

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3749(2001)-05-0388-03

HMG-CoA 还原酶抑制剂对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞增殖的作用

林志鸿¹, 吴可贵¹, 谢良地¹, 李庚山², 许昌声¹

(1. 福建医科大学附属第一医院 福建省高血压研究所, 福州 350005;

2. 武汉大学医学部亚太医院心内科, 武汉 430060)

[主题词] 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 抑制剂; 甲羟戊酸; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖

[摘要] 探讨羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及其机制。培养自发性高血压大鼠主动脉血管平滑肌细胞, 应用不同浓度 HMG-CoA 还原酶抑制剂洛伐他汀、辛伐他汀和氟伐他汀及血管紧张素 E 、甲羟戊酸等干预后, 进行细胞计数和 ^3H -TdR 掺入率测定。结果发现, 洛伐他汀、辛伐他汀和氟伐他汀均呈浓度依赖性抑制小牛血清和血管紧张素 E 诱导的血管平滑肌细胞数和 ^3H -TdR 掺入率增加; 但以氟伐他汀的抑制作用最大, 辛伐他汀次之, 洛伐他汀最小。 10^{-3} mol/L 甲羟戊酸几乎完全逆转洛伐他汀、辛伐他汀和氟伐他汀对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用。提示此 3 种 HMG-CoA 还原酶抑制剂均能抑制高血压大鼠血管平滑肌细胞增殖, 但作用并不完全相同; 甲羟戊酸代谢途径可能参与血管平滑肌细胞增殖过程。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats

LIN Zhi-Hong¹, WU Ke-Gui¹, XIE Liang-Di¹, LI Geng-Shan², and XU Chang-Sheng¹(First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Hypertension Research Institute, Fuzhou 350005; ²Department of Cardiology, Asia-Pacific Hospital, Wuhan University of Medicine, Wuhan 430060, China)**MeSH** Hydroxymethylglutaryl CoA Reductases; Inhibitors; Mevalonic Acid; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferation**ABSTRACT** **Aim** To investigate the effects of fluvastatin, simvastatin and lovastatin on the proliferation of vascular smooth muscle cells derived from spontaneously hypertensive rats. **Methods** The aorta smooth muscle cells (ASMC) from spontaneously hypertensive rats were cultured, and proliferation of cells were detected by cell number counting and ^3H -thymidine (^3H -TdR) incorporation after incubation with Ang E , fluvastatin, simvastatin, lovastatin and mevalonate acid. **Results** The increased cell number and ^3H -TdR incorporation stimulated with 2% FCS and Ang E (10^{-6} mol/L) were significantly inhibited by three agents in a concentration dependent manner ($10^{-5} \sim 10^{-7}$ mol/L), but the inhibitory efficacy was fluvastatin > simvastatin > lovastatin. The inhibitory effects were completely reversed by mevalonate acid (10^{-3} mol/L). **Conclusions** The proliferation of SHR ASMC was inhibited by fluvastatin, simvastatin and lovastatin, which suggested that mevalonate acid pathway may play an important role in the proliferation of SHR ASMC.

3-羟基, 3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂是一类强效的降胆固醇药物, 对冠心病和动脉粥样硬化的有益作用已为大规模的临床试验所证实^[1]。但研

究表明抑制细胞内具有信号转导作用的蛋白质, 直接影响细胞内信号转导、细胞增殖、分化、迁移和细胞凋亡等可能具有更为重要的价值^[2]。而高血压所引起的各种并发症, 如动脉粥样硬化、缺血性心脏病及中风等, 归根结底都是由于高血压时血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖所致。因此, 本文观察 HMG-CoA 还原酶抑制剂——氟伐他汀、辛伐他汀及洛伐他汀, 对在动脉粥样硬化过程中起重要作用的 VSMC 增殖的影响, 并探讨可能的作用机制。

[基金项目] 福建省教委科研基金(00B008)。

[作者简介] 林志鸿, 男, 1970 年出生, 福建晋江人, 在读博士研究生, 主要从事高血压、冠心病的临床与基础研究工作, 研究方向为高血压的病理生理和细胞、分子生物学。吴可贵, 男, 1936 年出生, 福建仙游人, 教授、主任医师, 硕士和博士研究生导师, 现任福建省高血压研究所所长, 主要从事高血压、冠心病的流行病学、临床和基础研究工作。

1 材料与方法

1.1 动物和药品

实验所用大鼠由本研究所动物室自行繁殖、提供。RPMI1640 干粉(Gibco 公司),小牛血清(FCS,上海华美生物工程公司),胰蛋白酶(DIFCO 公司),血管紧张素 $\text{I}\alpha$ (angiotensin $\text{I}\alpha$, Ang $\text{I}\alpha$)、甲羟戊酸(mevalonic acid, Meva)(Sigma 公司), ^3H -胸腺嘧啶核苷酸(^3H -TdR, 中国原子能科学研究院), Alpha Smooth Muscle Actin 单克隆抗体、荧光标记的兔抗鼠 IgG(日本东京大学医学部第二内科胡文养博士惠赠), 氟伐他汀粉剂(fluvastatin, Flu, 北京诺华制药有限公司提供), 辛伐他汀(simvastatin, Sim)及洛伐他汀(lovastatin, Lov)粉剂(由美国默沙东制药公司提供)。

1.2 胸主动脉血管平滑肌细胞的培养及分型

取 8 周龄雄性自发性高血压大鼠(SHR)胸主动脉, 按文献[3]记录方法培养胸主动脉 SMC; 采用 Alpha Smooth Muscle Actin 单克隆抗体的免疫细胞荧光鉴定平滑肌细胞, 细胞纯度达 95% 以上。实验用第 3~5 代胸主动脉 SMC。

1.3 细胞增殖情况和 DNA 合成率的测定

第 3~5 代培养的胸主动脉 SMC 经 0.25% 胰酶消化后, 调成约 2×10^7 细胞/L 浓度, 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL, 培养 24 h 贴壁后, 换用无血清 RPMI1640 培养液, 继续培养 48 h, 使胸主动脉 SMC 处于 G_0/G_1 期, 分别加入以下药物:

2% FCS、2% FCS+ Ang $\text{I}\alpha$ (10^{-6} mol/L), 30 min 后加不同浓度的 Flu (10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L)、Sim (10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L) 和 Lov (10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L)。 10^{-3} mol/L Meva 在 Ang $\text{I}\alpha$ 前 30 min 加入。以上各组实验中, 干预药物和胸主动脉 SMC 共孵育 4 天后, 在血球计数板上行细胞计数, 观察胸主动脉 SMC 的增殖情况。

用于 DNA 合成率测定的细胞, 在最后干预药物加入时, 同时加入 1 mCi/L 的 ^3H -TdR, 共育 30 h 后, 0.25% 胰酶消化, 在 0.45 μm 微孔滤膜上负压抽滤, 生理盐水和 10% 三氯醋酸冲洗滤膜, 室温凉干后置入闪烁杯中, 加入 ppo/popop/二甲苯闪烁液 4 mL, 静置过夜后, 在液体闪烁计数器(Tricarb 2300, Packard Co, Lit, USA)上进行放射性强度的测定。每个数值均做 3 复管, 取均值, 重复 8 次实验。

1.4 统计学处理

实验结果数值表示为均数 \pm 标准差形式。组间差异比较用多个样本均数比较的 ANOVA 方差分析, 两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验或非配

对 t 检验。 $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 洛伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀对动脉平滑肌细胞增殖和 ^3H -TdR 掺入率的影响

$10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 的 Flu、Sim 及 Lov 均呈浓度依赖性抑制 2% FCS 和 Ang $\text{I}\alpha$ 促 SMC 增殖的作用(图 1, Figure 1), 但以氟伐他汀的抑制作用最大, 辛伐他汀次之, 洛伐他汀最小。 10^{-5} mol/L Flu、Sim 及 Lov 对 2% FCS 诱导的 SHR 细胞数和 ^3H -TdR 掺入率增加的抑制率分别为 62%、39%、26% ($P < 0.01$) 和 52%、49%、19% ($P < 0.01$); 对 10^{-6} mol/L Ang $\text{I}\alpha$ 诱导的 SHR 细胞数和 ^3H -TdR 掺入率增加的抑制率分别为 56%、37%、28% ($P < 0.01$) 和 64%、51%、19% ($P < 0.01$)。表明极低浓度 (10^{-5} mol/L) 的 Flu、Sim 及 Lov 即显著抑制了 SMC 增殖和 DNA 的合成, 但三者的抑制程度并不完全相同。

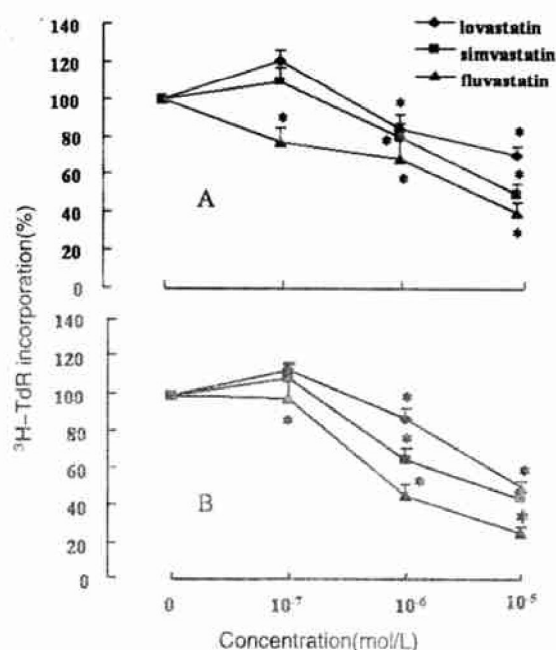


图 1. 氟伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀对血管平滑肌细胞增殖及 ^3H -TdR 掺入率的作用. A: 2% 小牛血清诱导; B: 2% 小牛血清+ 10^{-6} mol/L 血管紧张素 $\text{I}\alpha$ 诱导. * : $P < 0.01$

Figure 1. Effects of Flu, Sim and Lov on 2% FCS (A) and Ang $\text{I}\alpha$ (B)-induced SHR ASMC proliferation. * : $P < 0.01$

2.2 甲羟戊酸对洛伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀抑制动脉平滑肌细胞增殖和 ^3H -TdR 掺入率的影响

从图 2(Figure 2) 可见, 10^{-3} mol/L Meva 几乎完全逆转了 10^{-5} mol/L Flu、Sim 及 Lov 对 2% FCS 和 10^{-6} mol/L Ang $\text{I}\alpha$ 诱导的 SMC 细胞数和 ^3H -TdR 掺入率的抑制作用 (70% ~ 100%) ($P < 0.01$)。

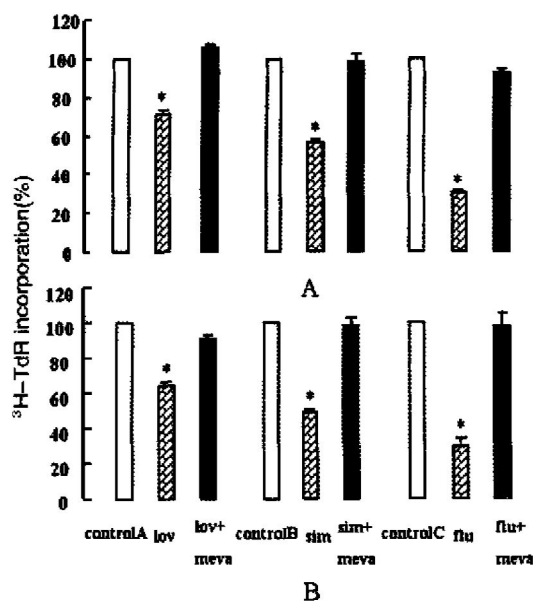


图2. 甲羟戊酸(10^{-3} mol/L)对氟伐他汀、辛伐他汀和洛伐他汀抑制动脉平滑肌细胞增殖和 ^3H -TdR掺入率的影响。

A: 2% 小牛血清诱导; B: 2% 小牛血清 + 10^{-6} mol/L 血管紧张素 II 诱导。* : $P < 0.01$

Figure 2. Effects of 10^{-5} mol/L Flu, Sim, Lov and Meva on 2% FCS (A) and 10^{-6} mol/L Ang II (B)-induced SHR ASMC proliferation. * : $P < 0.01$.

3 讨论

高血压时, VSMC 在各种因素, 如牵拉、损伤、多种生长因子和血管活性物质的刺激下, 由收缩表型向合成表型转变, 并由中膜向内膜下迁移、增殖, 产生大量的细胞外基质, 从而促进了高血压及动脉粥样硬化等病变的发生与发展^[4,5]。因此, 研究高血压时 VSMC 异常增殖的机制, 并采取有效的措施抑制其过度增殖和分泌细胞外基质, 可预防和减少高血压的各种并发症^[6]。

HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成途径中的限速酶, 催化乙酰辅酶 A 合成甲羟戊酸, 后者进一步合成胆固醇和非甾醇类异戊二烯等二类终产物。非甾醇类异戊二烯控制 DNA 合成的起始机制和细胞生长。其中法尼酯焦磷酸等在特异转移酶催化下, 与 ras 等小 GTP 结合蛋白羧基末端的半胱氨酸巯基共价结合, 形成硫醚键, 发生异戊二烯化, 是这些蛋白质翻译后成熟所必需^[7]。正常情况下, 只有经过异戊二烯化的 P21 ras 蛋白等才能固定于浆膜的内侧面发挥生物学活性, 通过 ras 依赖的细胞内信号转导通路, 启动核内原癌基因的转录和翻译, 诱导 DNA 合成, 促进细胞的增殖和分化^[8]。故我们推测, Flu、Sim 及 Lov 由于竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶, 减少 Meva 及其衍生物生成, 干扰 P21 ras 蛋白异

戊二烯化, 影响其生物学功能的发挥, 从而达到抑制胸主动脉 SMC 增殖的作用。

我们的研究还发现一个令人感兴趣的现象: 当 Flu 与胸主动脉 SMC 共育 72 h 后, 在倒置显微镜下, 可见到部分贴壁的胸主动脉 SMC 呈圆形或类圆形, 从培养瓶壁脱落, 但未见细胞碎片的出现, 随着干预时间的延长, 这种改变愈明显(结果另文发表)。有报道 HMG-CoA 还原酶抑制剂可引起胸主动脉 SMC 和成纤维细胞类似的上述变化, 推测可能与此药物的长时间干预, 引起细胞凋亡而非细胞毒性所致, 因为此时细胞内线粒体脱氢酶的活性和 ATP 含量与细胞数相比并无明显变化^[6,7]。

因此 Meva 对细胞增殖和 DNA 复制是必需的, Meva 代谢与细胞跨膜信号转导途径相关, 除作为结构性胆固醇前体外, 更重要的是在调节细胞增殖和 DNA 合成中起直接作用。对此现象的深入研究, 有望为高血压血管肥厚的逆转、动脉粥样硬化、肾小球硬化和恶性肿瘤的治疗开辟出新的途径。

参考文献

- [1] Hilleman DE, Phillips JO, Mohiuddin SM, et al. A population-based treatment target pharmacoeconomic analysis of HMG-CoA reductase inhibitors in hypercholesterolemia [J]. *Clin Ther*, 1999, **21**(3): 536-552
- [2] Corsini A. Direct effects of statins on the vascular wall [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **31**(5): 773-778
- [3] Chamley-Champbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle in culture [J]. *Physiol Rev*, 1979, **59**(1): 1-61
- [4] Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia [J]. *Physiol Rev*, 1979, **59**(1): 1-61
- [5] Kamide K, Hori MT, Zhu JH, et al. Insulin and insulin-like growth factor I promotes angiotensinogen production and growth in vascular smooth muscle cells [J]. *J Hypertens*, 2000, **18**(8): 1 051-056
- [6] Stepien O, Iouzalet L, Herembert T, et al. Amlodipine and vascular hypertrophy [J]. *Int J Cardiol*, 1997, **62**: s79-s84
- [7] Miquel K, Pradines A, Farre G, et al. Farnesol and geranylgeraniol induce actin cytoskeleton disorganization and apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **225**: 869-875
- [8] Singh SV, Mohas RR, Agrawal R, et al. Novel anticarcinogenic activity of an organosulfide from Garlic: inhibition of H-ras oncogene transformed tumour growth in vivo by disulfide is associated with inhibition of p21ras processing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **225**: 660-665

(此文 2001-01-20 收到, 2001-09-26 修回)

(此文编辑 朱雯霞)