

## 阿托伐他汀对大鼠血管平滑肌细胞迁移和组织蛋白酶 S 表达的影响

徐戈<sup>1,2</sup>, 周胜华<sup>1</sup>, 蒋路平<sup>1,3</sup>, 孙智山<sup>1,4</sup>

(1 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 2 广西医科大学附属第一医院心内科;

3 衡阳市中心医院心内科; 4 湘潭市人民医院心内科)

[关键词] 阿托伐他汀; 组织蛋白酶 S; 核因子 KB; 细胞迁移

[摘要] 目的 观察阿托伐他汀对白细胞介素 1 $\beta$  诱导的大鼠血管平滑肌细胞迁移及组织蛋白酶 S 和核因子 KB 表达的影响。方法 取 SD 大鼠胸主动脉进行血管平滑肌细胞培养, 采用 Boyden 小室实验评价不同浓度阿托伐他汀对白细胞介素 1 $\beta$  诱导大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响, 用细胞免疫化学和逆转录聚合酶链反应法检测各组组织蛋白酶 S 和核因子 KB 表达的变化。结果 与正常对照组相比, 白细胞介素 1 $\beta$  组血管平滑肌细胞迁移增多, 核因子 KB 和组织蛋白酶 S 表达明显增加 ( $P < 0.01$ )。1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组可呈剂量依赖性抑制白细胞介素 1 $\beta$  所致的细胞迁移以及组织蛋白酶 S 和核因子 KB 表达 ( $P < 0.01$ )。结论 阿托伐他汀可能通过抑制核因子 KB 使组织蛋白酶 S 表达减少, 从而抑制血管平滑肌细胞迁移。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Effect of Atorvastatin on Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cell and Expression of Cathepsin S

XU Ge, ZHOU ShengHua, JIANG Lu-Ping and SUN Zhi-Shan

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Cathepsin S; Nuclear Factor- $\text{KB}$ ; Cell Migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of atorvastatin on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced rat vascular smooth muscle cell (VSMC) migration, nuclear factor- $\text{KB}$  (NF- $\text{KB}$ ) and cathepsin S (Cat S) expression. **Methods** Rat VSMC were isolated and cultured from Sprague-Dawley rat thoracic aortas. The Boyden chamber test was used to measure the role of different concentrations of atorvastatin on the cell migration stimulated by IL-1 $\beta$ . The expression of Cat S and NF- $\text{KB}$  in different groups was evaluated using the immunocytochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with that of normal group, the cell migration in IL-1 $\beta$  group was promoted. Cat S and NF- $\text{KB}$  expression increased ( $P < 0.01$ ). 1  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$  atorvastatin could inhibit IL-1 $\beta$ -induced VSMC migration in a dose-dependent manner, so did in NF- $\text{KB}$  and Cat S expression ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Atorvastatin may decrease Cat S expression in VSMC through down-regulating NF- $\text{KB}$  activation, which might inhibit the VSMC migration.

新生内膜形成是导致冠状动脉介入治疗再狭窄发生的重要原因, 血管平滑肌细胞 (VSMC) 迁移在新生内膜的形成中起关键作用。在再狭窄的过程中伴随着明显的炎症反应, 多种促炎症因子和细胞因子相互作用促进新生内膜的形成。白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 是一种典型的促炎症因子, 可促进多种细胞因子的表达。组织蛋白酶 S (cathepsin S, Cat

S) 是组织蛋白酶家族中的重要成员, 可以导致细胞迁移。在大鼠颈动脉球囊损伤以后, 新生内膜中 Cat S 表达明显增加, 提示 Cat S 与新生内膜形成有着密切关系<sup>[1]</sup>。本研究利用培养的大鼠 VSMC, 观察阿托伐他汀对 IL-1 $\beta$  所致 VSMC 迁移和核因子 KB (NF- $\text{KB}$ ) 及 Cat S 表达的影响, 旨在探讨阿托伐他汀减轻再狭窄的作用机制。

[收稿日期] 2009-06-24

[修回日期] 2009-10-03

[作者简介] 徐戈, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病临床和基础研究, Email 为 xuge@21cn.com。通讯作者周胜华, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为介入心脏病学, Email 为 zhougq@21cn.com。蒋路平, 博士, 副教授, 主要研究方向为介入心脏病学。孙智山, 博士, 主治医师, 主要研究方向为冠心病临床和基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和设备

大鼠 IL-1 $\beta$  (Peprotech 公司), 阿托伐他汀原粉 (北京嘉林药业股份有限公司), 逆转录试剂盒 (Fementas 公司), Taq DNA 聚合酶和 AMV 抑制剂

(Promegags公司), Tri-reagent和 PCR Maker(长沙晶美生物工程公司),  $\beta$ -actin和 Cat S PCR引物(北京奥科生物技术工程有限公司), Cat S多克隆抗体(Biovision公司), 核因子  $\kappa$ B P65一抗(武汉博士德生物工程有限公司); PCR仪(Gene Amp 2400), 紫外分光光度计(Beckman DU-640), 凝胶扫描分析仪(Bio-Rad公司 GelDoc 200)。

## 1.2 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的分离、培养和鉴定

10只雄性SD大鼠1~2月龄, 体重300~350 g。大鼠予3%戊巴比妥30 mg/kg腹腔麻醉后, 在无菌操作台上快速分离出胸主动脉, 剥除纤维层和外膜, 用刀片轻刮2~3遍内膜面。将主动脉中膜放入无菌小玻璃瓶中反复剪切成 $1\text{ mm}^3$ 左右的小块, 加入0.2%胶原酶②2~3 mL置于 $37^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$ 培养箱中, 消化8~10 h后, 经两层无菌纱布过滤到离心管, 经三次离心和PBS清洗后, 加入含20%胎牛血清的DMEM培养液5 mL, 吹打后移入培养瓶。 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ 温箱中孵育, 待瓶内细胞数量增加后, 每3天换液一次。待细胞长满瓶壁后, 进行细胞传代和纯化。取第4~5代对数生长期的细胞用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法检测细胞 $\alpha$ -actin表达确定为平滑肌细胞。

## 1.3 实验分组

取生长状况良好的第4~5代VSMC接种于6孔培养板中, 培养至细胞80%~90%汇合后, 换无血清培养液继续培养24 h使其静止, 加入含10%胎牛血清的DMEM培养液及不同终浓度的阿托伐他汀进行干预。实验分为以下5组: (1)正常对照组, 予DMEM培养24 h; (2)IL-1 $\beta$ 组, 予10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 刺激24 h; (3)0.1  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 予终浓度0.1  $\mu\text{mol/L}$ 的阿托伐他汀作用2 h后加入10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 干预24 h; (4)1  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 予终浓度1  $\mu\text{mol/L}$ 的阿托伐他汀作用2 h后加入10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 刺激24 h; (5)10  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组, 予终浓度10  $\mu\text{mol/L}$ 的阿托伐他汀作用2 h后加入10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 刺激24 h。每组设复孔, 实验重复3次。

## 1.4 细胞迁移测定

采用Boyden小室, 上室加入 $2 \times 10^5$  VSMC及无血清的DMEM, 上、下室均分别加入10  $\mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$ 以及各浓度的阿托伐他汀, 上、下室之间隔以聚碳酸酯微孔膜(孔径8  $\mu\text{m}$ )。在 $37^\circ\text{C}$ 温箱中培养24 h后取出上室, 棉棒擦除上室滤膜上层细胞, 移行并黏附到滤膜下层面的细胞以纯甲醇固定, 经苏木素染色10~15 min移行的细胞呈深蓝色。随机观察6个高

倍视野, 计数移行细胞数, 取均值。

## 1.5 组织蛋白酶S mRNA表达

用Trizol试剂提取细胞总RNA, 用逆转录酶将其逆转成cDNA, 由北京奥科生物工程公司设计和合成Cat S引物, 上游5'-TCC CTA CAA AGC CAT GGA TGA-3', 下游5'-CCA TAG CCA ACC ACG AGA ACA-3'。以 $\beta$ -actin作为半定量内对照引物。反应参数为 $95^\circ\text{C}$ 预变性2 min后,  $94^\circ\text{C}$ 变性60 s,  $56^\circ\text{C}$ 退火60 s,  $72^\circ\text{C}$ 延伸60 s, 共38个循环。最后 $72^\circ\text{C}$ 延伸10 min。取PCR扩增产物5  $\mu\text{L}$ 点样于1%的琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙啶(EB)染色, 紫外分光光度计观察电泳结果。

## 1.6 细胞免疫化学检查

取细胞爬片用细胞免疫化学染色法检测大鼠VSMC中Cat S和核因子 $\kappa$ B的表达<sup>[2,3]</sup>。在镜下对Cat S和核因子 $\kappa$ B的表达阳性率和阳性强度进行评分。用特异指数总细胞免疫染色评分(TISS)评价各组Cat S和核因子 $\kappa$ B表达情况。TISS=阳性率 $\times$ 阳性强度, 分数在1~20分范围内。每张切片随机计算5个40倍物镜视野中细胞表达阳性率及表达强度, 求出TISS取平均值作为Cat S和核因子 $\kappa$ B的细胞免疫化学半定量结果。

## 1.7 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件包, 所有资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用Oneway ANOVA或非参数检验进行统计。以 $P < 0.05$ 作为显著性差异标准。

## 2 结果

### 2.1 阿托伐他汀对白细胞介素1 $\beta$ 诱导的血管平滑肌细胞早期迁移的影响

与正常对照组相比, IL-1 $\beta$ 组细胞迁移数明显增多( $P < 0.01$ )。0.1  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组与IL-1 $\beta$ 组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。1  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组和10  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组的细胞迁移数与IL-1 $\beta$ 组相比分别下降了22.22%和55.56% ( $P < 0.01$ ; 表1)。

### 2.2 阿托伐他汀对组织蛋白酶S mRNA表达水平的影响

IL-1 $\beta$ 组Cat S mRNA表达较正常对照组明显增多( $P < 0.01$ )。阿托伐他汀剂量依赖性地抑制IL-1 $\beta$ 所致大鼠VSMC中Cat S mRNA表达, 1  $\mu\text{mol/L}$ 和10  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组Cat S表达与IL-1 $\beta$ 组相比分别下降19.32%和56.81% ( $P < 0.01$ ), 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组Cat S mRNA表达与IL-1 $\beta$ 组

差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 表 1 和图 1)。

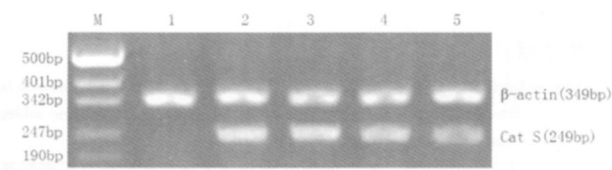


图 1 阿托伐他汀对白细胞介素 1 $\beta$  诱导大鼠血管平滑肌细胞中组织蛋白酶 S mRNA 表达的影响 M 为 PUC19DNA 分子标记物, 1 为正常对照组, 2 为 IL-1 $\beta$  组, 3~5 分别为 0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组。

2.3 阿托伐他汀对大鼠血管平滑肌细胞中组织蛋白酶 S 和核因子  $\kappa\text{B}$  阳性表达的影响

与正常对照组相比, IL-1 $\beta$  组可见 Cat S 和核因子  $\kappa\text{B}$  明显表达 ( $P < 0.01$ )。0.1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他

汀组 Cat S 和核因子  $\kappa\text{B}$  表达与 IL-1 $\beta$  组差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。1  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组 Cat S 和核因子  $\kappa\text{B}$  表达与 IL-1 $\beta$  组相比均明显减少 ( $P < 0.01$ ), 且呈量效关系 (图 2 和表 2)。

表 1 阿托伐他汀对白细胞介素 1 $\beta$  诱导大鼠血管平滑肌细胞早期迁移和组织蛋白酶 S mRNA 表达的影响

分 组	细胞迁移数	Cat S mRNA
正常对照组	6 $\pm$ 2	0.007 $\pm$ 0.001
IL-1 $\beta$ 组	27 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	25 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	21 $\pm$ 3 <sup>abc</sup>	0.71 $\pm$ 0.05 <sup>abc</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	12 $\pm$ 2 <sup>abd</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>abd</sup>

a 为  $P < 0.01$  与正常对照组相比; b 为  $P < 0.01$  与 IL-1 $\beta$  组相比; c 为  $P < 0.01$  与 0.1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组相比; d 为  $P < 0.01$  与 1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组相比。

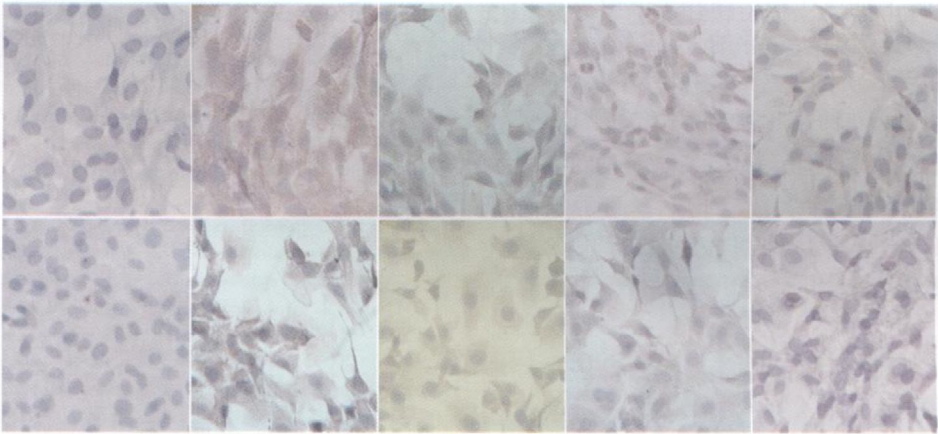


图 2 阿托伐他汀对白细胞介素 1 $\beta$  诱导大鼠血管平滑肌细胞中组织蛋白酶 S (上图) 和核因子  $\kappa\text{B}$  (下图) 表达的影响 从左到右分别为正常对照组、IL-1 $\beta$  组、0.1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组、1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组和 10  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组。

表 2 阿托伐他汀对血管平滑肌细胞中组织蛋白酶 S 和核因子  $\kappa\text{B}$  阳性表达的影响

分 组	Cat S	核因子 $\kappa\text{B}$
正常对照组	1.02 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.02
IL-1 $\beta$ 组	18.94 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	18.85 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	18.35 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	18.20 $\pm$ 1.53 <sup>a</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	15.56 $\pm$ 1.13 <sup>abc</sup>	15.37 $\pm$ 1.15 <sup>abc</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀组	9.72 $\pm$ 0.78 <sup>abd</sup>	9.58 $\pm$ 0.80 <sup>abd</sup>

a 为  $P < 0.01$  与正常对照组相比; b 为  $P < 0.01$  与 IL-1 $\beta$  组相比; c 为  $P < 0.01$  与 0.1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组相比; d 为  $P < 0.01$  与 1  $\mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀组相比。

3 讨论

新生内膜形成是动脉粥样硬化、再狭窄等血管病理改变时的重要特征之一。在血管成形术后再狭窄过程中, VSMC 从中膜向内膜迁移是导致新生内膜形成和增厚的一个重要因素。VSMC 在迁移过程中需要利用组织蛋白酶等蛋白水解酶溶解细胞外基质, 实现细胞移动<sup>[4]</sup>。

Cat S 是组织蛋白酶家族中的重要成员, 可以由多种细胞分泌。在再狭窄新生内膜的 VSMC 中可见 Cat S 表达增加, VSMC 可通过 Cat S 表达来降解细胞外基质, 促进 VSMC 迁移, 导致血管再狭窄的发生<sup>[5]</sup>。核因子  $\kappa\text{B}$  是参与炎症反应的重要转录因子, 可被多种促炎细胞因子所激活。核因子  $\kappa\text{B}$  被

激活后可以进入核内调节多种基因的表达。有研究发现促炎症因子可能通过核因子  $\kappa\text{B}$  通路影响组织蛋白酶家族表达<sup>[6]</sup>。在本研究中, 正常大鼠 VSMC 迁移能力弱, 细胞中未见明显核因子  $\kappa\text{B}$  和 Cat S 表达。予  $10 \mu\text{g/L}$  IL-1 $\beta$  刺激后, 大鼠 VSMC 迁移能力明显增强, 细胞中核因子  $\kappa\text{B}$  和 Cat S 表达明显增多, 提示 IL-1 $\beta$  可能通过核因子  $\kappa\text{B}$  促进 Cat S 表达, 使 VSMC 迁移能力加强。

阿托伐他汀是目前最常用和最有效的他汀类制剂之一, 除了有明显的降脂作用外, 还有改善内皮功能、稳定斑块、抗炎、抗血栓和抑制内膜增厚等多种降脂以外的作用。本研究中阿托伐他汀可以抑制 IL-1 $\beta$  所致的大鼠 VSMC 迁移, 降低细胞中核因子  $\kappa\text{B}$  和 Cat S 的表达, 且随着剂量的递增, 其抑制作用也越来越强,  $10 \mu\text{mol/L}$  阿托伐他汀即可明显抑制 VSMC 迁移以及核因子  $\kappa\text{B}$  和 Cat S 表达。这些结果提示, 阿托伐他汀可能通过抑制核因子  $\kappa\text{B}$  来减少 Cat S 表达, 抑制 VSMC 迁移。国外也有研究证实他汀可以显著抑制炎症介质介导的 VSMC 迁移和多种细胞因子的表达<sup>[7]</sup>。本研究结果与之相似。

目前阿托伐他汀抑制 VSMC 中核因子  $\kappa\text{B}$  表达的机制尚不清楚, 可能与以下几种途径有关: (1) 抑制甲羟戊酸途径 (MVA)<sup>[8]</sup>; (2) 抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 激活; (3) 抑制 IKK 激酶 (IKK) 活性<sup>[9]</sup>; (4) 抑制磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) 激活<sup>[10]</sup>; (5) 稳定 IKK<sup>[11]</sup>。

综上所述, 阿托伐他汀可呈剂量依赖性地抑制 IL-1 $\beta$  引起的大鼠 VSMC 迁移, 其减少细胞迁

移的机制可能是通过抑制核因子  $\kappa\text{B}$  使细胞中 Cat S 表达减少来实现的。

#### [参考文献]

- [1] Bums-Kurtis CI, Olzinski AR, Needle S, et al. Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Cardiovasc Res* 2004 **62** (3): 610-620
- [2] 田宏, 杜军保, 范瑾, 等. 一氧化氮诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003 **19** (7): 870-874
- [3] 刘红梅, 黄体钢, 王林, 等. 阿司匹林和氟伐他汀对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞环氧合酶 2 表达的抑制作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (3): 193-196
- [4] 秦彦文, 王绿娅. 组织蛋白酶与动脉粥样硬化斑块稳定性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (12): 950-952
- [5] Cheng XW, Kuzuya M, Sasaki T, et al. Increased expression of elastolytic cysteine proteases cathepsins S and K in the neointima of balloon-injured rat carotid arteries [J]. *Am J Pathol* 2004 **164** (1): 243-251
- [6] Pang M, Martinez AF, Jacobs J. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 **328** (3): 756-763
- [7] Chandrasekar R, Mummidi S, Mahalingam L, et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin [J]. *J Biol Chem* 2006 **281** (22): 15 099-109
- [8] McDermott Luke AJ, O'Neill. Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with RAK, RAK2, TRAF6 and TAK-1 [J]. *J Biol Chem* 2002 **277** (10): 7 808-815
- [9] Ortego M, Gomez-Hernandez A, Vidal C, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005 **45** (5): 468-475
- [10] Holscher H, Schuster D, Parviz R, et al. Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells [J]. *Atherosclerosis* 2006 **185** (2): 240-245
- [11] Lin R, Lin J, Peng N, et al. Lovastatin reduces nuclear factor-kappaB activation induced by C-reactive protein in human vascular endothelial cells [J]. *Biol Pharm Bull* 2005 **28** (9): 1 630-634

(此文编辑 许雪梅)