

[文章编号] 1007-3949(2007)15-04-0277-04

• 实验研究 •

不同剂量的阿托伐他汀对心肌损伤大鼠内皮祖细胞动员及血管内皮功能的影响

苏晓叶, 刘志忠, 李小波, 吴 俊, 陈绍良

(南京医科大学附属南京第一医院内科, 江苏省南京市 210006)

[关键词] 内科学; 阿托伐他汀; 内皮祖细胞; 血管内皮功能; 心肌损伤; 血管内皮生长因子受体 2

[摘要] 目的 观察不同剂量的阿托伐他汀对心肌损伤后大鼠骨髓和外周血内皮祖细胞动员及血管内皮功能的影响。方法 S-D 大鼠背部皮肤多点注射异丙肾上腺素(5 mg/kg) 制造心肌损伤模型后, 随机分为生理盐水对照组和不同剂量的阿托伐他汀组[5、10、20、40 及 80 mg/(kg·d)]。4 周后, 流式细胞仪检测大鼠外周血 CD34⁺ 和血管内皮生长因子受体 2⁺ 双阳性细胞数。骨髓和外周血单个核细胞于 M199 培养基培养, FITC 标记的异凝集素和 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白染色双阳性细胞为正在分化的内皮祖细胞, 倒置荧光显微镜计数 3 个随机高倍视野数。阿托伐他汀灌胃 3 天后测定血清一氧化氮浓度。结果 阿托伐他汀各剂量组骨髓培养内皮祖细胞均较对照组明显增加($P < 0.05$), 其中 40 mg/(kg·d) 组内皮祖细胞数量最多, 较对照组增加了 2.4 倍($P < 0.05$), 80 mg/(kg·d) 组与 40 mg/(kg·d) 组比较稍有下降, 但无统计学差异; 阿托伐他汀组外周血培养内皮祖细胞较对照组明显增加, 40 mg/(kg·d) 组增加最明显($P < 0.05$); 心肌损伤后外周血 CD34⁺ /血管内皮生长因子受体 2⁺ 细胞较损伤前增加($P < 0.05$), 其中 80 mg/(kg·d) 组最明显, 较对照组增加了 4.18 倍($P < 0.05$), 40 mg/(kg·d) 组与 80 mg/(kg·d) 组无统计学差异; 阿托伐他汀各剂量组血清一氧化氮浓度较对照组明显增加, 其中 80 mg/(kg·d) 组增加最明显, 并随剂量增加一氧化氮浓度增加。结论 阿托伐他汀具有显著的剂量依赖性骨髓动员、促进外周血中内皮祖细胞迁移、改善血管内皮功能的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Dose-Dependent Atorvastatin on Mobilization of Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Function

SU Xiao-Ye, LIU Zhi-Zhong, LI Xiao-Bo, WU Jun, and CHEN Shao-Liang

(Department of Cardiovascular Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Endothelial Progenitor Cells; Vascular Endothelial Function; Myocardial Injury; Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether atorvastatin dose-dependently affects endothelial progenitor cells (EPC) mobilization from peripheral blood, EPC numbers in bone marrow culture in vitro and endothelial function after myocardial injury rats.

Methods Rats with myocardial injury, induced by isoprenaline, were randomized to treatment groups with vehicle or atorvastatin [5, 10, 20, 40 and 80 mg/(kg·d)] for 4 weeks starting on one day after Myocardial injury. Putative precursor populations [CD34⁺ /vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)⁺ haematopoietic stem cells] were measured by flow cytometric analysis. Total mononuclear cells (MNC) were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, and the cells were plated on gelatin coated culture dishes. Double-stained cells for both FITC BS-1 lectin and acLDL-DiI were counted as EPC in at least 3 randomly selected HPF. Serum concentration of nitric oxide (NO) was measured after atorvastatin use.

Results Atorvastatin increased EPC numbers both in bone marrow and peripheral blood culture in vitro, maximum at 40 mg/(kg·d) ($P < 0.05$). EPC numbers at the dose of 80 mg/(kg·d) were slightly reduced comparing with 40 mg/(kg·d), but there was no statistical difference; circulating EPC (double positive CD34⁺ /VEGFR-2⁺) were significantly elevated after myocardial injury ($P < 0.05$); EPC mobilization was markedly further augmented by atorvastatin treatment, maximum at 80 mg/(kg·d) (4.18-fold increase, $P < 0.05$). There was no statistical difference between 40 mg/(kg·d) and 80 mg/(kg·d); Atorvastatin induced a dose-dependent increase in serum concentration of NO generation, with maximal effect at 80 mg/(kg·d).

Conclusions Atorvastatin dose-dependently improve EPC mobilization, EPC numbers in vitro culture and endothelial function.

[收稿日期] 2007-02-04

[修回日期] 2007-04-04

[作者简介] 苏晓叶, 硕士, 医师, 研究方向为干细胞基础, E-mail 为 xiaobo229@hotmail.com。通讯作者陈绍良, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗。刘志忠, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病实验基础。

他汀类药是广泛应用于临床的一种降脂药, 最近的研究发现除了降脂作用外, 他汀类药还有很多有益的心血管保护作用, 被称为他汀类药的多效性。例如改善内皮功能异常、增加一氧化氮(nitric oxide, NO)生物利用率、促进内皮祖细胞(endothelial progenitor

itor cell, EPC) 的动员、直接抑制平滑肌细胞增殖、减少血小板凝集、抗氧化特性、抑制血管炎症反应、稳定动脉粥样斑块等^[1]。最近,他汀类药物促进损伤后组织的血管新生和内皮祖细胞的动员、迁移、分化的作用受到高度重视。但不同研究中所用他汀类药物剂量差别很大,结果也有所不同。因此我们设计一系列阿托伐他汀剂量以明确他汀类药物对内皮祖细胞的动员、迁移及分化作用。

1 材料与方法

1.1 材料

FITC 标记的异凝集素、DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acLDL-DiI)和 FITC 标记的抗血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 单克隆抗体购自 Sigma 公司, CD34-PE 购自 BD 公司, 异丙肾上腺素购自上海禾丰制药有限公司, 大鼠重组血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 购自 R&D, 阿托伐他汀购自辉瑞公司, NO 试剂盒系南京建成生物工程公司产品。肌钙蛋白 I (troponin I, TnI) 药盒由 Chiron Diagnostics 公司提供。

1.2 心肌损伤模型的建立

S-D 雄性大鼠共 70 只, 体重 400~500 g, 按 Bertinchant 等^[2]方法稍加改造, 实验第一天背部皮肤多点注射异丙肾上腺素(5 mg/kg), 24 h 后第二次背部皮肤多点注射异丙肾上腺素(5 mg/kg)。第二次注射 24 h 后下腔静脉取血检测 TNI, 送南京医科大学附属南京第一医院放射免疫中心测定, 大于 0.5 $\mu\text{g/L}$ 造模成功。随机分为生理盐水对照组和不同剂量阿托伐他汀组[5、10、20、40 及 80 mg/(kg·d)], 每组 10 只, 每周称重一次, 分别灌胃 4 周。

1.3 骨髓细胞培养

2% 明胶除菌滤膜过滤, 加入培养瓶中, 以均匀覆盖整个瓶底为宜, 37℃ 温箱过夜。无菌分离大鼠股骨和胫骨, 75% 酒精短时浸泡, 咬骨钳夹断冲洗骨髓, 淋巴细胞液密度梯度离心, 吸取中间白膜层为单个核细胞。应用 M199 培养基(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 ku/L、链霉素 100 ku/L、大鼠重组 VEGF 10 $\mu\text{g/L}$)。按 $10^9/\text{L}$ 细胞浓度接种于预先包被明胶培养瓶中。4 天后第一次换液, 7 天后进行荧光染色并置于倒置荧光显微镜下计数。染色前 24 h 换用不含胎牛血清和 VEGF 的 M199 培养基血清耗竭, 加入 acLDL-DiI(10 mg/L) 37℃ 孵育 3 h, PBS 冲洗 5 次, 2% 多聚甲醛固定 10 min, 加入 FITC 标记的异凝集素

(10 mg/L), 37℃ 孵育 1 h。倒置荧光显微镜鉴定双染色细胞为正在分化的 EPC, 计数 3 个随机选择的 $\times 200$ 视野的 EPC^[3]。

1.4 外周血内皮祖细胞培养

大鼠经体表心脏穿刺无菌抽取外周血 10 mL, 肝素抗凝, 淋巴细胞液密度梯度离心, 以 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间白膜层为单个核细胞, 加入 0.83% 氯化铵轻轻震荡 3 min 以除去多余的红细胞, 然后加入 5 倍体积的 M199, 1 300 r/min 离心 10 min 洗涤 2 次, 除去大部分血小板。调整细胞浓度, 用血细胞计数板计数 4 个边角内大方格的细胞数, 按 $10^9/\text{L}$ 接种细胞于事先包被明胶的培养瓶和 24 孔培养板内, 一周后换液, 以后每隔 4 天换液一次, 培养 3 周后鉴定, 鉴定方法同骨髓细胞。

1.5 外周血内皮祖细胞流式细胞仪检测

采用全血法。每只大鼠各设置 1 个测定管及同型对照管, 每管取肝素抗凝全血 100 μL ; 测定管加 FITC 标记的抗大鼠 VEGFR-2 单抗和 PE 标记的抗大鼠 CD34 单抗各 20 μg , 同型对照管加相应的两种同型对照抗体, 4℃ 避光孵育 30 min; 每管加 2 mL 红细胞裂解液, 37℃ 避光孵育 10 min; 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清; 流式细胞检测缓冲液(含 0.01 mol/L 磷酸缓冲液、0.5% 牛血清白蛋白、0.05% 叠氮钠)洗涤 2 次; 加 1% 多聚甲醛 300 μL 重悬, 上机检测。以 488 nm 氩离子激光激发, 每次计数 10 000 个细胞, 用 Cellquest 计算机软件分析双荧光阳性细胞所占比例, 每个标本中测定管的双荧光阳性细胞比例减去对照管的双荧光阳性细胞比例为该标本中实际的双荧光阳性细胞^[4]。

1.6 血清一氧化氮浓度的测定

按 NO 试剂盒说明, 取血清样本, 加 Griess 试剂, 在 722 型分光光度计 550 nm 波长处读取吸光度值, 按公式计算血清 NO 浓度。

1.7 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS 10.0 统计软件。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对骨髓内皮祖细胞的影响

骨髓单个核细胞接种后, 约 2 天左右开始贴壁生长, 7 天左右可覆盖瓶底 80%, 细胞呈梭形, 以集落方式生长。阿托伐他汀各剂量组骨髓培养 EPC 均较对照组明显增加($P < 0.05$), 其中 40 mg/(kg·d)

组 EPC 数量最多, 较对照组增加了 2.4 倍 ($P < 0.05$), 80 mg/(kg·d) 组与 40 mg/(kg·d) 组比较稍有下降 ($P > 0.05$; 图 1 和表 1)。

2.2 阿托伐他汀对外周血内皮祖细胞的影响

外周血单个核细胞体外培养时, 细胞贴壁时间较长, 生长缓慢, 一周后才有贴壁生长细胞。培养 3 周后, 阿托伐他汀组 EPC 较对照组明显增加, 其中 40 mg/(kg·d) 组增加最明显 ($P < 0.05$; 表 1)。

2.3 阿托伐他汀对外周血 CD34⁺/血管内皮生长因子受体 2⁺ 影响

心肌损伤后外周血 CD34⁺/VEGFR-2⁺ 较损伤前显著增加 ($0.00688\% \pm 0.00075\%$ 比 $0.00591\% \pm 0.00063\%$, $P < 0.05$)。阿托伐他汀各剂量组外周血双阳性细胞明显增加, 其中 80 mg/(kg·d) 组最明显, 较对照组增加了 4.18 倍 ($P < 0.05$), 40 mg/(kg·d) 组与 80 mg/(kg·d) 组无统计学差异, 随剂量增加外周血 EPC 数量呈增加趋势(表 1)。

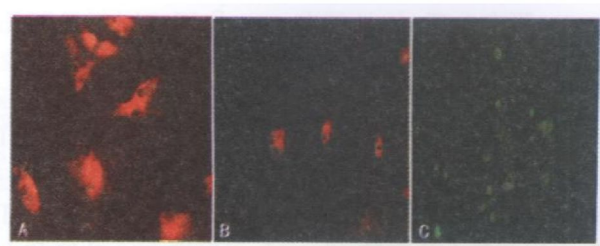


图 1. 骨髓和外周血双阳性细胞的表达 A 为骨髓 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白阳性细胞(红色荧光), B 为外周血 DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白阳性细胞, C 为 FITC 标记的异凝集素阳性细胞(绿色荧光)。

2.4 阿托伐他汀对血清一氧化氮的影响

阿托伐他汀各剂量组血清 NO 较对照组均明显增加 ($P < 0.05$), 其中 80 mg/(kg·d) 组增加最明显, 40 mg/(kg·d) 组与 80 mg/(kg·d) 组无统计学差异, 随剂量增加 NO 浓度增加(表 1)。

表 1. 不同剂量阿托伐他汀对心肌损伤大鼠骨髓和外周血内皮祖细胞数、外周血双阳性细胞数及血清一氧化氮含量的影响

分 组	外周血 EPC	骨髓 EPC	双阳性细胞数	NO (μmol/L)
对照组	28.0 ± 3.5	32.0 ± 5.1	0.00688% ± 0.00075%	69.7 ± 4.3
阿托伐他汀				
5 mg/(kg·d)	33.0 ± 5.1 ^a	46.9 ± 6.2 ^a	0.00908% ± 0.00056% ^a	94.2 ± 7.0 ^a
10 mg/(kg·d)	38.6 ± 5.5 ^a	56.8 ± 6.6 ^a	0.01310% ± 0.00085% ^a	120.5 ± 7.5 ^a
20 mg/(kg·d)	46.6 ± 6.2 ^a	68.2 ± 6.6 ^a	0.01686% ± 0.00066% ^a	132.4 ± 8.8 ^a
40 mg/(kg·d)	56.5 ± 3.5 ^a	78.2 ± 7.9 ^a	0.02391% ± 0.00175% ^a	143.9 ± 11.1 ^a
80 mg/(kg·d)	52.7 ± 4.5 ^a	77.9 ± 11.3 ^a	0.02448% ± 0.00239% ^a	157.3 ± 12.3 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

越来越多的研究表明, 无论在冠状动脉疾病或心力衰竭患者中外周血 EPC 数量的减少都为预后不佳的独立危险因素。实验证明 EPC 掺入新生血管部位, 归巢到内皮剥裸位置。因此, 循环中 EPC 可能提供了一种内源性修复机制, 去抵抗危险因子诱导的内皮损害, 并更换功能异常的内皮细胞。EPC 数量的减少与心血管事件高发生率相关。即使已经调整了传统的心血管病危险因素, 低 EPC 水平仍是预后不良的显著独立预测因子^[4,5]。而他汀类药物能促进骨髓中 EPC 动员至外周血, 并归巢到血管损伤处, 促进血管新生。但不同研究中他汀类使用剂量和结果有所差别。研究发现, 小鼠服用辛伐他汀(0.2 mg/kg)后, 外周血 EPC 数量增加^[6]。Walter 等^[7]发现辛伐他汀治疗加速球囊损伤后动脉的重新

内皮化, 并和剂量相关。Weis 等^[8]体外培养成熟的内皮细胞, 加入低浓度他汀类(0.005~0.01 μmol/L)促进其增殖、迁移和分化能力, 但是在高浓度(0.05~1 μmol/L)却显著抑制。高浓度时的抑制血管发生作用与内皮释放 VEGF 减少和增加内皮细胞凋亡有关。在小鼠体内模型中, 低剂量他汀类增加炎症诱导的血管发生, 但在高剂量阿托伐他汀却抑制血管生成, 因而得出他汀类在血管形成方面有双重作用。然而, Laufs 等^[9]应用 0.5、1 和 10 mg/kg 阿托伐他汀给小鼠皮下注射, 观察到 10 mg/kg 增加内皮型一氧化氮合酶 mRNA 作用最明显。Landmesser 等^[10]观察到阿托伐他汀 50 mg/(kg·d)给野生型小鼠灌胃可显著提高内皮依赖性 NO 介导的血管舒张、EPC 迁移、梗死边缘心肌血管新生。体外培养加用低剂量他汀类促进成熟内皮增殖、迁移和分化, 而大剂量抑制迁移和血管形成能力, 应用的是成熟内皮细胞, 不是

EPC。研究发现,体外培养 EPC 加用不同剂量阿托伐他汀,呈剂量依赖性促进血管形成作用,最大效应应在 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 与 1~5 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀共孵育可增加 EPC 内皮型一氧化氮合酶的表达,而小于 1 $\mu\text{mol/L}$ 却未观察到^[11]。临床应用阿托伐他汀 20 mg/d 的最大血清浓度约 0.04 $\mu\text{mol/L}$,已经发表的他汀类应用剂量人体实验 40 mg/d,仍促进 EPC 功能和内皮功能、NO 的产生。

本研究发现,80 mg/(kg·d) 组外周血 EPC 的数量增加、血清 NO 浓度增加,不过与 40 mg/(kg·d) 组稍升高。而这样大剂量在人体难以达到。人与大鼠他汀类吸收、分布容积、利用、代谢之间的可比性仍不清楚,所以同样的结论是否可推理至人体,仍不清楚。加之应用于临床需考虑效益经济比,大剂量的他汀类应用是否能产生较佳的效价比,仍需临床验证。

大量的研究表明内皮功能异常是动脉粥样硬化的最早期表现。内皮功能异常与心血管事件之间存在强关联,是独立的危险因素^[12]。他汀类药通过提高 NO 生物利用率,来调节血管反应性和促进血管新生。心功能衰竭和心肌梗死后内皮型 NO 的生物效率严重降低,他汀类能通过增加内皮型 NO 产生和减少 NO 失活而提高内皮型 NO 含量。EPC 修复能力与损伤处内皮功能的正常密切相关。2 型糖尿病患者内皮功能异常伴随 EPC 迁移至组织损伤部位能力下降^[13]。实验和临床研究都证明内皮 NO 利用率的降低可能在心功能衰竭病理生理学中扮演着重要角色。事实上,内皮 NO 利用率降低导致心肌血管新生和 EPC 功能受损、左心室功能不全和重构加重、心肌效能减低^[14]。心肌梗死后心功能衰竭小鼠内皮型一氧化氮合酶缺乏使生存率降低,而内皮型一氧化氮合酶的过表达可以减弱左心室功能不全,提高生存率。有报道辛伐他汀、普伐他汀治疗 1~3 天就显示出依赖内皮的血管舒张效应^[15]。故本研究采用药物灌胃 3 天后取血测定血清 NO 浓度,结果发现阿托伐他汀各剂量组 NO 浓度较对照组明显增加。

另外,虽然本研究观察到高剂量阿托伐他汀组

骨髓 EPC 数量增加,但体外培养影响条件复杂。国外有研究显示体外培养的鉴别与流式细胞仪检测表面抗原鉴别有很好的相关性,但能否将此结论推广开来,仍需进一步验证。

[参考文献]

- [1] Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins [J]. *Circulation*, 2004, **109** (23 Suppl 1): III39-43.
- [2] Bertinchant JP, Robert E, Polge A, Marty-Double C, Fabbro-Peray P, Poirey S, et al. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats [J]. *Clin Chim Acta*, 2000, **298** (1-2): 13-28.
- [3] Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2001, **103** (24): 2 885-290.
- [4] Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34⁺ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure [J]. *Circulation*, 2004, **110** (10): 1 209-212.
- [5] 黎健. 干细胞移植治疗心肌梗死[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (1): 1-4.
- [6] Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *J Clin Invest*, 2001, **108** (3): 399-405.
- [7] Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Circulation*, 2002, **105** (25): 3 017-024.
- [8] Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (6): 739-745.
- [9] Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dimagli U, et al. Atorvastatin upregulates type II nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice [J]. *Stroke*, 2000, **31** (10): 2 442-449.
- [10] Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, et al. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 2004, **110** (14): 1 933-999.
- [11] Urbich C, Drenth E, Zeiher AM, Dimmeler S. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (6): 737-744.
- [12] Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function cardiac events [J]. *Circulation*, 2005, **111** (3): 363-368.
- [13] Amir Lerman. Restenosis another "dysfunction" of the endothelium [J]. *Circulation*, 2005, **111**: 8-10.
- [14] Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans [J]. *Circulation*, 2005, **111** (18): 2 356-363.
- [15] Hashimoto M, Akita H. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function in elderly diabetic patients within 3 days [J]. *Circulation*, 2002, **105** (4): E30-31.

(此文编辑 文玉珊)