

他汀类药物对血管平滑肌细胞的直接作用及其意义

覃 军, 李爱民 综述, 何作云 审校

(第三军医大学附属新桥医院心内科, 重庆 400037)

[主题词] 肌, 平滑, 血管; HMG-CoA 还原酶抑制剂; 增殖; 迁移; 凋亡

[摘 要] 新近研究发现, HMG-CoA 还原酶抑制剂不仅是强力调血脂药物, 同时还具有广泛的非调脂作用(如直接改善内皮功能、抑制血小板聚集、抗炎症反应等), 其抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移、影响其凋亡及胶原合成的作用, 在他汀类药物抗动脉粥样硬化中占有重要地位。

[中图分类号] Q253

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成的二个关键事件是动脉壁内平滑肌细胞的增殖与迁移和脂质沉着。他汀类药物通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶、阻断 HMG-CoA 还原成 3- 甲基- 3, 5- 二羟戊酸(MVA), 导致胆固醇生成减少。然而, MVA 不仅是合成胆固醇的前体, 同时也是多种非甾体

化合物的前体, 而后者对于细胞的正常生长和活性的维持是必不可少的。已有许多实验表明他汀类药物能直接干预血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)在 As 形成中的许多环节, 且与其调脂作用无关。

1 对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

研究表明, 除普伐他汀外, 氟伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀和西伐他汀(cerivastatin)均呈剂量依赖性抑制鼠和人

[作者简介] 覃 军, 男, 1962 年出生, 主治医师, 心血管内科博士研究生。 李爱民, 男, 1965 年出生, 副教授, 博士。 何作云, 教授, 博士研究生导师。

VSMC 增殖。体外同一浓度他汀类药物完全性抑制胆固醇的生物合成时, 大约相当于 50% 抑制 VSMC 的增殖^[1]。25% 抑制人股动脉 VSMC 增殖的他汀类药物浓度(IC25) 比较如下: 西伐他汀 < 洛伐他汀 $\approx$ 辛伐他汀 $\approx$ 阿伐他汀(atorvastatin) $\approx$ 氟伐他汀 < 普伐他汀^[2]。MVA 及由 MVA 所合成的非甾族产物类异戊二烯是体外 VSMC 生长的必需成分。流式细胞仪检测发现, 10^{-4} mol/L 的氟伐他汀抑制人和猪 VSMC G/S 期转换, 使其仅为对照组的 50%。预先加入 1 mmol/L 的 MVA 或全反式双三醇、全反式香叶醇(0.1~0.5 μ mol/L) 能完全或部分阻断氟伐他汀对 VSMC 增殖动力学和细胞生长周期的影响, 或呈剂量依赖的方式逆转氟伐他汀对 VSMC 生长的抑制; 而预先加入胆固醇、低密度脂蛋白无此作用。提示被异戊二烯所修饰的蛋白质与细胞的增殖有关, 支持新近提出由 MVA 衍生的类异戊二烯(如全反式双三醇或者全反式香叶醇) 能通过与生长因子信号传导途径相关的几种蛋白质共价结合而影响其活性^[4]。而 MVA 代谢通路中的辅酶 Q、2-cis 全反式香叶醇(多萜醇的重要前体) 和角鲨烯均不能逆转他汀类药物抑制 VSMC 增殖的作用, 表明上述产物不参与细胞增殖的调节^[1,3]。Negre 等^[2]进一步研究发现预先在培养液中加入 MVA 能完全阻断辛伐他汀对 VSMC 线粒体脱氢酶活性及 DNA 合成的抑制作用, 并且辛伐他汀抑制 VSMC 增殖的同时伴有 ras 蛋白的翻译后修饰, 认为可能与抑制 ras 蛋白的法呢酯化(farnesylation) 有关。

p21 蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase inhibitor, CdkI) 抑制剂, 其与 CdkI、细胞周期蛋白(cyclin) 或 cyclin-CdkI 复合物结合, 抑制 CdkI 活性而参与细胞的生长、分化、衰老及死亡。新近发现洛伐他汀在抑制人 VSMC 增殖时, p21 蛋白表达显著增多^[5], 提示他汀类药物抑制 VSMC 增殖与诱导 p21 表达、抑制 CdkI 有关。Laufs 等^[6]则提出他汀类药物通过阻断 rho GTP 酶所诱导的 p27 下调, 抑制 VSMC 的增殖。他们发现与血小板源生长因子(PDGF) 单独作用诱导 VSMC 增殖相比, 1~10 mmol/L 辛伐他汀在抑制类异戊二烯合成的同时, 能 95% 以上抑制 PDGF 诱导的 VSMC 的 DNA 合成、90% 抑制 VSMC 中视网膜母细胞瘤基因产物的超磷酸化, 分别 80% $\pm$ 5%、50% $\pm$ 3% 和 48% $\pm$ 3% 抑制三种细胞周期依赖性激酶(CdkI-2, -4, -6) 的活性, 同时使 p27 增加 20 倍, 而 p16、p21 和 p53 无变化; 并且辛伐他汀上调 p27、抑制 Rho(而非 Ras) 的作用完全能被焦磷酸牦牛儿酯(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 阻断, 而焦磷酸法呢酯(farnesyl pyrophosphate, FPP) 则无此作用。鉴于视网膜母细胞瘤是 G1 期 cyclin-CdkI 介导的磷酸化的共同限速底物, 提示由 rho GTP 酶介导的 p27 下调参与 PDGF 诱导的 VSMC 的 DNA 合成, 并且 p27 上调可能是他汀类药物直接抑制 VSMC 增殖的机理之一。

除通过抑制 HMG-CoA 还原酶、耗竭 MVA 途径外, 研究还提示他汀类药物抑制 VSMC 增殖和迁移可能与其直接调节 VSMC 内 Ca^{2+} 有关^[7]。此外, 辛伐他汀阻断 PDGF 和碱性成纤维细胞生长因子诱导的同步化生长的 VSMC DNA 合成及增殖, 但并不影响胎牛血清所诱导的同步化成纤维细胞

DNA 合成。提示辛伐他汀阻断细胞生长周期的不同时期, 并且此作用与不同的细胞类型及细胞生长信号不同的传导通路激活有关。

尽管多数研究表明普伐他汀对 VSMC 增殖无影响, 但 Terano 等^[8]采用流式细胞仪分析发现普伐他汀也能呈剂量依赖的方式诱导 VSMC G1 期静止。加入 MVA 则能恢复细胞的生长周期; MVA 的三种中间代谢产物 GGPP、FPP 和异戊烯醇焦磷酸酯(isopentenyl pyrophosphate, IPP) 中, 仅 GGPP 能逆转普伐他汀对细胞增殖的抑制作用、恢复 DNA 合成。普伐他汀能抑制 Rho 小 GTP 酶(Rho small GTPase) 从细胞质移位到细胞膜, 而加入 GGPP 则能使 Rho 小 GTP 酶被香叶草基牦牛儿酯酯化, 并在细胞周期的 G1/S 转变中易位至细胞膜。

普伐他汀能经主动运输机制进入肝细胞, 达到抑制全身性胆固醇合成的效果。但作为亲水性药物, 普伐他汀可能由于通过浆膜层扩散的能力弱, 因而其对 VSMC 增殖抑制作用也甚为微弱^[9]。

2 对血管平滑肌细胞迁移的抑制作用

Corsini 等^[10]发现西伐他汀抑制鼠 VSMC 迁移呈浓度依赖性, 预先加入 MVA 能完全阻断之, 双三醇和香叶草基醇能部分阻断之; 除普伐他汀外, 氟伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀和西伐他汀均呈剂量依赖性地抑制纤维蛋白原所诱导的鼠 VSMC 的迁移, 而预先加入 MVA、全反式双三醇或者全反式香叶醇则能完全性阻断他汀类药物的抑制作用^[11]。证明类异戊二烯在 VSMC 迁移中具有特异性地调节作用。

Hidaka 等^[11]采用改良的 Boyden 小室研究发现, 辛伐他汀能抑制 PDGF 所诱导猪 VSMC 迁移; 若在培养液中预先加入 MVA 则能阻断辛伐他汀的抑制作用, 而 LDL 则不能。因此认为异戊烯化蛋白质可能与 VSMC 迁移信号传导通路有关。显然, 他汀类药物直接抑制 VSMC 迁移是其防治 As 性内膜增生的机理之一。

3 对血管平滑肌细胞胶原合成的影响

血管壁细胞外基质是决定粥样斑块稳定性和大小的重要因素。在培养的人髂动脉 VSMC 中加入辛伐他汀(0.05~20 mmol/L)、洛伐他汀(50 mmol/L) 和普伐他汀(1~100 mmol/L) 培养 24~72 h 后, 采用 Northern blotting 检测细胞外基质蛋白凝血栓蛋白-1、粘连蛋白、I 型胶原、biglycan RNA 及细胞因子 TGF- β 1 的 mRNA 表达, 通过免疫荧光法检测细胞外基质蛋白, 以 BrDU-ELISAs、MTT 法及细胞计数评价细胞增殖及活力。发现加入洛伐他汀(浓度低至 1 mmol/L) 后联合培养 24 h, 凝血栓蛋白-1 mRNA 表达明显下降。而预先加入 MVA 则能完全抵消这种作用。在抑制细胞增殖的同时, 相同浓度范围的洛伐他汀使凝血栓蛋白-1 的分泌减少, 但对粘连蛋白无影响。在加入高浓度有毒性洛伐他汀较长时间后才出现 I 型胶原、biglycan 的 mRNA 表达下降。辛伐他汀的作用与洛伐他汀相似, 而具有亲水性的普伐他汀则对细胞外基质的产生无影响^[12]。对斑块稳定而言, VSMC 所分泌的细胞

外基质中 I 型胶原、biglycan 更为重要,而他汀类药物(辛伐他汀和洛伐他汀)对其影响甚微。

综上所述,在细胞培养实验中大多数他汀类药物(阿伐他汀、西伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀除外),都能抑制血小板源生长因子和纤维蛋白原诱导的 VSMC 增殖及移行。普伐他汀对 VSMC 增殖的这种作用以及普伐他汀不影响 VSMC 分泌细胞外基质,对斑块破溃的修复而言,可能是个优点^[13]。

4 可能诱导血管平滑肌细胞凋亡

Guijarro C 等^[14]在体外培养的人和鼠 VSMC 中加入不同浓度的 HMG-CoA 还原酶抑制剂。以形态学、流式细胞仪和 DNA 电泳图谱法检测细胞凋亡。发现亲脂性的他汀类药物诱导 VSMC 凋亡并呈剂量依赖性,预先加入 MVA、GGPP 和 FPP 能完全阻断此作用,而胆固醇及其它 MVA 代谢物则不能。表明类异戊二烯对平滑肌凋亡也具有重要意义。此外,他汀类药物在诱导凋亡的同时伴随着 Rho B 的异戊烯化(prenylation)的抑制。Baetta R 等^[15]也发现,加入浓度范围为 0.1~ 50 mmol/L 的阿伐他汀、氟伐他汀、普伐他汀和辛伐他汀 24 h 后,均呈剂量依赖性地抑制 VSMC 增殖,使细胞增殖滞留在 G1 和 G2/M 期;培养 48 h 时上述他汀类药物对 VSMC 增殖的抑制作用最强;而当培养延迟至 72 h,则出现细胞凋亡,预先加入外源性的 MVA 则能完全阻断此作用。当培养液中有内皮细胞生长添加物(endothelial cell growth supplement)存在时,1~ 10 mmol/L 洛伐他汀均抑制 VSMC 增殖,同时前者诱导相当数量 VSMC 凋亡,而后者仅诱导少数 VSMC 发生凋亡^[9]。显然,他汀类药物的这种促 VSMC 凋亡的作用对于临床防治再狭窄具有积极意义。

5 结束语

他汀类药物对 HMG-CoA 还原酶的抑制可能产生多重生物学效应。直接影响 VSMC 增殖、迁移、基质分泌及凋亡是他汀类药物的非调脂性抗 As 作用之一。新近研究表明他汀类药物的其他抗 As 作用也与抑制 HMG-CoA 还原酶有关,包括抑制巨噬细胞产生基质金属蛋白酶^[16]、上调内皮细胞一氧化氮合酶活性^[17],调节天然杀伤 T 淋巴细胞功能、细胞粘附及血小板血栓形成等。因此,他汀类药物的抗 As 作用也可能涉及其他机制。可见,加强对他汀类药物调节血脂以外作用的研究,将有助于进一步阐明 As 发生及他汀类药物抗 As 作用机理,并为寻找更有效抗 As 方法提供有益的线索。

参考文献

- [1] Bellosta S, Bernini F, Ferri N, et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **137** (Suppl): S101- 109
- [2] Negre AP, van Vliet AK, van Erck M, et al. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1345**(3): 259- 68

- [3] Rogler G, Lackner KJ, Schmitz G. Mevalonate is essential for growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro [J]. *Basic Res Cardiol*, 1995, **90**(6): 443- 450
- [4] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, **343**: 425- 430
- [5] Muller C, Kiehl MG, van de Loo J, et al. Lovastatin induces p21WAF1/Cip1 in human vascular smooth muscle cells: influence on protein phosphorylation, cell cycle, induction of apoptosis, and growth inhibition [J]. *Int J Mol Med*, 1999, **3**(1): 63- 68
- [6] Laufs U, Marra D, Node K, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced downregulation of p27 (Kip1) [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(31): 21 926- 931
- [7] Escobales N, Castro M, Altieri PJ, et al. Simvastatin releases Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive pool and inhibits Ins P₃-dependent Ca^{2+} mobilization in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, **27**(3): 383- 391
- [8] Terano T, Shiina T, Noguchi Y, et al. Geranylgeranylpyrophosphate plays a key role for the G1 to S transition in vascular smooth muscle cells [J]. *J Atheroscler Thromb*, 1998, **5**(1): 1- 6
- [9] Scott W. Hydrophilicity and the differential pharmacology of pravastatin [M]. In: Wood C (editor). *Lipid Management: Pravastatin and the Differential Pharmacology of HMG-CoA Reductase Inhibitors*. London Round Table Series no. 16. London: Royal Society of Medicine Service, 1989; 17- 25
- [10] Corsini A, Arnaboldi L, Raiteri M, et al. Effect of the new HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin (BAY W6228) on migration, proliferation and cholesterol synthesis in arterial myocytes [J]. *Pharmacol Res*, 1996, **33**(1): 55- 61
- [11] Hidaka Y, Eda T, Yonemoto M, et al. Inhibition of cultured vascular smooth muscle cell migration by simvastatin (MK-733) [J]. *Atherosclerosis*, 1992, **95**(1): 87- 94
- [12] Riessen R, Axel DI, Fenchel M, et al. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells [J]. *Basic Res Cardiol*, 1999, **94**(5): 322- 332
- [13] Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction [J]. *JAMA*, 1998, **279**(20): 1 643- 650
- [14] Guijarro C, Blanco Colio LM, Massy ZA, et al. Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells [J]. *Kidney Int Suppl*, 1999, **71**: S88- 91
- [15] Baetta R, Donetti E, Comparato C, et al. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells [J]. *Pharmacol Res*, 1997, **36**(2): 115- 121
- [16] Bellosta S, Via D, Canavesi M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**(11): 1 671- 678
- [17] Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(37): 24 266- 271

(此文 2000- 06- 27 收到, 2000- 11- 23 修回)

(此文编辑 胡必利 朱雯霞)