

辛伐他汀对大鼠血管外膜成纤维细胞增殖 迁移和胶原合成的影响

金培印, 马业新, 高波, 周强

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 辛伐他汀影响血管外膜成纤维细胞增殖和胶原合成; 四氮唑蓝比色法; 血管外膜成纤维细胞; 血管重塑; 细胞增殖

[摘要] 为观察辛伐他汀对血管外膜成纤维细胞增殖、迁移和胶原合成的影响, 用组织贴块法培养 SD 大鼠的血管外膜成纤维细胞, 以四氮唑蓝比色法测定细胞增殖, 以 Sarkar 方法测定血管外膜成纤维细胞迁移距离, 以³H-脯氨酸掺入法测定胶原合成。结果发现, 随着辛伐他汀浓度增高血管外膜成纤维细胞的 A490 值呈递减趋势, 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵和 10⁻⁴ mol/L 组的 A490 值分别为 0.291±0.011、0.265±0.006、0.234±0.008 和 0.214±0.006, 与对照组(0.335±0.018) 差异显著(P 均<0.01); 随着辛伐他汀浓度增高血管外膜成纤维细胞的迁移距离呈递减趋势, 10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵和 10⁻⁴ mol/L 组的迁移距离分别为 6.5±1.1 mm、5.3±1.2 mm、4.1±1.0 mm 和 2.9±0.9 mm, 与对照组(8.1±1.8 mm) 差异显著(P 均<0.01)。随着辛伐他汀浓度的增高的³H-脯氨酸掺入率呈递减趋势。10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵及 10⁻⁴ mol/L 组血管外膜成纤维细胞的³H-脯氨酸掺入率分别为(cpm/5000 细胞) 385±51、272±48、161±38 和 141±36, 与对照组(655±58) 差异显著(P 均<0.01)。此结果提示, 辛伐他汀可以剂量依赖地抑制血管外膜成纤维细胞增殖、迁移和胶原合成, 这可能对改善血管重塑有一定作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of simvastatin on the proliferation and migration of rat adventitial fibroblasts

JIN Pei-Yin, MA Ye-Xin, GAO Bo, and ZHOU Qiang

(Department of Cardiology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Vascular Adventitial Fibroblast; Proliferation and Migration; Vascular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of simvastatin on the proliferation and migration of rat adventitial fibroblasts as well as collagen synthesis. **Methods** Isolated vascular adventitial fibroblast (VAF) of Sprague-Dawley (SD) rats were cultured. VAF proliferation was measured by thiazolyl (MTT) blue assay. The migration of VAF was determined by Sarkar's technique. Collagen synthesis was measured by ³H-proline uptake test. **Results** (1) MTT colorimetry showed the A490 values were 0.291±0.011, 0.265±0.006, 0.234±0.008 and 0.214±0.006 respectively in the 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L and 10⁻⁴ mol/L simvastatin groups, all significantly lower than that in the control group (0.335±0.018, all P<0.01). (2) The distance of migration was 6.5±1.1 mm, 5.3±1.2 mm, 4.1±1.0 mm and 2.9±0.9 mm respectively in the 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L and 10⁻⁴ mol/L simvastatin groups, all significantly lower than that in the control group (8.1±1.8, all P<0.01). (3) The ³H proline uptake was (c/min) 385±51, 272±48, 161±38 and 141±36 respectively in the 10⁻⁷ mol/L, 10⁻⁶ mol/L, 10⁻⁵ mol/L and 10⁻⁴ mol/L simvastatin groups, all significantly lower than that in the control group (655±58, all P<0.01). **Conclusions** Simvastatin can effectively inhibit the proliferation, migration and collagen synthesis of rat vascular adventitial fibroblasts in a dose dependent manner which may play a role in ameliorating vascular remodeling.

血管外膜成纤维细胞(vascular adventitial fibroblasts, VAF)在血管损伤后发生增殖、迁移,分泌细胞外基质,是参与血管损伤后新内膜形成和血管重塑的重要内容^[1,2]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂(3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, HRCI)能改善经皮腔内冠状动脉成形

术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PT-CA)、再狭窄和冠状动脉粥样硬化(coronary atherosclerosis, CAs)的血管重塑^[3,4],减少心血管事件的发生率,具体机制尚不明确。本实验拟观察HRCI辛伐他汀对VAF增殖、迁移和胶原合成的影响,探讨其改善血管重塑的可能机制。

[收稿日期] 2003-08-09

[修回日期] 2003-12-20

[作者简介] 金培印, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的介入治疗, 联系电话 027-83646264, E-mail 为 Jpy740125@sina.com。高波, 硕士研究生, 研究方向为冠心病介入治疗。马业新, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脏病介入治疗和心脏力学。

1 材料和方法

1.1 材料

辛伐他汀(simvastatin)由杭州默沙东有限公司

提供; Dullbeco 基础培养液 (DMEM) 为美国 GIBCO 产品, 胰蛋白酶、四氮唑蓝 (MTT) 和二甲基亚砷 (DMSO) 为 Sigma 公司产品; 20% 胎牛血清、Vimentin 单抗和 α 肌动蛋白单抗均购于北京中山生物试剂公司; ^3H -脯氨酸购于中国原子能科学研究所。

1.2 血管外膜成纤维细胞的培养和鉴定

200~250 g 雄性 SD 大鼠 (由同济医学院实验动物中心提供), 取出胸主动脉, 剥脱外膜, 参照文献 [5, 6], 将组织剪成约 1 mm^3 左右的小块, 以大约 0.5 cm 的间距, 把每小块组织均匀放置入含少量 20% 胎牛血清的 DMEM 培养皿, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 静置 24 h, 若有少量细胞游出、贴壁, 就追加培养基继续培养。免疫组织化学显示, Vimentin 单抗染色阳性, α 肌动蛋白单抗染色阴性 (区别平滑肌细胞), 即为所需要的 VAF, 纯度达 98%。生长接近融合时按 1:3 传代, 实验采用第 3~5 代细胞。

1.3 血管外膜成纤维细胞增殖的检测

取对数生长期 VAF 接种在 96 孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度下培养 24 h 后, 换含 1% 血清 DMEM, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续孵育 24 h, 使细胞进入生长静止期, 弃上清, 分别加入 20% 胎牛血清和不同浓度的辛伐他汀, 继续培养 48 h。各组于药物刺激结束前 4 h 每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h 中止培养, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μL DM-SO, 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 然后在酶联免疫检测仪上用 490 nm 波长测吸光度 A490。

1.4 血管外膜成纤维细胞迁移距离的测定

参照 Sarkar 等^[7]的方法进行。将盖玻片置于 6 孔培养板中, 接种传代培养的 VAF, 待细胞长满后, 取出盖玻片, 在显微镜下用无菌刮刀将盖玻片上的 VAF 沿直线刮除一侧, 放回培养板中, 实验组分别加入不同浓度的辛伐他汀, 继续培养 72 h, 之后在显微镜下观察细胞的迁移情况。以测定迁移最远的 VAF 至刮线边缘的距离作为 VAF 的迁移距离。每个药物浓度观察 10 个盖玻片的细胞迁移距离, 取均值。

1.5 血管外膜成纤维细胞胶原合成的测定

以 ^3H -脯氨酸掺入法测定胶原合成。取对数生长期 VAF 接种在 96 孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度下培养使细胞接近融合。弃上清, 加入含 1% 血清 DMEM $37\text{ }^\circ\text{C}$ 继续孵育 24 h, 使细胞进入生长静止期。分别加入 20% 胎牛血清和不同浓度的辛伐他汀, 继续培养 48 h。各组于药物刺激结束前 4 h 每孔加入 ^3H -脯氨酸 92.5 MBq 和维生素 C 50 mg/L。4 h 后用 0.25% 的胰蛋白酶消化至细胞悬液, 多头细胞收集器收集细胞至玻璃纤维滤纸, 烤干。将玻璃

纤维滤纸置于闪烁计数管中, 每管加入闪烁液 0.5 mL, 液态闪烁计数仪测定放射性强度。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 软件进行统计, 组间差异采用单因素方差检验, 两两比较采用 Dunnett's 检验。

2 结果

2.1 辛伐他汀对血管外膜成纤维细胞增殖的影响

不同浓度的辛伐他汀作用 48 h 后, 测得的 VAF A490 值见表 1 (Table 1)。可见与对照组相比, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 组的 A490 值均显著降低 ($P < 0.01$); 随着辛伐他汀作用浓度的增高, A490 值减少。说明辛伐他汀可剂量依赖性抑制 VAF 的增殖 ($r = -0.6988$, $P < 0.01$)。

表 1. 辛伐他汀对血管外膜成纤维细胞增殖和胶原合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The effects of simvastatin on collagen synthesis and the proliferation of VAF.

浓度分组	A490 值	^3H -脯氨酸掺入 (c/min)
对照	0.335 \pm 0.018	555 \pm 58
10^{-9} mol/L	0.331 \pm 0.013	525 \pm 51
10^{-8} mol/L	0.325 \pm 0.016	512 \pm 48
10^{-7} mol/L	0.291 \pm 0.011 ^a	385 \pm 51 ^a
10^{-6} mol/L	0.265 \pm 0.006 ^{ab}	272 \pm 48 ^{ab}
10^{-5} mol/L	0.234 \pm 0.008 ^{abc}	161 \pm 38 ^{abc}
10^{-4} mol/L	0.214 \pm 0.006 ^{abcd}	141 \pm 36 ^{abcd}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 10^{-7} 比较; c: $P < 0.01$, 与 10^{-6} 比较; d: $P < 0.01$, 与 10^{-5} 比较。

2.2 辛伐他汀对血管外膜成纤维细胞迁移的影响

不同浓度的辛伐他汀作用 48 h 后, 测得的 VAF 迁移距离见表 2 (Table 2)。可见与对照组相比, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 组的迁移距离均显著降低 ($P < 0.01$); 随着辛伐他汀作用浓度的增高, 迁移距离减少。说明辛伐他汀可呈剂量依赖性抑制 VAF 的迁移 ($r = -0.7262$, $P < 0.01$)。

2.3 辛伐他汀影响血管外膜成纤维细胞胶原合成

不同浓度的辛伐他汀作用 48 h 后, 测得每 5 000 个 VAF 的 ^3H -脯氨酸掺入见表 1 (Table 1)。可见与对照组相比, 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 组的 ^3H -脯氨酸掺入均显著降低 ($P < 0.01$); 随着辛伐他汀作用浓度的增高, ^3H -脯氨酸掺入减少。说明辛伐他汀可呈剂量依赖性抑制 VAF 的胶原合成 ($r = -0.$

6244, $P < 0.05$ 。

表 2. 辛伐他汀对血管外膜成纤维细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The effects of simvastatin on the migration of VAF

浓度分组	n	迁移距离(mm)
对照	10	8.5 ± 1.3
10 ⁻⁹ mol/L	10	8.1 ± 1.8
10 ⁻⁸ mol/L	10	7.8 ± 1.4
10 ⁻⁷ mol/L	10	6.5 ± 1.1
10 ⁻⁶ mol/L	10	5.3 ± 1.2
10 ⁻⁵ mol/L	10	4.1 ± 1.0
10 ⁻⁴ mol/L	10	2.9 ± 0.9

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与 10⁻⁷比较; c: $P < 0.01$, 与 10⁻⁶比较; d: $P < 0.01$, 与 10⁻⁵比较。

3 讨论

血管重塑是许多心血管疾病的共同病理过程(As、PTCA 术后再狭窄及高血压病^[5])。晚近众多资料表明血管外膜成纤维细胞的迁移增殖、胞外基质的分泌和表型转化,参与新生内膜的形成、胶原纤维化后的弹性回缩是损伤后血管重塑重要内容^[1,2]。具体病理过程是血管损伤后早期外膜成纤维细胞发生表型的改变,转变为肌成纤维细胞,并赋予其合成功能,同时一部分肌成纤维细胞迁移至内膜分泌 ECM,尤其是 iv 型胶原蛋白在外膜和新生内膜的沉积,晚期胶原纤维化,管腔缩窄,发生病理性血管重塑^[8]。最近 Siow 等^[9]发现了 VAF 参与血管损伤后新生内膜形成地直接证据,即用表达 β 半乳糖苷酸的腺病毒(adenoviral vector coordinating expression of nuclear targeted beta galactosidase, AdLacZ) 仅转染血管外膜,球囊损伤大鼠动脉 3 天后在血管中膜和新生内膜出现大量表达 β 半乳糖苷酸和 α 肌动蛋白(α -actin)的细胞。Ryan 等^[10]建立球囊损伤大鼠动脉模型,应用可溶性重组 TGF β R (a soluble TGF-beta receptor type β TGF β R β Fc) 抑制外膜成纤维细胞胞外基质(iv 型胶原蛋白, FN) 和 α -actin 的表达,有效扩大管腔面积,改善血管重塑。血管外膜成纤维细胞在血管重塑中的作用日益受到重视。

文献[11]报道, HRCI 可以明显减少冠心病的临床事件,降低 PTCA 术后再狭窄及相应心血管事件的发生,其非调脂作用是近年来研究的热点。临床和动物实验证明他汀类药物(stains)可以改善 PTCA 术后再狭窄及 As 病理性血管重塑,提高血管功能^[3,4]。文献[12]报道, Pitavastatin 可以减轻由 NO 合成障碍引起的管壁增厚、管周纤维化和血压升高,

改善血管重塑,从而增大管腔面积。既往大部分研究着眼于 HRCI 对平滑肌细胞、内皮细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等细胞的作用,探讨其抗炎、抗氧化、稳定斑块、抑制细胞增殖及改善血管重塑等非调脂作用机制^[13]。本实验研究发现辛伐他汀能剂量依赖地抑制血管外膜成纤维细胞的增殖、迁移和胶原合成,可能是其参与改善血管损伤后病理性血管重塑的机制之一。

综上所述,辛伐他汀可能通过抑制血管外膜成纤维细胞增殖、迁移和胶原合成改善血管重塑,在延缓 As 的发生和发展,减少再狭窄的发生或减轻病变方面有积极影响。

[参考文献]

- [1] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation*, 1996, **93**: 2 178-187
- [2] Wilcox JN, Okamoto EI, Nakahara KI, Vinter-Johansen J. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis: a role for circulating myofibroblast precursors? *Ann NY Acad Sci*, 2001, **947**: 68-90
- [3] Hagenars T, Gussenhoven EJ, Kranendonk SE, Blankensteijn JD, Honkoop J, van der Linden E, et al. Early experience with intravascular ultrasound in evaluating the effect of statins on femoropopliteal arterial disease: hypothesis generating observations in humans. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2000, **14**: 635-641
- [4] Corti R, Fuster V, Fayad ZA, Worthley SG, Helft G, Smith D, et al. Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2002, **106**: 2 884-887
- [5] Zhu D L, Herembert T, Marche P. Increased proliferation of adventitial fibroblasts from spontaneously hypertensive rat aorta. *Hypertension*, 1991, **9**: 1 161-168
- [6] 陶婷, 朱鼎良, 龚兰生. 血管紧张素 II 对血管外膜成纤维细胞 iv 型胶原合成及其 mRNA 表达的影响. *中国病理生理杂志*, 2000, **16**: 402-408
- [7] Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cell. *Circ Res*, 1996, **78**: 225-230
- [8] Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zaleski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation*, 1996, **94**: 1 655-664
- [9] Siow RC, Mallawaarachchi CM, Weissberg PL. Migration of adventitial myofibroblasts following vascular balloon injury: insights from in vivo gene transfer to rat carotid arteries. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**: 212-221
- [10] Ryan ST, Kotliansky VE, Gotwals PJ, Lindner V. Transforming growth factor-beta dependent events in vascular remodeling following arterial injury. *J Vasc Res*, 2003, **40**: 37-46
- [11] Serruys PW, de Feyter P, Macaya C, Kokott N, Puel J, Vrolix M, et al. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, **287**: 3 215-222
- [12] Terata Y, Saito T, Fujiwara Y, Hasegawa H, Miura H, Watanabe H, et al. Pitavastatin inhibits upregulation of intermediate conductance calcium activated potassium channels and coronary arteriolar remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Pharmacology*, 2003, **68**: 169-176
- [13] 覃军, 何作云, 李爱民. 辛伐他汀的调脂及抗动脉粥样硬化作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 418-420
- [14] 林志鸿, 吴可贵, 谢良地, 李庚山, 许昌声. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**: 388-390

(此文编辑 胡必利)