

依折麦布联合辛伐他汀对血管内皮细胞凋亡的影响

贾媛芳¹, 王向真^{1*}, 张军伟¹, 蔡胜男², 代淑贞¹, 胡晓森³, 杨晓红¹

¹青岛大学附属医院麻醉科, 山东 青岛

²青岛大学附属烟台毓璜顶医院麻醉科, 山东 烟台

³青岛大学附属医院呼吸科, 山东 青岛

收稿日期: 2022年11月21日; 录用日期: 2022年12月15日; 发布日期: 2022年12月26日

摘要

目的: 探究依折麦布联合辛伐他汀对TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)凋亡的影响。方法: 依折麦布和辛伐他汀单独及联合作用于TNF- α 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC) 24小时, 应用CCK-8法检测各组细胞活性, 用Annexin V/PI双染流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果: 两药联合应用时, 细胞凋亡率低于各自单用($P < 0.05$); 两药单用或联合应用时, 细胞凋亡率相较对照组降低明显($P < 0.05$), 两药联用时细胞凋亡率降低最为明显($P < 0.05$)。结论: 依折麦布联合辛伐他汀对血管内皮细胞有保护作用, 能够有效抑制血管内皮细胞凋亡, 两药联用优于各自单用对血管内皮细胞凋亡的抑制效果。

关键词

依折麦布, 辛伐他汀, 血管内皮细胞凋亡

Effect of Ezetimibe Combined with Simvastatin on Apoptosis of Vascular Endothelial Cells

Yuanfang Jia¹, Xiangzhen Wang^{1*}, Junwei Zhang¹, Shengnan Cai², Shuzhen Dai¹, Xiaosen Hu³, Xiaohong Yang¹

¹Department of Anesthesiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Anesthesiology, The Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao University, Yantai Shandong

³Department of Respiratory, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Nov. 21st, 2022; accepted: Dec. 15th, 2022; published: Dec. 26th, 2022

*通讯作者 Email: suliu0724@163.com

文章引用: 贾媛芳, 王向真, 张军伟, 蔡胜男, 代淑贞, 胡晓森, 杨晓红. 依折麦布联合辛伐他汀对血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 临床医学进展, 2022, 12(12): 11584-11589. DOI: [10.12677/acm.2022.12121669](https://doi.org/10.12677/acm.2022.12121669)

Abstract

Objective: To explore the effect of ezetimibe combined with simvastatin on apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by TNF- α . **Methods:** Ezetimibe and simvastatin alone or combined effects on TNF- α induced human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) for 24 hours. Each cell activity was measured by CCK-8 assay, Annexin V/PI double staining flow cytometry to detect apoptosis rate. **Results:** When the two drugs were used in combination, the apoptosis rate was lower than that when they were used alone ($P < 0.05$). When the two drugs are used alone or in combination, the apoptosis rate is significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), and when the two drugs are used in combination, the apoptosis rate is the most obvious ($P < 0.05$). **Conclusion:** The combination of ezetimibe and simvastatin has protective effect on vascular endothelial cells, and can effectively inhibit the apoptosis of vascular endothelial cells. The combination of the two drugs is better than that of the single use.

Keywords

Ezetimibe, Simvastatin, Apoptosis of Endothelial Cells

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

血管内皮细胞凋亡与冠状动脉粥样硬化的发生密切相关。目前, 已经有大量研究证实降脂药辛伐他汀除降血脂作用外对血管内皮细胞也有保护作用[1]。临床应用中, 辛伐他汀受剂量、副反应[2]等因素的限制, 降脂作用有限[3]。新的降脂思路是胆固醇吸收抑制剂与小剂量辛伐他汀联合应用[4], 能够更有效地降低血脂。本课题以 TNF- α 为血管内皮细胞刺激因子[5], 观察依折麦布和辛伐他汀单独使用及联合应用对血管内皮细胞凋亡的影响[6], 从而更全面地了解两药联用的效果, 为更准确的临床用药提供一定的理论基础。

2. 材料和方法

2.1. 试剂和仪器

依折麦布原料药和辛伐他汀原料药由默沙东制药有限公司提供; CCK-8 试剂、TNF- α 、胎牛血清购自美国 Sigma 公司; Annexin V/PI 凋亡检测盒购自上海基星生物科技有限公司; 流式细胞仪 FACSCAN 型为美国 BD 公司生产。

2.2. 方法

1) 脐静脉内皮细胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)培养。无菌条件下取新生儿脐带, 采用胰酶消化法获取脐静脉内皮细胞, 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 取对数生长期的 4~6 代进行实验。将贴壁细胞以 0.25% 的胰酶消化后置于离心管中以 1000 r/min 转速离心 10 min, 弃上清液, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 用吸管将细胞吹打均匀, 于普通光学显微镜下用计数板计数, 将细胞浓度稀释成 5×10^8 /mL, 以 2 ml、200 μ l/孔分装于 6 孔板、96 孔板内, 置于细胞培养箱中, 培养 24 小

时待细胞贴壁后用于实验。

2) 凋亡诱导。取处于对数生长期体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)进行实验,将细胞分成五组,分别加入① 空白对照组(生理盐水)、② TNF- α (10 ng/mL)凋亡诱导对照组、③ TNF- α (10 ng/mL)凋亡诱导 + 20 μ mol/L 依折麦布、④ TNF- α (10 ng/mL)凋亡诱导 + 0.1 μ mol/L 辛伐他汀组、⑤ TNF- α (10 ng/mL)凋亡诱导 + 20 μ mol/L 依折麦布 + 0.1 μ mol/L 辛伐他汀组,置于 5% CO₂、37℃培养箱中培养 24 小时,采用 6 孔板及 96 孔板收集细胞,分别采取 CCK-8 法检测人脐静脉内皮细胞存活率、用流式细胞仪检测内皮细胞早期凋亡率。

3) CCK-8 法检测细胞存活率。按照细胞分组,取对数生长期细胞制成 5*10⁸/mL 的细胞悬液,每孔 100 μ l 接种于 96 孔板,每组设 3 个平行孔,调零孔加培养液 100 μ l,培养 24 h 后每孔加 CCK-8 试剂 10 μ l,4 h 后用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长处测定吸光度值,实验重复进行 3 次。

4) Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率。按照细胞分组,调整细胞浓度按 5*10⁸/mL 孔接种于 6 孔板,每组设 3 个复孔,将细胞培养 24 h,待细胞贴壁后收集细胞。使用 PBS 溶液冲洗细胞 2 次,使细胞悬浮于 400 μ l 结合缓冲液,加入 Annexin V 后 10 min 再加 10 μ l PI,静置 15 min 后使用仪器检测内皮细胞早期凋亡率,对测得的结果进行分析。以上实验重复进行三次。

5) 统计学分析。将所得数据使用 SPSS10.0 软件进行分析,以 $\bar{X} \pm s$ 表示结果,五组均数比较用 One-Way ANOVA 分析, LSD-t 法检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 依折麦布和辛伐他汀对血管内皮细胞活力的影响

TNF- α 可诱导脐静脉内细胞凋亡,用依折麦布和辛伐他汀干预后细胞增值率明显增加(P < 0.05),依折麦布联合辛伐他汀时,血管内皮细胞的增值率明显高于两药单用时的增值率(P < 0.05),见图 1、图 2。

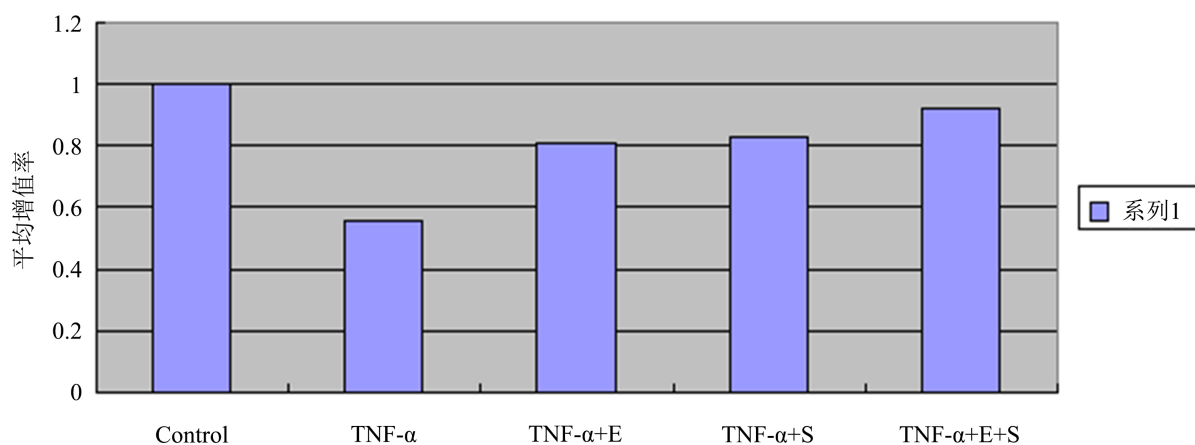


Figure 1. CCK-8 method to detect the 24 h cell proliferation rate after treatment with ezetimibe and simvastatin

图 1. CCK-8 法检测依折麦布和辛伐他汀干预 24 h 细胞增值率

组别	Control	TNF- α	TNF- α +E	TNF- α +S	TNF- α +E+S
增值率	100 ± 0.00	56 ± 2.00	82.33 ± 1.155	83.67 ± 0.577	92.00 ± 2.646

Figure 2. CCK-8 method to detect the 24 h cell proliferation rate after treatment with ezetimibe and simvastatin ($\bar{X} \pm s$)

图 2. CCK-8 法检测依折麦布和辛伐他汀干预 24 小时细胞增值率($\bar{X} \pm s$)

3.2. Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率

TNF- α 可诱导脐静脉内皮细胞凋亡, 依折麦布和辛伐他汀可保护内皮细胞凋亡, 两药联用作用明显优于两药单用时($P < 0.05$), 检测结果见图 3。

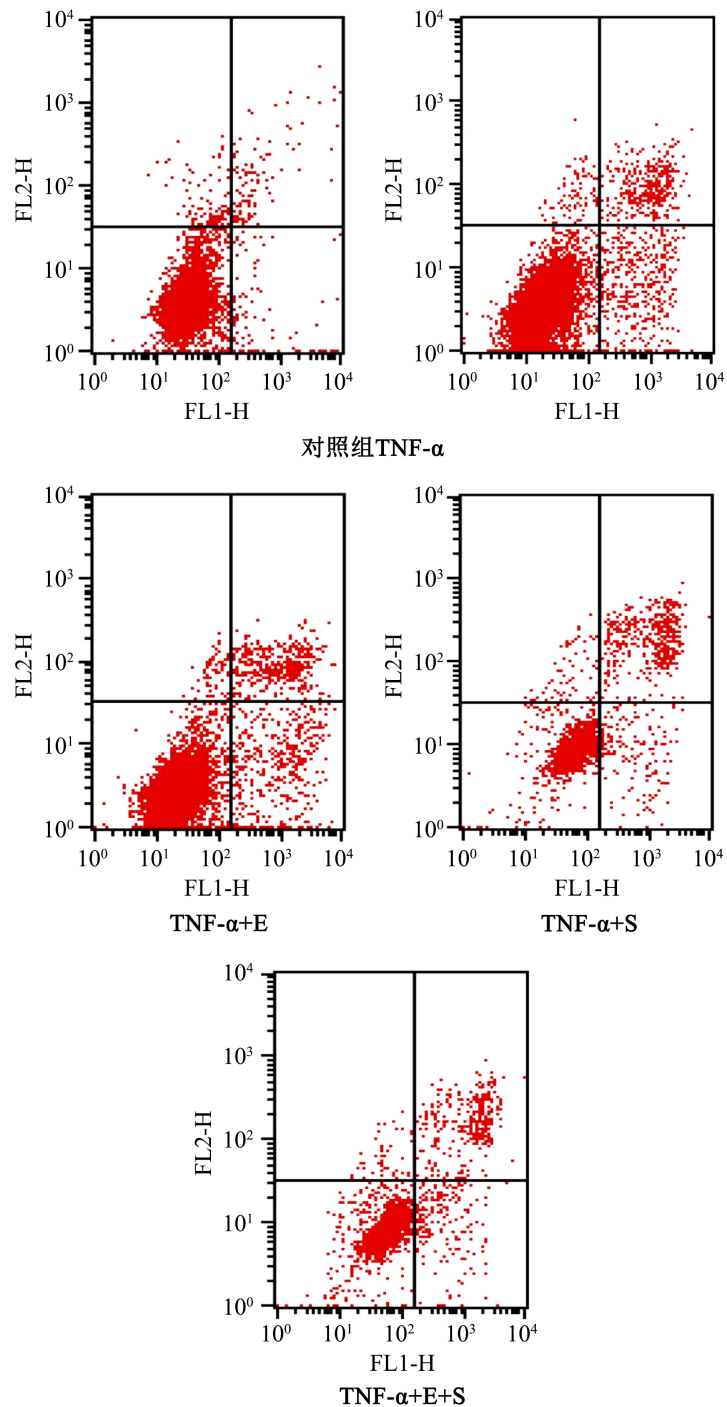


Figure 3. The rate of apoptosis measured by flow cytometry and the effect of ezetimibe and simvastatin on apoptosis

图 3. 流式细胞仪测细胞凋亡率及依折麦布和辛伐他汀对凋亡的影响

4. 结果讨论

内皮功能损伤可能是动脉粥样硬化的始动环节, 内皮细胞的凋亡可以使血管壁对动脉粥样硬化的易感性增加[7]。与此同时, 内皮的凋亡也会引起血管壁内皮细胞的更新, 进而导致内皮更新的血管壁通透性增高。遵照“平滑肌迁移学说[8]”进行推断, 内皮细胞损伤时, 脂质、单核细胞、平滑肌细胞将迁移至内层, 炎症细胞分泌大量炎症因子, 以上因素的综合作用, 可促进动脉粥样硬化斑块的发生、发展。有研究证实, 内皮细胞凋亡是促进血栓形成和血管内皮剥脱的诱因, 从而导致斑块破裂。还有研究已证实, 磷脂酰丝氨酸的表达增加部分导致了凋亡细胞的促凝[9]。因此, 有效保护血管内皮细胞[10], 抑制内皮细胞的凋亡, 现被认为是当前阶段预防及延缓动脉粥样硬化发生和发展的一种最有效的方法[11]。

目前, 他汀类除降脂作用外, 尚有研究已证实他汀类有保护血管内皮细胞、抑制血管内皮细胞凋亡、延缓动脉粥样硬化进展的作用。Lavi 等研究了高胆固醇血症猪的肾脏内皮祖细胞凋亡与辛伐他汀的关系[12], 证实了辛伐他汀对内皮的保护功能; Sokalska 等[13]研究发现子宫内皮细胞凋亡与辛伐他汀密切相关。因此, 新的实验思路将依折麦布与辛伐他汀共同作用于 HUVEC, 观察其联合应用和分别单独用药对内皮细胞凋亡的影响。实验结果得出结论, 依折麦布联合辛伐他汀抑制内皮细胞凋亡、对内皮细胞的保护作用优于单用依折麦布或辛伐他汀时抑制凋亡、保护内皮细胞的作用, 与 Lavi、Sokalska 等前人研究结果相一致, 同时更加深入地证实了依折麦布联合辛伐他汀的效果, 探索了联合用药的新思路。

依折麦布联合辛伐他汀是中国专家共识推荐的降脂方案, 能更有效地降低血脂水平, 且安全性和耐受性良好。一般来说, 对于血脂轻度增高的患者, 首先建议服用辛伐他汀等他汀类的药物来降脂, 如果单纯服用他汀类的药物, 降脂效果不好的话, 可以再加用依折麦布这类的降脂药物。依折麦布和辛伐他汀都属于降低胆固醇的药物, 属于不同的降脂机制的药物。依折麦布是一种新型胆固醇吸收抑制剂, 通过附着于小肠刷状缘 NPC1L1 受体[14], 抑制肠道胆固醇的吸收, 辛伐他汀属于抑制胆固醇合成从而降低胆固醇的药物。本课题以 TNF- α 为凋亡诱导因子, 研究了依折麦布和辛伐他汀对血管内皮凋亡这一过程的作用, 证实了依折麦布联合辛伐他汀对内皮细胞凋亡有抑制作用, 且其保护作用优于分别单独使用依折麦布或辛伐他汀, 但具体抗凋亡的作用机制需要更多高质量、大样本随机对照实验进一步深入的研究。

参考文献

- [1] He, Z., He, X., Liu, M., *et al.* (2019) Simvastatin Attenuates HO-Induced Endothelial Cell Dysfunction by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecules*, **24**, Article No. 1782. <https://doi.org/10.3390/molecules24091782>
- [2] 王妮妮. 不同剂量辛伐他汀对冠心病高龄患者血管内皮功能、血脂的影响效果[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(73): 128, 130.
- [3] 张凤艳, 刘俊学, 王莉. 不同他汀类药物对冠心病患者血脂代谢和动脉硬化程度的影响[J]. 中国卫生工程学, 2020, 19(2): 291-293.
- [4] Han, S.N., Yang, W.H., Yin, J.J., *et al.* (2019) Drug Treatment of Hyperlipidemia in Chinese Patients: Focus on the Use of Simvastatin and Ezetimibe Alone and in Combination. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, **19**, 237-247. <https://doi.org/10.1007/s40256-018-00317-1>
- [5] Gordy, C., Liang, J., Pua, H. and He, Y.W. (2014) c-FLIP Protects Eosinophils from TNF- α -Mediated Cell Death *in Vivo*. *PLOS ONE*, **9**, e107724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107724>
- [6] Liang, C.L., Chen, H.J., *et al.* (2019) Simvastatin and Simvastatin-Ezetimibe Improve the Neurological Function and Attenuate the Endothelial Inflammatory Response after Spinal Cord Injury in Rat. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **49**, 105-111.
- [7] Csizsar, A., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., *et al.* (2019) Role of Endothelial NAD Deficiency in Age-Related Vascular Dysfunction. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **316**, H1253-H1266. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00039.2019>
- [8] Uwitonze, A.M. (2018) Role of Magnesium in Vitamin D Activation and Function. *The Journal of the American Os-*

-
- teopathic Association*, **118**, 181-189. <https://doi.org/10.7556/jaoa.2018.037>
- [9] Paone, S., Baxter, A.A. and Hulett, M.D. (2019) Endothelial Cell Apoptosis and the Role of Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Progression of Atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **76**, 1093-1106. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2983-9>
- [10] Yu, W.M., *et al.* (2021) Endothelial Nox4 Dysfunction Aggravates Atherosclerosis by Inducing Endoplasmic Reticulum Stress and Soluble Epoxide Hydrolase. *Free Radical Biology and Medicine*, **164**, 44-57.
- [11] 张稣亚, 刘红霞, 何朝勇. 血管内皮细胞功能紊乱与动脉粥样硬化研究进展[J]. *药学进展*, 2021, 45(10): 775-783.
- [12] Lavi, R., Zhu, X.Y. and Alejandro, R. (2010) Simvastatin Decreases Endothelial Progenitor Cell Apoptosis in the Kidney of Hypertensive Hypercholesterolemic Pigs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 976-983. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201475>
- [13] Sokalska, A., Wong, D.H., Cress, A., *et al.* (2010) Simvastatin Induces Apoptosis and Alters Cytoskeleton in Endometrial Stromal Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **95**, 3453-3459. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0072>
- [14] Nihei, W., Nagafuku, M., Hayamizu, H., *et al.* (2018) NPC1L1-Dependent Intestinal Cholesterol Absorption Requires Ganglioside GM3 in Membrane Microdomains. *Journal of Lipid Research*, **59**, 2181-2187. <https://doi.org/10.1194/jlr.M089201>