

瑞舒伐他汀对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生及线粒体融合素 2 表达的影响

周 炜, 陈曼华

(武汉市中心医院内科, 湖北省武汉市 430014)

[关键词] 瑞舒伐他汀; 内膜增生; 线粒体融合素 2

[摘 要] **目的** 研究瑞舒伐他汀对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生及线粒体融合素 2 表达的影响。**方法** 选取雄性 Wistar 大鼠 32 只, 随机分为假手术组、模型组、瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组, 每组 8 只。瑞舒伐他汀 1 组于术前 3 天开始每日给予瑞舒伐他汀 5 mg/kg 灌胃, 瑞舒伐他汀 2 组每日给予 20 mg/kg 灌胃, 模型组以蒸馏水灌胃, 随后制备颈动脉球囊损伤模型。建模后 14 天处死大鼠取颈动脉, HE 染色行组织形态学观察, 测量内膜/中膜面积比; 免疫组织化学、免疫印迹法检测线粒体融合素 2 和增殖细胞核抗原的表达; 依文思蓝染色观察血管内皮修复。**结果** 与假手术组比较, 模型组、瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组血管内膜增生, 内膜/中膜面积比值显著增加 ($P < 0.01$), 增殖细胞核抗原阳性细胞比值显著增加 ($P < 0.01$), 线粒体融合素 2 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组血管内膜/中膜面积比值显著降低 ($P < 0.01$), 增殖细胞核抗原阳性细胞比值显著降低 ($P < 0.01$), 线粒体融合素 2 表达显著增高 ($P < 0.05$), 且瑞舒伐他汀 2 组较瑞舒伐他汀 1 组变化更显著 ($P < 0.01$)。依文思蓝染色显示, 瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组再内皮化程度显著好于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 瑞舒伐他汀可抑制大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生, 同时促进内皮修复, 其作用可能与上调线粒体融合素 2 表达有关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of Rosuvastatin on Neointimal Hyperplasia and Mitofusin 2 Expression After Carotid Artery Balloon Injury in Rats

ZHOU Wei, and CHEN Man-Hua
(Department of Cardiology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430014, China)

[KEY WORDS] Rosuvastatin; Neointimal Hyperplasia; Mitofusin 2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of rosuvastatin on neointimal hyperplasia and mitofusin 2 (Mfn2) expression after carotid artery balloon injury in rats. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into sham-operated group, model group, rosuvastatin group 1 and group 2. The rats in the two rosuvastatin groups were given rosuvastatin 5 mg/kg or 20 mg/kg daily, respectively. The rats in the model group and the two rosuvastatin groups were induced neointimal hyperplasia by carotid artery balloon injury. After the rats were sacrificed at day 14, HE staining was used to observe the change of vascular morphology. Immunohistochemistry staining and Western blot were performed to measure the expression of Mfn2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Evans blue staining was used to measure the reendothelialized area. **Results** On the 14 th day after operation, compared with the model group, the neointimal area and intimal/media area ratio were significantly decreased in the two rosuvastatin groups ($P < 0.01$). Mfn2 expression was up-regulated in the two rosuvastatin groups ($P < 0.01$). Rosuvastatin did not inhibit the reendothelialized in the injured carotid arteries. **Conclusions** Rosuvastatin attenuates neointimal hyperplasia and restenosis in the rat carotid artery balloon injury model, which may be related to up-regulated expression of Mfn2.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 过度增殖在动脉粥样硬化、血管介入术后再

狭窄等细胞异常增殖性疾病的发生发展中起重要作用^[1]。目前发现,他汀类药物可通过原癌基因 Ras 法尼基化的相关机制阻断细胞外调节激酶 1/2 (extra-cellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号通路激活,发挥其抑制细胞增殖、抗动脉粥样硬化的作用^[2]。线粒体融合素 2 (mitofusin 2, Mfn2) 是从自发性高血压大鼠 VSMC 中克隆获得的基因,其表达产物可负向调控 ERK1/2 信号通路,抑制细胞增殖^[3]。目前关于他汀类药物对 Mfn2 的调节作用尚不十分清楚。因此,本研究建立大鼠颈动脉球囊损伤模型,观察瑞舒伐他汀对血管损伤后内膜增生和 Mfn2 表达的影响,为其临床应用提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂

Fogarty 2F 球囊导管(美国 Baxter Healthcare 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),高清晰度数字视屏显微镜(日本 Nikon 公司);Mfn2 抗体(英国 Abcam 公司);增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体(美国 Sigma 公司), α -肌动蛋白抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗(美国 Cell Signaling 公司);显色剂 DC protein assay reagent A/B(美国 Bio-Rad 公司)。SABC 免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色液(武汉博士德公司);瑞舒伐他汀(阿斯利康制药有限公司)。其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验分组

选取健康雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重 350~400 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。实验分为假手术组、模型组、瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组,每组 8 只。瑞舒伐他汀 1 组术前 3 天至术后 14 天每日给予瑞舒伐他汀 5 mg/kg 灌胃,瑞舒伐他汀 2 组药物剂量为 20 mg/kg,剂量的选择参考文献[4]。假手术组和模型组给予等量蒸馏水灌胃。

1.3 大鼠颈动脉球囊损伤再狭窄模型的建立

参考文献[5,6]进行。模型制备前 1 h 皮下注射普通肝素 300 U/kg,10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,取颈部正中切口,分离左侧颈总动脉及颈内、外动脉,血管夹夹闭颈总动脉近心端,自颈外动脉插入 2F 球囊导管后松开血管夹,将球囊送至颈总动脉起始处,以 3 个大气压扩张球囊,缓慢回抽球囊至颈总动脉分叉处,反复 3 次,每次将球囊旋转 120°,损伤后撤出球囊,结扎颈外动脉。逐层缝合皮下组织和皮肤,术后 20 万单位青霉素肌

肉注射,连用 3 天。假手术组仅分离血管,不行球囊损伤。术后 14 天处死大鼠,取损伤血管段 1 cm,4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋后切片。本实验遵循实验动物伦理委员会之相关规定。

1.4 HE 染色观察颈动脉球囊损伤后内膜/中膜面积的变化

石蜡切片行 HE 染色,光镜下观察,应用 Image-Pro plus 图像分析系统测定各组标本内膜、中膜面积及其比值(I/M)。内膜面积=内弹力膜围绕面积-管腔面积,中膜面积=外弹力膜围绕面积-内弹力膜围绕面积。

1.5 依文思蓝染色观察瑞舒伐他汀对内皮修复的影响

参考文献[7]进行,处死大鼠前,经股静脉注射 5 g/L 依文思蓝(10 mL/kg),30 min 后取损伤颈动脉段,将其纵向切开,平整固定,照相后用 Image-Pro plus 图像软件系统测定各组标本的染色面积与光密度相对值。用染色面积与光密度相对值的乘积表示内皮损伤的程度。

1.6 免疫组织化学分析 PCNA 在动脉内膜/中膜的表达

组织脱蜡、封闭,加入一抗(抗 PCNA)4℃ 孵育过夜,加入生物素标记的二抗室温孵育 30 min,使用 DAB 显色试剂盒进行显色;双蒸水洗中止反应、苏木素复染、脱水,中性树胶封片。切片用光学显微镜在高倍镜下(200 倍)随机选取 8 个视野,分别计数每个视野下血管中膜和内膜 VSMC 总数及 PCNA 阳性细胞数,求百分比,取平均值即为 PCNA 表达阳性细胞比值。

1.7 免疫印迹法检测损伤血管组织中 Mfn2 的表达

提取组织总蛋白,测定蛋白浓度。蛋白上样量为 50 μ g,经电泳、转膜、封闭后,将膜在一抗(抗 α -actin、抗 Mfn2)中 4℃ 孵育过夜。TBS-T 洗脱后放入辣根过氧化物酶标记的二抗中室温孵育 2 h,ECL 系统进行检测。Quantity One 软件测定条带灰度值,进行半定量分析。

1.8 统计学方法

相关实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瑞舒伐他汀对大鼠球囊损伤后内膜/中膜面积的影响

与假手术组比较,模型组、瑞舒伐他汀 1 组和瑞

舒伐他汀 2 组血管内膜增生,内膜/中膜面积比值显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组血管内膜/中膜面积比值显著

降低 ($P < 0.01$),且瑞舒伐他汀 2 组较瑞舒伐他汀 1 组变化更显著 ($P < 0.01$;图 1 和表 1)。

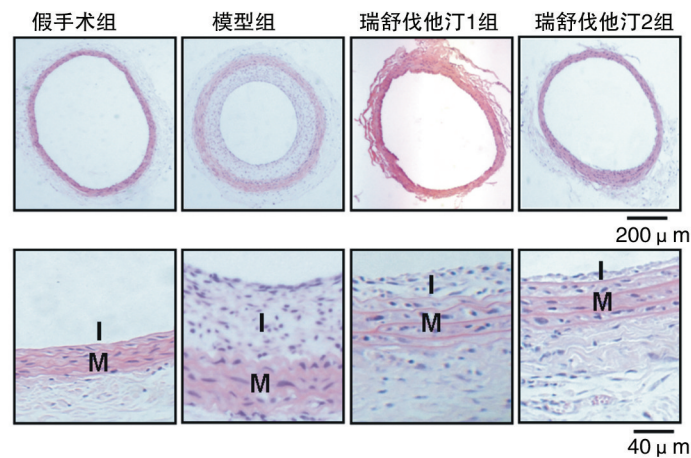


图 1. 瑞舒伐他汀对颈动脉球囊损伤后内膜增生的影响 I 为内膜,M 为中膜。

Figure 1. Effects of rosuvastatin on neointimal hyperplasia in balloon-injured arteries

表 1. 颈动脉球囊损伤后内膜/中膜面积比值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The intimal/medial ratio in balloon-injured arteries

分 组	内膜面积(mm^2)	中膜面积(mm^2)	内膜/中膜面积比值
假手术组	0.03 ± 0.01	0.38 ± 0.04	0.08 ± 0.01
模型组	0.67 ± 0.09^a	0.41 ± 0.05	1.67 ± 0.28^a
瑞舒伐他汀 1 组	0.35 ± 0.05^{ab}	0.39 ± 0.04	0.89 ± 0.14^{ab}
瑞舒伐他汀 2 组	0.22 ± 0.03^{abc}	0.39 ± 0.05	0.56 ± 0.03^{abc}

a 为 $P < 0.01$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型组比较;c 为 $P < 0.01$,与瑞舒伐他汀 1 组比较。

2.2 瑞舒伐他汀对内皮修复的影响

与假手术组比较,模型组、瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组蓝色区域面积与光密度相对值的乘积均显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组蓝色区域面积与光密度相对值的乘积显著降低 ($P < 0.05$;图 2 和表 2)。

表 2. 各组标本蓝色区域面积与光密度相对值乘积的比较

Table 2. Comparison of the product of each specimen blue area and light density relative ratio

分 组	蓝色区域面积(mm^2) $\times$ 光密度相对值
假手术组	0.09 ± 0.03
模型组	11.25 ± 2.47^a
瑞舒伐他汀 1 组	7.32 ± 0.84^{ab}
瑞舒伐他汀 2 组	7.06 ± 0.87^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

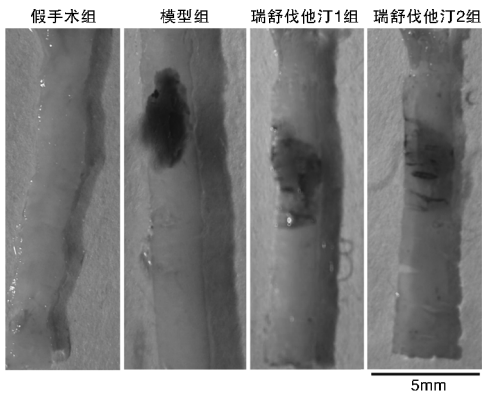


图 2. 依文思蓝染色观察瑞舒伐他汀对内皮修复的影响 血管内皮覆盖区不着色,内皮损伤区域被染成蓝色。

Figure 2. The Evans blue staining of reendothelialized area

2.3 PCNA 阳性细胞比值

与假手术组比较,模型组、瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组内膜、中膜 PCNA 阳性细胞比值显著增

加($P < 0.01$);与模型组比较,瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组内膜、中膜 PCNA 阳性细胞比值显著降低($P < 0.01$),且瑞舒伐他汀 2 组内膜 PCNA 阳性细胞比值较瑞舒伐他汀 1 组更低($P < 0.01$;图 3 和表 3)。

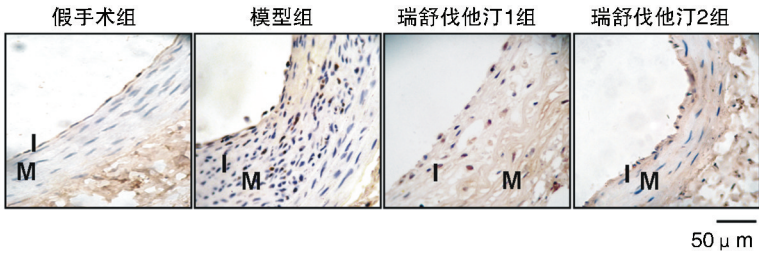


图 3. 免疫组织化学观察 PCNA 阳性细胞在颈动脉内膜、中膜的表达
Figure 3. The immunohistochemical staining of PCNA-positive cells in carotid intima-media

表 3. 颈动脉内膜、中膜 PCNA 阳性细胞比值($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3. The ratio of PCNA-positive cells in carotid intima-media

分 组	内膜	中膜
假手术组	6% $\pm$ 1%	9% $\pm$ 2%
模型组	83% $\pm$ 9% ^a	34% $\pm$ 6% ^a
瑞舒伐他汀 1 组	32% $\pm$ 4% ^{ab}	21% $\pm$ 3% ^{ab}
瑞舒伐他汀 2 组	18% $\pm$ 2% ^{abc}	19% $\pm$ 3% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.01$, 与瑞舒伐他汀 1 组比较。

2.4 Mfn2 的表达

与假手术组比较,模型组、瑞舒伐他汀 1 组、瑞舒伐他汀 2 组 Mfn2 的表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,瑞舒伐他汀 1 组和瑞舒伐他汀 2 组 Mfn2 的表达显著增高($P < 0.05$),且瑞舒伐他汀 2 组较瑞舒伐他汀 1 组增高更显著($P < 0.05$;图 4 和表 4)。

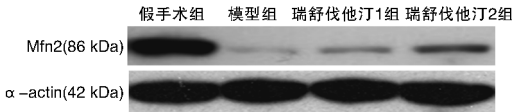


图 4. Mfn2 在血管组织中的表达
Figure 4. Mfn2 protein expression in rat carotid arteries

表 4. Mfn2 在血管组织中的表达及灰度相对比值($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 4. Mfn2 protein expression and quantitative date in rat carotid arteries

分 组	Mfn2 灰度相对比值
假手术组	0.83 $\pm$ 0.11
模型组	0.09 $\pm$ 0.02 ^a
瑞舒伐他汀 1 组	0.17 $\pm$ 0.03 ^{ab}
瑞舒伐他汀 2 组	0.26 $\pm$ 0.04 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与瑞舒伐他汀 1 组比较。

3 讨 论

VSMC 增殖-凋亡失衡是血管增生性疾病的主要特征。在某些病理情况下,炎症因子和生长因子激活,异常的血流剪切力,诱导血管中膜 VSMC 迁移到内膜层并大量增殖;细胞表型发生变化,由收缩型向合成型、促炎型转变,分泌细胞外基质蛋白增多,最终动脉壁增厚、管腔狭窄。这是动脉粥样硬化、血管介入治疗后再狭窄、冠状动脉旁路移植术后桥血管再狭窄、慢性移植物血管病的主要病理学基础^[1]。通过药物或基因治疗抑制 VSMC 增殖有可能成为治疗血管增殖性疾病的新手段。

他汀类药物是目前临床应用最广泛的调脂药物,尚具有多重调脂以外的作用。研究发现,他汀类药物通过抑制甲羟戊酸合成,使其下游的焦磷酸法尼酯和焦磷酸牛儿基牛儿酯减少,阻碍小三磷酸鸟苷结合蛋白 Ras、Rho、Rac 等异戊二烯化,影响 Ras-ERK1/2 及丝裂原活化的蛋白激酶信号通路、肾素-血管紧张素系统和过氧化体增殖物激活型受体的活性,增加一氧化氮水平,减少活性氧产生,因此具有抑制 VSMC 增殖、保护内皮细胞、阻止心肌肥厚、抗氧化应激和抗炎等调脂外作用^[2,8]。本研究发现,术前 3 天至术后 14 天给予瑞舒伐他汀可显著抑制大鼠颈动脉球囊损伤后内膜 VSMC 增生及再狭窄发生,血管内膜面积、内膜/中膜面积比值均较模型组减少,且大剂量组作用更显著。

目前临床使用的药物涂层支架中,雷帕霉素通过细胞周期依赖激酶使细胞周期停滞于 G1-S 期;紫杉醇促进微管聚合,抑制游离微管形成,使细胞周期停滞于 G2-M 期,可显著抑制 VSMC 增殖而降低冠状动脉支架置入术后再狭窄的发生率。但上述药物同时也抑制支架的内皮化,增加血栓形成及晚期再狭窄的风险^[9]。本研究中利用依文思蓝染色

表明,瑞舒伐他汀显著改善大鼠颈动脉球囊损伤后再内皮化的程度,表明瑞舒伐他汀抑制内膜 VSMC 增生的同时可促进内皮修复。

PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助蛋白,是评价细胞增殖状态的客观指标,亦被视为去分化型 VSMC 的重要标志^[10]。本研究发现,大鼠颈动脉球囊损伤后 14 天,血管内膜中膜 PCNA 阳性细胞均显著增多,而瑞舒伐他汀可降低 PCNA 表达,表明其具有抑制 VSMC 增殖及去分化的作用。

Mfn2 是细胞信号转导通路中一个新的调控点,对细胞增殖和凋亡有重要的调节作用。该基因是原癌基因 Ras 的直接负调控因子,能够与其相互作用,阻滞 Ras-ERK1/2 信号通路而将细胞周期阻断在 G0/G1 期,抑制细胞增殖^[3,11];高表达 Mfn2 可抑制 VSMC 迁移至内膜,并抑制其表型向分泌型和促炎型转变,具有局部抗炎和保护内皮细胞的作用^[12]。另有研究发现,胰腺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌和肺癌细胞系中均可见 Mfn2 的表达显著降低,而高表达 Mfn2 可抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡并提高其对放疗和化疗的敏感性^[13]。本研究发现,球囊损伤大鼠颈动脉内膜后,Mfn2 在血管壁中表达显著降低,而瑞舒伐他汀干预则可上调 Mfn2 表达,且大剂量组作用更显著。因此,Mfn2 可能参与瑞舒伐他汀抑制内膜 VSMC 增殖及保护内皮的过程,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, et al. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis[J]. J Vasc Res, 2010, 47 (2): 168-180.

[2] Davignon J, Mabile L. Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects [J]. Ann Endocrinol (Paris), 2001, 62 (1 Pt 2): 101-112.

[3] Chen KH, Guo XM, Ma DL, et al. Dysregulation of HSC triggers vascular proliferative disorders[J]. Nature Cell Biol, 2004, 6 (9): 872-883.

[4] Preusch MR, Vanakaris A, Bea F, et al. Rosuvastatin reduces neointima formation in a rat model of balloon injury [J]. Eur J Med Res, 2010, 15 (11): 461-467.

[5] Tulis DA. Rat carotid artery balloon injury model [J]. Methods Mol Med, 2007, 139: 1-30.

[6] Tulis DA. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model [J]. Methods Mol Med, 2007, 139: 31-66.

[7] van Beusekom HM, Whelan DM, Hofma SH, et al. Long-term endothelial dysfunction is more pronounced after stenting than after balloon angioplasty in porcine coronary arteries [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32 (4): 1 109-117.

[8] 盛莉,叶平,刘永学. 他汀类药物防治心肌梗厚的分子机制的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (5): 646-648.

[9] Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents [J]. Circ J, 2009, 73 (4): 615-621.

[10] Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K, et al. Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats [J]. Circ Res, 2003, 92 (7): e 62-69.

[11] 周炜,廖华,曹文静,等. 线粒体融合素 2 基因突变体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (11): 885-888.

[12] Jiang GJ, Mei H, Bin Z, et al. Hyperplasia suppressor gene associates with smooth muscle α -actin and is involved in the redifferentiation of vascular smooth muscle cells [J]. Heart Vessels, 2006, 21 (5): 315-320.

[13] Wu L, Li Z, Zhang Y, et al. Adenovirus-expressed human hyperplasia suppressor gene induces apoptosis in cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7 (1): 222-232.

(此文编辑 文玉珊)