

阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的影响

章义利¹, 戴凌燕¹, 周秀云¹, 应斌宇¹, 张怀勤²

(温州医学院 1. 附属第二医院重症监护室, 2. 附属第一医院心内科, 浙江省温州市 325000)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 阿托伐他汀; 基质金属蛋白酶; 蛋白激酶 C

[摘要] 目的 观察鼠动脉粥样硬化时基质金属蛋白酶及蛋白激酶 C 的表达及阿托伐他汀的干预作用, 从而初步探讨他汀类抑制基质金属蛋白酶的机制。方法 将 50 只清洁级雌性 SD 大鼠分为对照组 ($n=10$, 正常饮食)、模型组 ($n=20$, 维生素 D3+ 高脂饲料+ 正常饮食) 和阿托伐他汀组 ($n=20$, 维生素 D3+ 高脂饲料+ 阿托伐他汀), 4 个月后处死试验鼠并取主动脉起始部进行光镜和电镜观察, 其余部分用于免疫印迹法检测基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的表达。各组动物分别于实验前及实验结束时空腹股动脉取血, 分离血清, 检测血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白水平。结果 模型组鼠血浆总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平显著高于对照组 ($P<0.01$), 阿托伐他汀能显著降低血脂学水平 ($P<0.01$); 模型组鼠主动脉基质金属蛋白酶 2 和 9 及蛋白激酶 C 的表达显著高于对照组 ($P<0.01$), 阿托伐他汀能显著抑制基质金属蛋白酶 2 和 9 及蛋白激酶 C 的表达 ($P<0.01$); 阿托伐他汀组鼠主动脉病理学改变显著。结论 阿托伐他汀抑制蛋白激酶 C, 在抑制基质金属蛋白酶的表达、稳定粥样斑块过程中可能起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Atorvastatin on Protein Kinase C and Matrix Metalloproteinases in Rat Model of Atherosclerosis

ZHANG Yi-Li¹, DAI Ling-Yan¹, ZHOU Xiur-Yun¹, YING Bin-Yu¹, and ZHANG Hua-Qin²

(1. Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College; Wenzhou 325000, Zhejiang, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Atorvastatin; Matrix Metalloproteinases; Protein Kinase C

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of matrix metalloproteinases (MMP) and protein kinase C (PKC) in aorta of atherosclerotic rats and effect of atorvastatin on them. **Methods** Fifty female Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal diet group ($n=10$, control group); vitamin D3 injection and high cholesterol diet group ($n=40$). After 8 weeks, vitamin D3 injection and high cholesterol diet rats were randomly switched to receive atorvastatin [$5 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] ($n=20$, atorvastatin group) or normal diet ($n=20$, model group). Another eight weeks later, all the rats were killed and some of their aortas were observed by light and electron microscope, the left aortas were removed for western blot analysis to detect MMP-2, MMP-9 and PKC; at the begin and end of experiment, serum was collected for serum lipid determining. **Results** There were no significant changes in serum lipids at the beginning of experiment between the groups, but after two months, cholesterol, low density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG) of atorvastatin group were significantly lower than those of model group (all $P<0.01$), but higher than control group (all $P<0.01$). The pathologic changes of atorvastatin group were less serious than those of model group, there showed no any pathological changes in control group. MMP-2, MMP-9 and PKC were significantly higher in the model group than those in the control group (all $P<0.01$). But compared with the model group, MMP-2, MMP-9 and PKC levels were markedly lower in the atorvastatin group (all $P<0.01$). **Conclusions** Atorvastatin inhibiting PKC expression may play an important role in depressing the express of MMP, stabilizing the atherosclerotic plaque.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)所致的心脑血管疾病已经成为危害人类健康的主要因素, 已经证实粥样斑块的破裂以及由此引发的血栓形成是此

类疾病的共同病理学基础, 这些破裂的斑块都具有薄纤维帽包裹大脂质核并伴随较多的炎症细胞肩部浸润这一特点, 纤维帽变薄、炎症细胞浸润的斑块成熟过程即基质重构的过程, 研究表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的激活和表达上调在其中起着关键作用, 抑制其表达是稳定斑块的一个重要措施, 也使之成为研究的一个热点^[1,2]。他汀类药物除具有良好的降血脂作用外还能降低心脑血管

[收稿日期] 2007-08-23

[修回日期] 2007-12-01

[作者简介] 章义利, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为肺栓塞的病理生理机制, E-mail 为 scasunc@163.com。戴凌燕, 硕士研究生, 医师, 研究方向为危重病人的营养支持。张怀勤, 硕士研究生, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子及细胞机制。

管疾病的发生率和死亡率,在心脑血管疾病的一级和二级预防中具有重要的作用和意义。研究已经证实他汀类药物具有稳定斑块的作用,其部分机制在于抑制 MMP 的表达,但其中的机制目前还不甚明了。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是细胞膜后最重要的信号途径之一,在细胞的增殖、分化、代谢及凋亡等过程中起重要作用,研究也表明动脉粥样硬化时 PKC 参与了 MMP 的表达^[3,4]。本研究观察鼠动脉粥样硬化时 MMP 及 PKC 的表达及阿托伐他汀的干预作用,初步探讨他汀类抑制 MMP 的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

雌性 SD 大鼠 50 只,清洁级,日龄 30~45 天,体重 150~200 g,由温州医学院动物实验中心提供。维生素 D3 购自上海第九制药厂,批号 980802;甲巯咪唑购自上海中西药业股份有限公司,批号 010803;胆酸钠购自温州生物化学制药厂,批号 010304;胆固醇购自北京化学试剂公司,批号 010927;猪油为市售食用猪油。阿托伐他汀(立普妥)为辉瑞公司惠赠,批号 01027520;MMP-2、MMP-9 和 PKC 免疫印迹试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,硝酸纤维素膜购自 Sigma 公司。

1.2 大鼠动脉粥样硬化模型的建立

参照文献[5],将大鼠随机分为对照组($n=10$)、模型组($n=20$)和阿托伐他汀组($n=20$),对照组大鼠喂食普通饲料,模型组和阿托伐他汀组大鼠首先腹腔注射维生素 D3(700 ku/kg,分 4 次,隔两天注射一次),然后喂食高脂饲料(1%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.1%甲巯咪唑、5%猪油,93.4%基础饲料)。2 个月后,阿托伐他汀组大鼠强制性喂食含阿托伐他汀(5 mg/kg)的颗粒饲料,每只 5 g,再补充 15 g 普通颗粒饲料;模型组喂食普通饲料。所有大鼠均分笼按清洁级动物饲养,饮用洁净水,整个试验周期为 4 个月。

1.3 标本的收集与处理

各组动物分别于实验前及实验结束时行空腹股动脉取血,分离血清,以进行血脂学检测。并于实验结束时将所有大鼠处死,立即取主动脉(从主动脉弓至腹主动脉分叉处),截取主动脉弓放入 4%多聚甲醛固定液中固定;在主动脉起始处切取主动脉组织块,2.5%戊二醛固定。剩余的主动脉置于液氮中,−80℃保存。在整个试验中,大鼠死亡或中途用于观察动脉粥样硬化形成情况共有 15 只。

1.4 大鼠主动脉形态学观察

4%多聚甲醛固定液中固定的主动脉脱水,石蜡包埋,切成约 4 μm 厚切片,HE 染色,光镜下进行形态学观察;将固定在 2.5%戊二醛中的主动脉切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块,1%锇酸后固定 6 h,EPON812 包埋,LKB-V 型超薄切片机切片,常规染色,H-600 型透射观察主动脉内膜和中膜的超微结构改变。

1.5 免疫组织化学检测基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的表达

石蜡包埋的主动脉组织切成 4 μm 厚切片,免疫组织化学染色采用 S-P 法,操作步骤按试剂盒说明书进行,用 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

1.6 免疫印迹法检测基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 的表达

取低温保存的主动脉组织,放入洗净的研钵中,加入液氮后,快速研磨成粉状,再按 1:10 加入匀浆缓冲液[50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0),150 mmol/L NaCl,0.1% SDS,0.5% 去氧胆酸钠]继续研磨成匀糊状。Bradford 法测定蛋白量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转移,按 1:300 稀释 MMP-2 和 MMP-9 一抗,按 1:200 稀释 PKC 一抗;4℃下与硝酸纤维素膜结合过夜。TBS 液洗涤硝酸纤维素膜 10 min×3 次。按 1:400 稀释 MMP-2 和 MMP-9 二抗,按 1:2 稀释 PKC 二抗,37℃下与膜结合 30 min;TBS 液洗涤硝酸纤维素膜 10 min×3 次,1:50 稀释链霉亲和素标记生物素抗体,37℃下与膜结合 30 min。TBS 液洗涤硝酸纤维素膜 10 min×3 次,然后显色,ImageMaster VDS 凝胶成像扫描分析仪扫描存档,读取各条带蛋白质的相对含量。

1.7 血脂检验

用日立 7600 全自动生化分析仪检测血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白水平,低密度脂蛋白则通过常用公式计算获得。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.10 统计软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用 LSD 法,方差不齐者进行 Games-Howell 检验。两变量的相关分析用直线相关分析。

2 结果

2.1 血脂水平的变化

实验前各组血脂水平没有显著性差异;实验后

模型组血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), 模型组和阿托伐他汀组高密度脂蛋白水平低于对照组 ($P < 0.05$)。阿托伐他汀组血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白

水平显著低于模型组 ($P < 0.01$), 但高于对照组 ($P < 0.01$), 而高密度脂蛋白水平与模型组相比虽然无显著性差异, 但有升高的趋势(表 1)。

表 1. 实验前后各组血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	TC		TG		HDL		LDL	
	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后	实验前	实验后
对照组	1.46 ± 0.31	1.51 ± 0.43	0.77 ± 0.56	0.70 ± 0.25	0.49 ± 0.12	0.51 ± 0.10	0.62 ± 0.31	0.68 ± 0.42
模型组	1.42 ± 0.30	7.86 ± 1.26 ^b	0.77 ± 0.29	1.63 ± 0.22 ^b	0.50 ± 0.23	0.41 ± 0.13 ^a	0.57 ± 0.42	6.71 ± 0.21 ^b
阿托伐他汀组	1.44 ± 0.27	3.17 ± 0.65 ^{bc}	0.75 ± 0.62	1.16 ± 0.32 ^{bc}	0.50 ± 0.22	0.47 ± 0.05 ^a	0.60 ± 0.39	2.18 ± 0.63 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.2 基质金属蛋白酶和蛋白激酶 C 表达的变化

模型组 MMP-2、MMP-9 和 PKC 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀组 MMP-2、MMP-9 和 PKC 的表达显著低于模型组 ($P < 0.01$; 表 2)。

表 2. 基质金属蛋白酶 2 和 9 及蛋白激酶 C 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	MMP-2	MMP-9	PKC
对照组	7	5 314 ± 163	6 178 ± 254	2 726 ± 125
模型组	14	8 618 ± 549 ^a	9 054 ± 350 ^a	7 599 ± 345 ^a
阿托伐他汀组	14	3 397 ± 453 ^b	6 805 ± 368 ^b	3 630 ± 253 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.3 形态学改变

光镜下, 模型组内膜增厚, 中膜严重钙化, 明显不规则增厚, 有泡沫细胞形成, 平滑肌纤维排列紊乱; 阿托伐他汀组大鼠主动脉中膜肌层较对照组显

著增厚, 但较模型组略变薄, 平滑肌纤维排列紊乱, 中膜肌层多灶性钙化; 对照组主动脉平滑肌排列整齐规则, 管腔内皮光滑, 无增生。电镜下, 模型组胶原纤维明显增多, 排列紊乱, 局灶性纤维溶解变性, 局部有脂质样颗粒沉积在细胞间隙中, 平滑肌细胞核固缩, 核染色变深, 部分可见坏死的平滑肌细胞, 平滑肌细胞线粒体空泡化, 弹力板断裂, 染色变淡, 呈断续状排列, 内皮细胞大部分脱落, 局灶有血栓形成(大量红细胞), 可见泡沫细胞; 对照组内皮完整, 平滑肌纤维正常, 排列紧密, 胶原纤维排列规则, 无增生; 阿托伐他汀组内皮细胞脱落减少, 平滑肌细胞形态基本正常, 排列稍紊乱, 线粒体基本正常, 少量轻度水肿、空泡化, 胶原纤维结构清晰, 增生较多, 溶解现象少见, 内弹力板少量断裂, 未见血栓及脂质颗粒形成(图 1)。免疫组织化学染色发现 MMP 和 PKC 主要集中在坏死钙化区以及平滑肌增厚区。

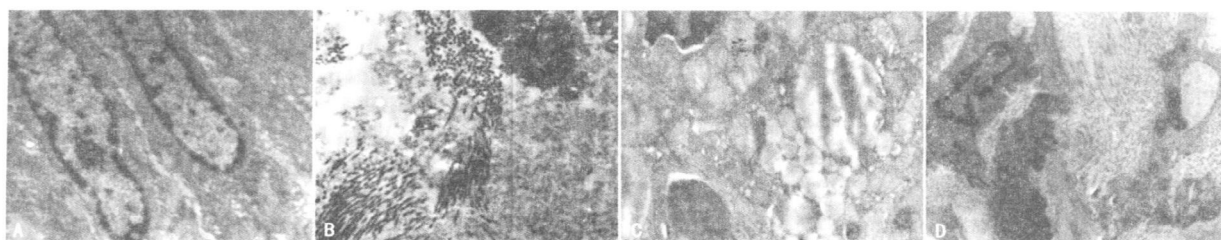


图 1. 电镜下各组主动脉形态学改变 (10000×) A 为对照组, B 和 C 为模型组, D 为阿托伐他汀组。

2.4 相关性分析

大鼠主动脉表达的 PKC 与 MMP-2 和 MMP-9 之间存在明显的正相关关系 ($r = 0.682$ 和 $r = 0.573$, $P < 0.01$)。

3 讨论

临床和动物实验模型研究均表明 MMP 参与动脉粥样斑块的形成、稳定及血栓性疾病的进展过程^[6-8]。免疫组织化学分析及原位杂交已经证实了 MMP 在非疾病及动脉粥样硬化的动脉中有表达。

但在动脉粥样硬化时斑块的肩部和泡沫细胞沉积区, MMP-2、MMP-9 表达及活性明显增高^[1]。Zaltsman 等^[2]发现高胆固醇喂养的兔主动脉 MMP-2、MMP-9 表达升高并且其升高程度与病变的严重程度相关。本研究中模型组 MMP-2、MMP-9 较正常对照组上升近 1.4 倍和 1.5 倍, MMP 主要集中在坏死钙化区, 也从另一个侧面证实了 MMP 参与了动脉粥样硬化的形成并在稳定斑块中起重要的作用。

研究表明, PKC 是动脉粥样硬化形成过程中重要的细胞信号传导途径, 它涉及到动脉粥样硬化形成的各个环节^[9,12]。已有研究证实 PKC 信号转导途径调节动脉粥样硬化时的 MMP 表达^[3,4]。本研究发现动脉粥样硬化时 PKC 表达比正常对照组增高近 3 倍, 说明在动脉粥样硬化形成过程中 PKC 的活化和表达可能起重要作用。免疫组织化学显示其主要分布于坏死钙化区, 与 MMP 分布大致相似, 且 MMP-2、MMP-9 与 PKC 的表达呈正相关, 提示 PKC 可能参与了动脉粥样硬化时 MMP 的调控。

他汀类药物良好的抗动脉粥样硬化作用, 除了它的降脂作用外, 它的非降脂作用才是冠心病患者受益的重要原因^[13,14]。越来越多的数据表明他汀类药物能抑制 MMP 的表达, 从而稳定了成熟的斑块破裂^[15]。本研究表明阿托伐他汀显著抑制了 PKC 和 MMP-2、MMP-9 的表达, 并呈直线正相关。因此我们认为阿托伐他汀可能通过 PKC 途径, 使细胞内钙离子水平升高, 从而减少 MMP 的分泌; 阿托伐他汀的非降脂作用中, 抑制 PKC 在抑制 MMP 表达、稳定粥样斑块及逆转动脉粥样硬化形成过程中可能起重要作用。

[参考文献]

- [1] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques [J]. *J Clin Invest*, 1994, **94** (6): 2 493-503.
- [2] Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: relationship to lesion severity [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **130** (1-2): 61-70.
- [3] Hussain S, Assender JW, Bond M, Murphy D, Newby AC. Activation of protein kinase C zeta is essential for cytokine-induced metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion from rabbit smooth muscle cells and inhibits proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (30): 27 345-352.
- [4] Fabiani RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells [J]. *J Biochem*, 1996, **315** (Pt 1): 335-342.
- [5] 吴开云, 高振渊, 袁融, 庄文华. 维生素 D 诱发大鼠动脉粥样硬化的实验研究[J]. *解剖学报*, 1996, **27** (2): 133-135.
- [6] Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 369-375.
- [7] Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 from the aortas of cholesterol fed rabbits partially counterbalances increased metalloproteinase activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (7): 1 700-707.
- [8] 丛晓强, 孟晓萍, 李颖. 基质金属蛋白酶在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (5): 397-400.
- [9] Pereira FE, Coffin JD, Beall HD. Activation of protein kinase C and disruption of endothelial monolayer integrity by sodium arsenite—Potential mechanism in the development of atherosclerosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, **220** (2): 164-177.
- [10] Sirikci O, Ozer NK, Azzi A. Dietary cholesterol-induced changes of protein kinase C and the effect of vitamin E in rabbit aortic smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **126** (2): 253-263.
- [11] Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C [J]. *Science*, 1992, **258** (5082): 607-614.
- [12] Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, et al. Oxidized low density lipoprotein induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **160** (2): 281-288.
- [13] Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **47**: 648-657.
- [14] Koh KK. Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis [J]. *Int J Cardiol*, 2000, **76**: 21-30.
- [15] 章义利, 张怀勤, 应斌宇, 李上共, 徐力辛. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶 2、9 的影响[J]. *温州医学院学报*, 2004, **34** (5): 334-336.

(此文编辑 文玉珊)