3</sup>, 姜孝新<sup>2</sup>, 雷小勇<sup>3</sup>

(1. 南华大学附属第一医院药剂科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第一医院检验科;  
3. 南华大学药物药理研究所)

**摘要:** **目的** 探讨不同剂量 ghrelin 预处理对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞粘附分子表达的作用。 **方法** 人脐静脉内皮细胞经传代培养后随机分配为对照组、ox-LDL 组及 1 ng/mL、10 ng/mL 与 100 ng/mL ghrelin 预处理组,采用逆转录—聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组血管内皮细胞粘附分子-1(VCAM-1)与细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的 RNA 水平变化。 **结果** 与空白对照组相比,ox-LDL 组内皮细胞 VCAM-1 与 ICAM-1 分子的表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。与 ox-LDL 组相比,1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL ghrelin 预处理可使内皮细胞 VCAM-1 mRNA 含量依次降低 33%、52%、63%,内皮细胞 ICAM-1 mRNA 分子表达水平依次降低 18%、46%、57%。 **结论** ghrelin 对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中粘附分子 VCAM-1 及 ICAM-1 的表达有明显的抑制作用。

**关键词:** 动脉粥样硬化; ghrelin; 血管内皮细胞粘附分子-1; 细胞间粘附分子-1

中图分类号:R541.4

文献标识码:A

## The Inhibitory Effect of Ghrelin on ox-LDL-mediated Adhesion Molecule Expression in hUVECs

JIANG Yan, JIANG Xiaoxin, LEI Xiaoyong

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the inhibitory effect of different concentration of ghrelin on ox-LDL-mediated adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells(hUVECs). **Methods** After subculture, hUVECs were randomly divided into control group, ox-LDL group, ghrelin-pretreated group of 1 ng/mL, 10 ng/mL and 100 ng/mL. RT-PCR were used to detect the RNA changes of vascular adhesion molecule-1(VCAM-1) and inter-cellular adhesion molecule-1(ICAM-1). **Results** Compared with control group, both VCAM-1 and ICAM-1 expressions were obviously increased( $P < 0.05$ ). While compared with ox-LDL group, ghrelin-pretreated groups showed a decrease in mRNA level of VCAM-1, which were 33%, 52% and 63% respectively by different concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL ghrelin. The mRNA level of ICAM-1 in ghrelin-pretreated groups were also inhibited, with a decrease of 18%, 46% and 57% respectively by different concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL ghrelin. **Conclusion** Ghrelin could repress the expression of VCAM-1 and ICAM-1 induced by ox-LDL in human umbilical vein endothelial cells.

**Key words:** atherosclerosis; ghrelin; VCAM-1; ICAM-1

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是多种心脑血管疾病发生发展的重要病理基础,也是老年人最

主要的死因之一<sup>[1-2]</sup>。动脉粥样硬化发展过程中,粘附分子能够介导单核细胞和淋巴细胞与内皮细胞的粘附,并介导它们穿过内皮细胞进入血管壁,造成早期血管内皮细胞的损伤<sup>[3,4]</sup>。

Ghrelin 是生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体,是

1999 年由 Kojima 等<sup>[5]</sup>从大鼠胃黏膜获取,在人体多个器官均有表达,研究发现其可促进血管新生、抑制炎症与血管内皮细胞凋亡<sup>[6-8]</sup>,且可明显提高缺氧复氧环境下 AD-MSCs 的生存与增殖等作用<sup>[9]</sup>。最近研究发现血浆 ghrelin 浓度与患者颈动脉中膜厚度呈负相关,且在动脉粥样硬化部位 GHSR-1a 的表达明显增加,提示 ghrelin 很可能可以降低 As 的发生率<sup>[10]</sup>。本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,hUVECs)为研究对象,以氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein,ox-LDL)体外诱导方式建立人脐静内皮细胞损伤模型,观察 ghrelin 对 ox-LDL 所诱导的粘附分子表达的影响。

1 材料与 方法

1.1 材料、仪器与试剂

ghrelin 购自 Phoenix biotech 公司。人脐静脉内皮细胞由南华大学药理学教研室提供。小型台式离心机(军事医学科学院实验仪器厂),超净工作台(苏州净化设备有限公司),凝胶成像分析系统(UVP 公司,美国),PCR 仪(Bio-Rad,美国)。氧化型低密度脂蛋白(中山医科大学),胎牛血清(杭州四季青生物公司),逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(上海生工科技公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养及分组

人脐静脉内皮细胞在含 20% 胎牛血清的 M199 培养基中于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,细胞单层生长达 80% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,以 1:2 比例进行传代。取第 4~5 代呈对数生长的 hUVECs 细胞接种于 6 孔培养板中,待细胞生长至 80% 融合,无血清培养基继续培养 16 h,更换为实验用液,随机分配为对照组、ox-LDL 组及 ghrelin 预处理组。

对照组:加入等体积的培养基;ox-LDL 组:加入 50 mg/mL ox-LDL;ghrelin 预处理组:分别加入 1、10 或 100 ng/mL ghrelin 孵育细胞 1 h 后,加入 50 mg/mL ox-LDL。细胞传代与纯化操作参照文献<sup>[11]</sup>进行。

1.3 RT-PCR 法检测细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 水平

Trizol 提取 hUVECs RNA 后,半定量逆转录—聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)检测组织中细胞间粘附分子-1(inter-cellular adhesion molecule-1,ICAM-1)mRNA、

血管内皮细胞粘附分子-1(vasculareen adhesionmolecule-1,VCAM-1)mRNA 表达水平,采用引物如下:

①ICAM-1:上游引物 5'-TTC GTC ACT CCC ACG GTT AG-3',下游引物 5'-TTT TAA ATA CTG CCA ACT TCC C-3',产物大小为 314 bp。

②VCMA-1:上游引物 5'-GAT ACA ACC GTC TTG GTC AGC CC-3',下游引物 5'-CGC ATC CTT CAA CTG GGC CTT-3',产物大小为 490 bp。

③内参照 GAPDH:上游引物 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3',产物大小为 650 bp。

PCR 结束后,2% 琼脂糖凝胶电泳,拍照后,凝胶图像分析软件得出各目的条带与内参照 GAPDH 的灰度比值。

1.4 统计学处理

经 SPSS16.0 统计软件进行 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 ghrelin 对 ox-LDL 诱导 hUVECs 中 VCAM-1 表达的抑制作用

RT-PCR 结果表明,以 ox-LDL 组 VCAM-1 扩增产物条带亮度最大,空白对照组仅可检测到微弱的 490 bp VCAM-1 特异性条带,而随着预处理中 ghrelin 浓度的增加,VCAM-1 条带亮度逐渐减小。灰度扫描以 VCAM-1/GDPH 比值对 VCAM-1 mRNA 的表达水平进行量化分析,结果显示,ox-LDL 组内皮细胞 VCAM-1 表达水平较对照组明显升高(*P* < 0.05),1、10、100 ng/mL ghrelin 预处理组中 VCAM-1 mRNA 含量相较于 ox-LDL 组分别减少 33%、52%、63%(表 1,图 1)。

表 1 RT-PCR 检测 hUVECs 细胞中 VCAM-1 mRNA 的表达  
Table 1 RT-PCR detecting the expression of VCAM-1 mRNA in hUVECs

| 组别        | <i>n</i> | VCAM-1/GAPDH               |
|-----------|----------|----------------------------|
| 对照组       | 9        | 0.176 ± 0.047              |
| ox-LDL 组  | 9        | 0.761 ± 0.112 <sup>a</sup> |
| ghrelin 组 |          |                            |
| 1 ng/mL   | 9        | 0.519 ± 0.033 <sup>b</sup> |
| 10 ng/mL  | 9        | 0.368 ± 0.015 <sup>b</sup> |
| 100 ng/mL | 9        | 0.285 ± 0.037 <sup>b</sup> |

a:与对照组比较,*P* < 0.05;b:与 ox-LDL 组比较,*P* < 0.05

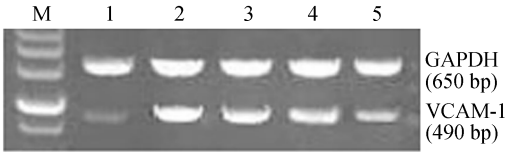


图1 RT-PCR 检测 hUVECs 细胞中 VCAM-1 mRNA 的表达。 1: 对照组, 2: ox-LDL 组, 3: ghrelin 组 (1 ng/mL), 4: ghrelin 组 (10 ng/mL), 5: ghrelin 组 (100 ng/mL)

Fig.1 RT-PCR detecting the expression of VCAM-1 mRNA in hUVECs

2.2 ghrelin 对 ox-LDL 诱导 hUVECs 中 ICAM-1 表达的抑制作用

RT-PCR 结果显示, 空白对照组仅检测到微弱的 314 bp ICAM-1 特异性条带, 而 ox-LDL 组 VCAM-1 扩增产物条带的亮度最高, 但随着预处理中 ghrelin 浓度的增加, 该特异性条带亮度逐渐减小。灰度值结果显示, ox-LDL 可显著增加内皮细胞中 ICAM-1 表达, 与对照组之间差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), ghrelin 预处理可抑制 ox-LDL 增加内皮细胞表达 ICAM-1 mRNA ( $P < 0.05$ ), 其中 1、10、100 ng/mL ghrelin 预处理 ICAM-1 mRNA 组减少百分比分别为 18%、46%、57% (表 2, 图 2)。

表 2 RT-PCR 检测 hUVECs 细胞中 ICAM-1 mRNA 的表达  
Table 2 RT-PCR detecting the expression of ICAM-1 mRNA in hUVECs

| 组别        | n | ICAM-1/GAPDH               |
|-----------|---|----------------------------|
| 对照组       | 9 | 0.075 ± 0.042              |
| ox-LDL 组  | 9 | 0.850 ± 0.089 <sup>a</sup> |
| ghrelin 组 |   |                            |
| 1 ng/mL   | 9 | 0.696 ± 0.112 <sup>b</sup> |
| 10 ng/mL  | 9 | 0.457 ± 0.069 <sup>b</sup> |
| 100 ng/mL | 9 | 0.362 ± 0.058 <sup>b</sup> |

a: 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 ox-LDL 组比较,  $P < 0.05$

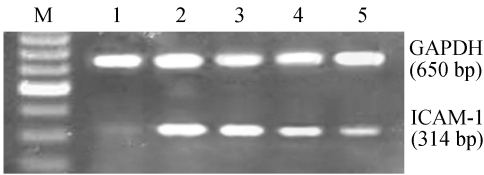


图2 RT-PCR 检测 hUVECs 细胞中 ICAM-1 mRNA 的表达。 1: 对照组, 2: ox-LDL 组, 3: ghrelin 组 (1 ng/mL), 4: ghrelin 组 (10 ng/mL), 5: ghrelin 组 (100 ng/mL)

Fig. 2 RT-PCR detecting the expression of ICAM-1 mRNA in hUVECs

3 讨 论

血管内皮细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 与细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 是动脉粥样硬化中内皮细胞表达的重要粘附分子, 可介导单核细胞、白细胞及 T 淋巴细胞等炎症细胞向内皮的粘着和迁移, 在动脉粥样硬化初期阶段发挥重要作用<sup>[12]</sup>。此外, 研究发现心血管疾病患者可溶性细胞间粘附分子-1 (sICAM-1) 和可溶性血管细胞粘附分子-1 (sVCAM-1) 的水平明显增高, 两者水平可以反映冠状动脉粥样硬化病变的严重程度及冠状动脉粥样斑块的不稳定状态<sup>[13]</sup>。本实验结果中, 对照组中正常内皮细胞呈低水平表达 ICAM-1 和 VCAM-1, 在 ox-LDL 组中 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 水平则明显升高 ( $P < 0.05$ ), 这提示 ox-LDL 在内皮细胞中粘附分子合成或诱导过程中扮演了较为重要的角色。导致这种情况的原因可能与 ox-LDL 可通过不同的信号转导通路, 如酪氨酸蛋白激酶、蛋白激酶 C 和 Gi 蛋白, 诱导内皮细胞粘附分子 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达相关<sup>[14-15]</sup>。ghrelin 预处理在 1 ng/mL ~ 100 ng/mL 浓度范围内, 均表现出对于 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中 VCAM-1 和 ICAM-1 表达的抑制作用, 而且抑制效果呈剂量依赖趋势, 导致上述现象的原因可能是 Ghrelin 分子的结构及受体结构相关<sup>[6, 16]</sup>。

总之, ghrelin 对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞中粘附分子 VCAM-1 及 ICAM-1 的表达有抑制作用。

参考文献:

[1] Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. Eur Heart J, 1997, 18 (Suppl): E19-29.  
[2] Zhou Zhi-qiang, An Yi, Li Jian, et al. Effect of rosuvastatin on regulatory T cell in atherosclerosis of apoE KO mice [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11 (9): 1613-1616.  
[3] 蒋 艳, 雷小勇. 细胞因子在动脉粥样硬化发生发展中的作用 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10 (21): 4198-4200.  
[4] Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha [J]. J Biol Chem, 1998, 273 (8): 4616.

(上接第 146 页)

- [5] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.
- [6] 王丽晔, 李 峰, 宋月晗. Ghrelin 发现和结构的研究现状[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(19): 3589-3581.
- [7] Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, et al. Functional and immunocytochemical evidence for a role of Ghrelin and des-octanoyl Ghrelin in the regulation of vascular tone in man[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1): 227-235.
- [8] Wang YB, Narsinh K, Zhao L, et al. Effects and mechanisms of Ghrelin on cardiac microvascular endothelial cells in rats[J]. Cell Biol Int, 2011, 35: 135-140.
- [9] 高丽娜, 张荣庆, 李 霜, 等. Ghrelin 对缺氧复氧状态下脂肪间充质干细胞保护作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(5): 837-840.
- [10] Kotani K, Sakane N, Saiga K, et al. Serum ghrelin and carotid atherosclerosis in older Japanese people with metabolic syndrome[J]. Arch Med Res, 2006, 37(7): 903-906.
- [11] 李 广, 戴爱国. 大鼠肺动脉平滑肌细胞原代培养及低氧对缺氧诱导因子-1 $\alpha$  的影响[J]. 肿瘤药学, 2011, 1(2): 114-117.
- [12] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice[J]. Atherosclerosis, 2002, 160(2): 305-310.
- [13] Luc G, Arveiler D, Evans A, et al. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PR IME Study[J]. Atherosclerosis, 2003, 170(1): 169-176.
- [14] Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with increased levels of cell-adhesion molecules in clinical healthy 58-year old men (AIR study)[J]. Med Sci Monit, 2002, 8(3): 148-152.
- [15] Matsumoto M, Lkeda M, Seike M, et al. Different mechanisms of adhesion molecule expression in human dermal microvasuclar endothelial cells by xanthoma tissue-mediated and copper-mediated oxidized low density lipoproteins[J]. J Dermatol Sci, 2003, 32(1): 43-54.
- [16] 王东娟, 曹 丰, 王海昌, 等. Ghrelin 对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤和炎症反应的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2010, 12(3): 1-3.