

# RhoA/Rho 激酶在氟伐他汀对组织因子表达影响中的调控作用

蒋卫红<sup>1</sup>, 谭丽华<sup>1</sup>, 杨侃<sup>1</sup>, 欧阳茂<sup>1</sup>, 胡漫辉<sup>1</sup>, 陈方平<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅三医院心内科, 湖南省长沙市 410013; 2. 中南大学湘雅医院血液内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 组织因子; 人脐静脉内皮细胞; 氟伐他汀; RhoA/Rho 激酶; 血管紧张素 II; Y27632

[摘要] **目的** 研究 RhoA/Rho 激酶在氟伐他汀(flavastatin, Flu)影响组织因子蛋白表达过程中的调控作用, 探讨氟伐他汀在抗动脉粥样硬化血栓形成作用的新靶点。**方法** 将同一簇人脐静脉内皮细胞(HUVEC)株进行培养、传代后, 分设对照组、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )组、Flu 组及干预组(TNF- $\alpha$  + Flu 组), 采用 RT-PCR 方法测定组织因子(tissue factor, TF) mRNA 表达水平, 用 Western blot 方法测定 TF 蛋白表达和 RhoA 的活化水平; 随后, 以血管紧张素 II(Ang II)、Y27632 为干预因素, 再分设空白对照组、TNF- $\alpha$  + Ang II 组、Ang II 组、TNF- $\alpha$  组、TNF- $\alpha$  + Y27632 组, 采用 Western blot 方法测定 TF 蛋白表达水平。**结果** TNF- $\alpha$  在诱导 HUVEC TF 表达的同时, 可使 RhoA 活化, 氟伐他汀可抑制 TF 表达与 RhoA 活化; Ang II 可促进 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC TF 蛋白表达水平, 而 Y27632 可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC TF 蛋白表达水平。**结论** RhoA/Rho 激酶通路在 G 蛋白水平上参与了氟伐他汀抑制组织因子表达的调控机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Regulatory Effect of RhoA/Rho Kinase in Tissue Factor Expression Influenced by Fluvastatin

JIANG Wei-Hong<sup>1</sup>, TAN Li-Hua<sup>1</sup>, YANG Kan<sup>1</sup>, OU Yang-Mao<sup>1</sup>, HU Man-Hui<sup>1</sup>, and CHEN Fang-Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, the Third Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha, 410013, China; 2. Department of Ultrasound, Department of Haematology, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410013 China)

[KEY WORDS] Tissue Factor; Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Fluvastatin; RhoA/Rho Kinase; Ang II; Y27632

[ABSTRACT] **Aim** To observe the regulatory effect of RhoA/Rho kinase in expression of tissue factor(TF) protein influenced by fluvastatin, so as to explore the noval target point of fluvastatin in anti-atherosclerosis and anti-thrombosis.

**Methods** The same human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was cultured and passage cultured, and was then divided into control group, TNF- $\alpha$  group, Flu group, and TNF- $\alpha$  + Flu group, TNF- $\alpha$  + Ang II group, Ang II group and TNF- $\alpha$  + Y27632 group. RT-PCR method was used to examine the expression of TF mRNA. Western blot method was used to examine the TF protein expression and RhoA activity. TF protein expression of HUVECs in control group, TNF- $\alpha$  + Ang II group, Ang II group, TNF- $\alpha$  group and TNF- $\alpha$  + Y27632 group was examined using Western blot method.

**Results** In the meanwhile of inducing the HUVECS TF expression, TNF- $\alpha$  also activated RhoA. Fluvastatin inhibited the activation of RhoA. Ang II could enhance the TF expression in HUVECS which induced by TNF- $\alpha$ , while Y27632 could inhibit the TF expression in HUVECS which induced by TNF- $\alpha$ . **Conclusions** The inhibitive effect of fluvastatin on the TF expression might be achieved through the RhoA/Rho signal regulatory pathway at small G protein level.

组织因子(tissue factor, TF)是外源性凝血系统凝血级联反应的启动子,通过介导激活凝血过程形

成血栓,也是脂质核心内促血栓形成最重要的活性因子之一,与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发

[收稿日期] 2011-03-24

[基金项目] 湖南省科技厅科研资助项目(2008FJ3159)

[作者简介] 蒋卫红,博士,副主任医师,主要从事高血压病、冠心病等基础与临床研究,E-mail 为 jwhxy3@126.com。谭丽华,硕士研究生,E-mail 为 starcoffee1985@163.com。通讯作者陈方平,博士,教授,研究方向为血液与血栓疾病,E-mail 为 xy-chenfp@2118.cn。

生发展过程有着密切的联系<sup>[1,2]</sup>。他汀类药物在调脂的同时可减少人单核细胞/巨噬细胞和内皮细胞 TF 的表达<sup>[3]</sup>,但其影响 TF 表达的信号途径尚不清楚。有研究表明,Rho/Rho 激酶与 TF 形成过程有关<sup>[4]</sup>,Rho/Rho 激酶可能是 TF 表达的信号调控途径。前期的基础实验已证实氟伐他汀可有效降低由 TNF- $\alpha$  诱导人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的 TF 含量、活性及蛋白表达水平。本研究采用血管紧张素 II (Rho 激酶激动剂)、Y27632 (Rho 激酶抑制剂) 干预氟伐他汀对 TF 表达的过程,从而进一步探讨其可能的 RhoA/Rho 激酶通路的调控机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人脐静脉内皮细胞株 (HUVEC) 由中南大学湘雅医学院细胞库购得,TNF- $\alpha$ 、RhoA 羊抗人单克隆抗体 (一抗)、HRPO 标记羊抗鸡 IgG (二抗)、HRPO 标记兔抗羊 IgG (标记二抗)、Y27632、Ang II 均购自深圳晶美生物工程有限公司; $\beta$ -actin 兔抗人单克隆抗体购自 Sant Cruz 公司;干预药物氟伐他汀钠原粉由北京诺华制药有限公司惠赠。

### 1.2 HUVEC 的复苏、培养、传代及活力检测

将 HUVEC 从  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱中取出,常规于  $37^{\circ}\text{C}$  的水浴箱中迅速解冻、溶解、离心,加入含 10% 新生胎牛血清的 DMEM 完全培养基中吹打混匀,置于含 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中  $37^{\circ}\text{C}$  静置培养。以 0.25% 胰蛋白酶消化传代后分装。用台盼蓝拒染法检测复苏后的细胞活力。

### 1.3 TNF- $\alpha$ 诱导 TF mRNA 表达及 RHoA 活化的作用及氟伐他汀的影响

取上述培养的 HUVEC,用 D-Hank's 液洗涤、胰酶消化,加入 5 mL DMEM 完全培养基,吹悬细胞,平板计数,取所需体积的细胞悬液稀释到  $5 \times 10^9/\text{L}$ ,接种于 6 孔培养板 (2 mL/孔) 内,孵育 24 h 待细胞融合后,倒掉培养基,再用 D-Hank's 液洗涤 2 次,加入 2 mL 无血清培养基,再加入不同的药物进行实验。分别设空白对照组、TNF- $\alpha$  组、氟伐他汀 (fluvastatin, Flu) 组、TNF- $\alpha$  + Flu 组 (TNF- $\alpha$  预孵育),采用 RT-PCR 测定 TF mRNA 表达水平,采用 Western blot 方法测定 TF 蛋白表达水平与 RHoA 活化水平。

### 1.4 Ang II、Y-27632 对 TF 活性与表达的调控作用

细胞处理同上,分别设空白对照组、TNF- $\alpha$  + Ang II 组、Ang II 组、TNF- $\alpha$  组、TNF- $\alpha$  + Y27632 组,加入不同药物干预后,Western blot 方法测定 TF 蛋

白表达水平。

## 1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,行正态性检验,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数间比较采用  $t$  检验。正态分布的样本间比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 TNF- $\alpha$ 诱导 TF mRNA 表达及 RHoA 活化的作用及氟伐他汀的影响

各组之间 HUVEC 总蛋白浓度差异无显著性 ( $P > 0.05$ );空白对照组与 Flu 对照组二组之间 TF mRNA 相对数、TF 蛋白表达水平、RhoA 蛋白表达水平差异均无显著性 ( $P > 0.05$ );TNF- $\alpha$  诱导组三组数据均较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ );TNF- $\alpha$  + Flu 组 TF mRNA 相对数、TF 蛋白表达水平较空白对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ),但较 TNF- $\alpha$  诱导组三组数据均显著降低 ( $P < 0.05$ ;表 1、表 2 和图 1、图 2 及图 3)。

表 1. 各组 TF mRNA 相对数及组间的比较

Table 1. The relative amount of TF mRNA

分 组	TF mRNA
空白对照组	0.02 $\pm$ 0.01
TNF- $\alpha$ 组	0.88 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
Flu (1 $\mu\text{mol/L}$ ) 组	0.03 $\pm$ 0.02
TNF- $\alpha$ + Flu 组	0.48 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  组比较。

表 2. 各组 HUVEC 总蛋白浓度、TF 蛋白表达水平、RhoA 蛋白表达水平测定值及组间的比较

Table 2. The protein levels of HUVECs, TF and RhoA

分 组	各组 HUVEC 总蛋白浓度	TF 蛋白	RhoA 蛋白
空白对照组	13.2	0.06 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02
TNF- $\alpha$ 组	12.4	0.94 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Flu (1 $\mu\text{mol/L}$ ) 组	12.7	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.03
TNF- $\alpha$ + Flu 组	12.8	0.67 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  组比较。

### 2.2 Ang II、Y-27632 对 TF 活性与表达的调控作用

与空白对照组比较,TNF- $\alpha$  + Ang II 组、TNF- $\alpha$  诱导组、Ang II 组和 TNF- $\alpha$  + Y27632 组 TF 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.05$ );与 TNF- $\alpha$  组比较,TNF- $\alpha$  + Ang II 组 TF 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),而 TNF- $\alpha$  + Y27632 组 TF 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ );

TNF- $\alpha$  组较 Ang II 组 TF 蛋白表达稍强,但差异无显著性( $P > 0.05$ ;表 3 和图 4)。

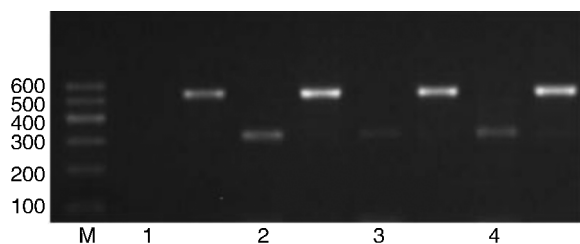


图 1. 氟伐他汀对 TNF- $\alpha$  诱导的 TF mRNA 的影响 M 为 Marker,1 为空白组,2 为 TNF- $\alpha$  组,3 为 Flu 组,4 为 TNF- $\alpha$  + Flu 组。其中,内参扩增片断大小为 400 bp,TF 扩增片断大小为 311 bp。

Figure 1. The effect of fluvastatin on TF mRNA abundance induced by TNF- $\alpha$

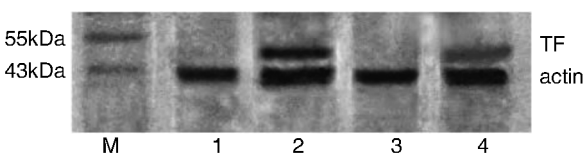


图 2. TNF- $\alpha$  诱导及 Flu 干预后 TF 蛋白表达水平 M 为 Marker;1 为空白组;2 为 TNF- $\alpha$  组;3 为 Flu 组;4 为 TNF- $\alpha$  + Flu 组。 $\beta$ -actin 条带为 43 kDa,TF 目的条带为 47 kDa。

Figure 2. The effects of intervention with TNF- $\alpha$  and Flu on TF expression

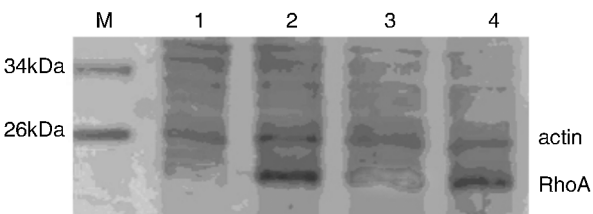


图 3. TNF- $\alpha$  诱导及 Flu 干预后 RhoA 蛋白表达水平 M 为 Marker,1 为空白组,2 为 TNF- $\alpha$  组,3 为 Flu 组,4 为 TNF- $\alpha$  + Flu 组。 $\beta$ -actin 条带为 26 kDa,RhoA 目的条带为 22 kDa。

Figure 3. The effects of intervention with TNF- $\alpha$  and Flu on RhoA expression

表 3. 各组间 TF 蛋白表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The protein level of TF

分 组	TF 蛋白表达水平
空白对照组	0.04 $\pm$ 0.01
TNF- $\alpha$ 组	0.46 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ + Ang II 组	0.84 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ + Y27632 组	0.28 $\pm$ 0.08 <sup>ab</sup>
Ang II 组	0.38 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  组比较。

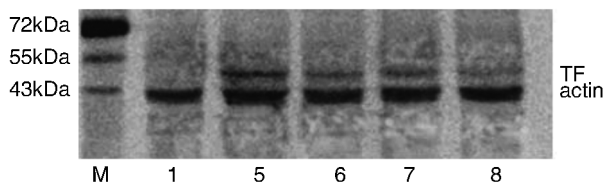


图 4. Western blot 方法测定 Ang II 与 Y27632 对 TF 蛋白表达水平的影响 M 为 marker,1 为空白组,5 为 TNF- $\alpha$  + Ang II 组,6 为 Ang II 组,7 为 TNF- $\alpha$ ,8 为 TNF- $\alpha$  + Y-27632 组, $\beta$ -actin 条带为 43 kDa,TF 目的条带为 47 kDa。

Figure 4. Western bolt indicated the effects of treatment with Ang II and Y27632 on TF expression

### 3 讨 论

Rho/Rho 激酶信号通路的关键信号分子包括 Rho 蛋白、Rho 激酶和肌球蛋白磷酸酶等。Rho 蛋白为小分子鸟苷酸结合蛋白(小 G 蛋白),是 Ras 蛋白超家族成员之一,在细胞的信号转导通路中通过作用于细胞骨架或其靶蛋白而产生多种生物效应。研究发现,所有 Rho 蛋白都是在它们的羧基末端被异戊烯化,通过这种异戊烯化作用引起活性 GTP 结合形式的 Rho 蛋白移位到胞膜,从而发挥其生物学效应。随着对促动脉粥样硬化因子的深入研究,Rho/Rho 激酶途径逐渐受到人们的关注。现已发现,Rho/Rho 激酶参与细胞黏附、迁移、平滑肌细胞收缩及胞质分裂等的调节,而这些细胞功能均参与了动脉粥样硬化的发生与发展<sup>[5]</sup>。动物实验及临床研究均证明,Rho/Rho 激酶与动脉粥样硬化、高血压、心肌缺血等心血管疾病的发病过程相关<sup>[6,7]</sup>。

临床及动物实验均已证实,他汀类药物具有抗炎、抗氧化及防止血栓形成等独立于降脂以外的多效性<sup>[8-10]</sup>,而其多效性可能与 Rho/Rho 激酶信号转导通路密切相关<sup>[11,12]</sup>。他汀类药物通过抑制信号分子 Ras 和 Rho 的异戊二烯化的作用,使 Rho/Rho 激酶灭活,从而延缓动脉粥样硬化的进展<sup>[13-15]</sup>。Masato 等<sup>[16]</sup>在研究凝血酶诱导的 TF 的表达途径及机制时发现,在 HAEC 和 HASMC 的培养基中凝血酶是经 Rho/Rho 激酶途径诱导 TF 表达的,经给予 Rho 激酶的特异性抑制剂 Y27632 可以阻止 TF 的表达作用,且存在剂量依赖性。而前期实验表明氟伐他汀可抑制 HUVEC 中 TNF- $\alpha$  诱导的 TF 表达,与以往的一些研究结果类似<sup>[17,18]</sup>。本研究同时发现,在 HUVEC 细胞中,TNF- $\alpha$  可诱导 TF、RhoA 蛋白表达,氟伐他汀除可抑制由 TNF- $\alpha$  诱导的 TF 表达外,还可明显抑制 RhoA 活化。在此基础上,本研究结果

最后证实, RhoA 蛋白特异的抑制剂(Y27632)对 TF 的表达有抑制作用,而 RhoA 蛋白的激动剂(Ang II)则促进 TF 的表达。上述研究提示 RhoA/Rho 激酶途径对 TNF- $\alpha$  诱导的 TF 表达具有调节作用,这条通路由 TNF- $\alpha$  激活, Rho/Rho 激酶可能参与了 TF 的形成过程,其特异的激动剂或抑制剂可分别促进或抑制 TF 的表达,氟伐他汀有可能通过 Rho/Rho 激酶途径对 TF 产生抑制作用。

综上所述, Rho 蛋白作为信号调节分子,其蛋白激酶的活化可能对 TNF- $\alpha$  诱导的 HUVEC 表面 TF 蛋白表达水平起调控作用,而氟伐他汀对 TF 的抑制作用至少是部分地源于对 RhoA/Rho 激酶的抑制作用。RhoA/Rho 激酶通路可能在 G 蛋白水平上参与了氟伐他汀对 TF 作用的调控,对于 RhoA/Rho 激酶信号通路在其中的作用及其评估,将为他汀类药物对血栓作用的分子机制提供新的视角,也为动脉粥样硬化的防治及改善心血管疾病患者的预后,提供有效的理论依据。

#### [参考文献]

[1] Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Circulation*, 2006, 113(5): 722-731.

[2] Wolfvitz F. The pleiotropic effects of statins[J]. *Harefuah*, 2005, 144(8): 577-582.

[3] Zawadzki C, Silsen S, Richard F, et al. Dyslipidemia shifts the tissue factor/tissue factor pathway inhibitor balance toward increased thrombogenicity in atherosclerotic plaques: evidence for a corrective effect of statins[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195: 117-125.

[4] Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T, et al. Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 163(1): 39-47.

[5] Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, et al. Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2004, 37: 537-546.

[6] Dai L, Wu S. Atorvastatin attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting RhoA/Rho kinase pathway[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2011, 36(1): 58-63.

[7] Yao L, Romero MJ, Toque HA, et al. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction[J]. *J Card-*

*iovasc Dis Res*, 2010, 1(4): 165-170.

[8] Liu PY, Liu YW, Lin LJ, et al. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation[J]. *Circulation*, 2009, 119(1): 131-138.

[9] Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2): 325-330.

[10] Haslinger-Lffler B. Multiple effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) besides their lipid-lowering function[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(5): 553-555.

[11] Bussolati B, Deregibus MC, Fonsato V, et al. Statins prevent ox-idized LDL- induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol3- kinase/AKT-signaling pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(7): 1 936-947.

[12] Vieira JM Jr, Rodrigues LT, Mantovani E, et al. Statin monotherapy attenuates renal injury in a salt-sensitive hypertension model of renal disease[J]. *Nephron Physiol*, 2005, 101(4): 82-91.

[13] Chiba Y, Arima J, Sakai H, et al. Lovastatin inhibits bronchial hyper- responsiveness by reducing RhoA signaling in rat allergic asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(4): 705-713.

[14] Chen W, Pendyala S, Natarajan V, et al. Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(4): 575-583.

[15] 张曼, 佟浩, 刘铁军, 等. 法舒地尔对大鼠动脉粥样硬化及 Rho 激酶表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(6): 805-809.

[16] Masato E, Toshiyuki K, Francesco C, et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells[J]. *Circulation*, 2002, 105(15): 1 756-765.

[17] 夏勇, 李先进, 杨煜, 等. 氟伐他汀对急性心肌梗死患者循环单核细胞基质金属蛋白酶 9 和组织因子表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(3): 237-239.

[18] 吴旭斌, 周胜华, 伍广伟, 等. 阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔肿瘤坏死因子  $\alpha$  和组织因子水平的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(2): 113-116.

(此文编辑 李小玲)