

阿司匹林对血管内皮细胞增殖及磷酸化 p44/42 MAPK 表达的抑制作用

刘 卉¹, 欧阳平², 刘振华¹, 赖文岩², 许顶立² (¹ 第一军医大学珠江医院神经内科, 广东 广州 510282; ² 第一军医大学南方医院心血管内科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 观察阿司匹林对体外培养的血管内皮细胞的增殖和磷酸化 p44/42 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)表达的影响。方法 体外培养血管内皮细胞株 ECV304, 应用 1、2、5、10 mmol/L 的阿司匹林分别作用并设立对照进行比较, 采用 MTS/PES 法确定 ECV304 细胞的增殖状态。利用 p44/42 磷酸化抗 MAPK 抗体的蛋白免疫印迹法测定磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白表达。结果 各组的细胞增殖率分别为对照组 1.533±0.286, 阿司匹林 1 mmol/L 组 1.253±0.225, 2 mmol/L 组 0.953±0.149, 5 mmol/L 组 0.708±0.125, 10 mmol/L 组 0.459±0.107。统计分析显示低至 1 mmol/L 的阿司匹林仍能明显抑制 ECV304 细胞的增殖($P<0.05$), 并呈现剂量依赖性。阿司匹林对 ECV304 细胞的磷酸化 p44/p42 MAPK 表达有显著的抑制作用($P<0.05$)。结论 阿司匹林对体外培养的血管内皮细胞的增殖和内皮细胞中磷酸化 p44/42 MAPK 的表达均有明显的抑制作用。

关键词:阿司匹林; 内皮细胞; 细胞增殖; 丝裂素活化蛋白激酶

中图分类号: R541 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)09-1013-03

Aspirin inhibits proliferation and expression of p44/42 MAPK phosphorylation in vascular endothelial cells

LIU Hui¹, OUYANG Ping², LIU Zhen-hua¹, LAI Wen-yan², XU Ding-li²

¹Department of Neurology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of Cardiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effects of aspirin on vascular endothelial cell proliferation *in vitro* and on the activity of p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation. **Methods** ECV 304 cells cultured *in vitro* were treated with aspirin (1, 2, 5, and 10 mmol/L, respectively) and observed for their proliferation in comparison with the control group. The ratio of cell proliferation was determined by non-radioactive MTS/PES assay. The expression of phosphorylated p44/42 MAPK protein was evaluated by the immunoblotting technique using anti-p44/42 phospho-MAPK antibody. **Results** The proliferation rate of the endothelial cell was 1.533±0.286 in the control group, and 0.459±0.107, 0.708±0.125, 0.953±0.149 and 1.253±0.225 in aspirin-treated groups corresponding to aspirin concentrations of 10, 5, 2 and 1 mmol/L, respectively. It was shown that aspirin significantly inhibited the vascular endothelial cell proliferation at the concentration above 1 mmol/L ($P<0.05$), in a dose-dependent manner as compared with the control group ($P<0.05$). The expression of phosphorylated p44/42 MAPK protein was significantly inhibited by aspirin. **Conclusions** Aspirin decreases vascular endothelial cell proliferation, and arrest of endothelial cell proliferation may be an important mechanism by which aspirin produces protective effect against acute coronary disease.

Key words: aspirin; endothelial cells; cell proliferation; mitogen-activated protein kinase

血管内皮功能障碍和炎症反应是动脉粥样硬化发生发展的主要病理基础之一^[1,2]。阿司匹林在目前临床上广泛应用于血管疾病包括缺血性心脏病和缺血性脑卒中中的一级和二级预防,也是抗血小板药物治疗的基础^[3]。阿司匹林除了目前了解最多的抗血小板

聚集的作用外,还具有抑制炎症、影响纤维蛋白的形成、使纤维蛋白结构松散、对一氧化氮生成的影响、抗动脉粥样硬化、抗氧化以及对抗自由基、增加铁蛋白的合成以及改善动脉粥样硬化病变血管内皮细胞功能不全等非血小板作用^[4]。Marra 等^[5]报告一定剂量的阿司匹林通过抑制细胞周期素依赖性激酶从而抑制了血管平滑肌细胞的增殖。丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)通过磷酸化激活多种转录因子,影响基因表达,调节细胞增殖。p44/42 是 MAPK 的重要成员之一。本研究探讨阿司匹林对体外培养的血管内皮细胞增殖及对内皮细胞磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白表达的影响,以进一步从细胞水平上阐述阿司匹林对动脉粥样硬化血管的保护作用。

收稿日期:2003-11-08

基金项目:广州市科委科技攻关项目(JB00000448165)

This study was a Key Research Project sponsored by Guangzhou Science and Technology Committee (JB00000448165)

作者简介:刘 卉(1970-),女,第一军医大学在读硕士研究生,主治医师,电话:020-61640156

通讯作者:欧阳平, E-mail: ypou@fimmu.com

Corresponding author: OUYANG Ping, E-mail: ypou@fimmu.com

1 材料和方法

1.1 材料

血管内皮细胞株 ECV304 购于 ATCC(American Type Culture Collection), 一次性培养瓶和 96 孔板购于 Corning 公司。1640 培养基和胎牛血清购于 Gibco 公司, 胰蛋白酶购于 Amresco 公司, 阿司匹林购于 Sigma 公司, CellTiter 96 Assay MTS/PES 试剂盒购于美国 Promega 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

ECV304 细胞于含 10%胎牛血清的 1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,当细胞生长达到亚融合状态时收获细胞供实验所用。

1.3 细胞增殖评价

参考 Selzman 等^[6]建立的方法。ECV304 细胞用 0.25%胰酶消化,计数,然后在 96 孔板中以每孔 5 000 个细胞的密度铺板。24 h 时后,换成 1%胎牛血清的 1640 培养基,维持 24 h 以获得同步的细胞生长停止。24 h 后将已配制的各浓度阿司匹林 1、2、5 及 10 mmol/L 分别加入,对照组为含 10%FBS 的 1640 培养基,24 h 细胞的增殖率通过应用 CellTiter 96 Assay MTS/PES 试剂盒确定。具体方法是 MTS/PES 混合溶液 20 ml 加入相应的各个孔中,96 孔板在 5% CO₂、37 °C 孵箱中孵育 90 min,在 Bio-Rad 550 型 Microplate reader 以 490 nm 波长测量 D(λ),细胞的增殖率用 D(λ)来表达。

1.4 磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白免疫印迹测定

应用 p44/42 MAPK 检测试剂盒 (购自 New England Biolabs)进行检测。静止的 ECV304 细胞分别应用 1、2、5 及 10 mmol/L 的阿司匹林,以不含阿司匹林的 1640 培养液作为对照组,30 min 后,用 1×PBS 洗细胞,吸掉培养液。加入 100 μl SDS 样品缓冲液溶解细胞,迅速刮取细胞并转移至试管中,置于冰上。超声处理 15 s 以去除 DNA 和减少样品粘滞度。95~100 °C 加热 5 min,冰上冷却。离心 5 min,取蛋白质上清 20 ml 用 10% SDS 聚丙烯酰胺电泳分离蛋白质。将已分离的区带用电转移仪转移到 PVDF 膜上,室温下用 25 ml TBS 洗硝化纤维素膜 5 min。室温下在 25 ml 中止缓冲液中孵育膜 1 h。15 ml TBST 洗膜 5 min,共 3 次。膜中加入适当比例的一抗(1:1 000 稀释)孵育,4 °C 过夜。15 ml TBST 洗膜 5 min,共 3 次。膜中加入适当比例的二抗(1:1 000 稀释)孵育 1 h。15 ml TBST 洗膜 5 min,共 3 次。室温下用 10 ml LumiGLO 孵育膜 1 min,轻搅动。倒掉过剩液体,用薄膜包好,用化学发光法检测蛋白印记条带,结果用影像软件 Smart view 分析。

1.5 统计学分析

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 软件包,采用 one way ANOVA 和 Dunnett T3 法检验。

2 结果

2.1 阿司匹林对血管内皮细胞增殖的影响

以终浓度分别为 1、2、5 及 10 mmol/L 的阿司匹林与 5 000 个细胞 / 孔的血管内皮细胞共同孵育 24 h,反映各组细胞增殖的 D(λ)结果及统计分析见图 1。结果表明,低至 1 mmol/L 的阿司匹林仍能明显抑制大鼠血管内皮细胞的增殖,与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),并呈现剂量依赖性。表明不同剂量下的阿司匹林对血管内皮细胞增殖均有明显的抑制作用。

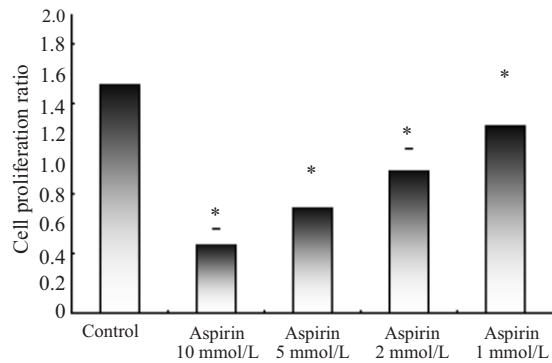


图 1 阿司匹林对血管内皮细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of aspirin on vascular endothelial cell proliferation

* $P < 0.05$ vs the control group

2.2 阿司匹林对血管内皮细胞磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白表达的影响

以对照组的密度扫描结果为 100,1 mmol/L 的阿司匹林对磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白的表达没有明显的作用 ($99 \pm 6, P > 0.05$)。2、5、10 mmol/L 的阿司匹林均能够明显抑制磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白的表达 ($78 \pm 4, 81 \pm 2, 75 \pm 5, P < 0.05$, 图 2)。重复 3 次得到相同的结果。

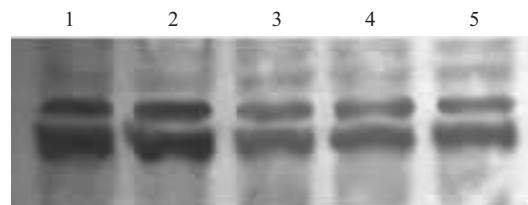


图 2 阿司匹林对血管内皮细胞磷酸化 p44/42 MAPK 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of aspirin on expression of phosphorylated p44/42 mitogen-activated protein in ECV304 cell line

Lane 1: Control; Lanes 2-5: Aspirin at 1, 2, 5, and 10 mmol/L, respectively

3 讨论

我们的研究结果提示:(1)一定剂量的阿司匹林可以明显抑制血管内皮细胞 ECV304 的增殖;(2)一定剂量的阿司匹林能够部分地抑制血管内皮细胞 ECV304 中磷酸化 p44/42MAPK 蛋白的表达。

血管内皮细胞功能障碍与持续的炎症反应是动脉粥样硬化发生发展及导致急性冠脉综合征的关键因素^[2]。已有大量临床研究证实,阿司匹林可减少与动脉粥样硬化有关疾病的发生^[7]。阿司匹林可改善动脉粥样硬化血管的内皮功能障碍,从而限制了局部缺血的发生。Husain 等^[8]报告了阿司匹林能使尼古丁诱导的内皮细胞功能障碍正常化,Noon 等^[9]报告了在高胆固醇血症病人的前臂血管对乙酰胆碱诱导的血管舒张反应减弱,而在给予阿司匹林后能恢复,在患有冠状动脉粥样硬化病的人群中也有相似的发现^[8],Kharbanda 研究小组^[10]新近的研究表明阿司匹林具有对抗内皮功能不全的保护作用。本研究结果提示不同剂量的阿司匹林对体外培养的血管内皮细胞增殖均有明显的抑制作用,并呈现剂量依赖性。新近的研究表明在急性冠脉综合征中,内皮细胞处于极度活跃的状态,这种状态与导致促炎和促凝血瀑布发生的细胞内信号传导通路上调密切相关^[2]。Ranganathan 等^[11]报告了阿司匹林通过上调 p53 蛋白而发挥抑制血管内皮细胞增殖的作用,我们的结果提示了阿司匹林通过部分抑制血管内皮细胞中磷酸化 p44/42MAPK 蛋白的表达而限制了内皮细胞的生长。阿司匹林使内皮细胞生长的暂时停止,推测可能部分影响了极度活跃的内皮细胞对一系列细胞因子及其它炎症因子的反应,这可能是阿司匹林在急性血管疾病治疗中非血小板作用的关键作用机制之一。

综上所述,本研究证明了阿司匹林通过部分抑

制抑制血管内皮细胞中磷酸化 p44/42MAPK 蛋白的表达而对体外培养的血管内皮细胞增殖产生一定的抑制作用,尽管阿司匹林的抗血小板聚集效应非常重要,但其非血小板介导的效应作为阿司匹林抗血小板效应的补充也具有同样的重要性。

参考文献:

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407(6801): 233-41.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Nature, 2002, 420(6891): 19-26.
- [3] Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin [J]. Circulation, 2000, 101(23): 1206-15.
- [4] Aude YW, Mehta JL. Nonplatelet-mediated effects of aspirin [J]. Drugs Today, 2002, 38(5): 501-7.
- [5] Marra DE, Simmoncini T, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21waf1 and p27kip1 [J]. Circulation, 2000, 102(32): 2124-30.
- [6] Selzman CH, Shames BD, Whitehill TA, et al. Class II cytokine receptor ligands inhibit human vascular smooth muscle proliferation [J]. Surgery, 1998, 124(3): 318-27.
- [7] Antiplatelet Trialists Collaboration. Prevention of death, myocardial infarction and stroke by antiplatelet therapy: collaborative meta-analysis of 266 trials involving 200 000 patients at high risk of occlusive vascular events [J]. Brit Med J, 2002, 324(1): 71-86.
- [8] Husain S, Andrews NP, Mulcahy D. Aspirin improve endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. Circulation, 1998, 97(8): 716-20.
- [9] Noon JP, Walker BR, Hand MF. Impairment of forearm vasodilatation to acetylcholine in hypercholesterolemia is reversed by aspirin [J]. Cardiovasc Res, 1998, 38(5): 480-4.
- [10] Kharbanda RK, Walton B, Allen M, et al. Prevention of inflammation induced endothelial dysfunction [J]. Circulation, 2002, 105(32): 2600-4.
- [11] Ranganathan S, Joseph J, Mehta JL. Aspirin inhibits human coronary artery endothelial cell proliferation by upregulation of p53 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 143-6.