

辛伐他汀抑制机械牵张力介导的巨噬细胞活性氧族元素的表达

裴婷, 周玉环, 刘科峰, 李子卿, 刘树迎, 平苏宁, 王晶晶, 汪泓, 李朝红

(中山大学中山医学院人体解剖与组织胚胎学教研室, 广东省广州市 510080)

[关键词] 辛伐他汀; 机械牵张力; 巨噬细胞; 活性氧族元素

[摘要] 目的 探讨机械牵张力刺激能否介导小鼠巨噬细胞活性氧族元素(ROS)的产生,并进一步探讨辛伐他汀对此作用的影响及其作用机制。方法 体外常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7,施加机械力刺激,或用辛伐他汀预处理细胞 60 min 后再施加此刺激,用荧光探针 H2DCFDA 检测巨噬细胞 ROS 的表达水平,以细胞免疫荧光定量阳性率和 SPSS 统计软件对其表达水平进行分析。Western blot 检测 NADPH 氧化酶 1(NOX1)的表达。结果 机械牵张力刺激介导的巨噬细胞 ROS 呈时间依赖性增多,以 60 min 最显著($P < 0.05$);辛伐他汀可抑制此刺激介导的巨噬细胞 ROS 表达增加,且抑制作用呈浓度依赖增强,以 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀的抑制作用最显著($P < 0.05$)。辛伐他汀可使机械牵张力介导的巨噬细胞 NOX1 表达显著减少。结论 辛伐他汀可通过抑制 NOX1 的表达从而抑制由机械牵张力介导的小鼠巨噬细胞 ROS 的表达。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Simvastatin Repressed ROS Expression of Macrophage Cells Induced by Stretch Stress

PEI Ting, ZHOU Yu-Huan, LIU Ke-Feng, LI Zi-Qing, LIU Shu-Ying, PING Su-Ning, WANG Jing-Jing, WANG Hong, and LI Chao-Hong

(Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Stretch Stress; Macrophage Cells; Reactive Oxygen Species

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of simvastatin on reactive oxygen species (ROS) expression in stretch stress (SS) induced macrophage cells. **Methods** RAW264.7 macrophage cells were cultured in vitro, treated with SS, or pretreated with simvastatin for 60 min and then stimulated with SS, the expression of ROS was detected by Hoechst33342 and H2DCFDA fluorescent probe, the fluorescence intensity of ROS was detected and the positive ratio of ROS was analysed by SPSS statistical software. The expression of NADPH oxidase 1 (NOX1) was evaluated by Western blot.

Results SS increased the expression of ROS in a time dependent manner, and the expression of ROS reached the most significant at 60 min ($P < 0.05$). Simvastatin could inhibit the effect induced by SS in a concentration dependent manner, the inhibition effect of simvastatin was the most significant in 0.3 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). The expression of NOX1 was significantly inhibited by simvastatin after SS. **Conclusion** Simvastatin repressed ROS expression of RAW264.7 macrophage cells induced by SS through inhibiting the expression of NOX1.

高血压的病理改变主要是小动脉病变。早期阶段全身小动脉痉挛,长期反复的痉挛使小动脉内膜因压力负荷增加、缺血缺氧出现玻璃样变,中层

则因平滑肌细胞增殖、肥大而增厚,出现血管壁重构,最后管壁纤维化、管腔狭窄呈现出不可逆病变。非常重要是正常血流产生的机械力对维持管壁

[收稿日期] 2015-07-06

[修回日期] 2015-09-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81070124 和 81171710);广东省自然科学基金项目(S2012010009199 和 S2013040015441);广东省科技计划项目(2014A020212109)

[作者简介] 裴婷,硕士研究生,研究方向为高血压及高血脂性动脉粥样硬化血管重塑的机制,E-mail 为 934185859@qq.com。周玉环,硕士研究生,研究方向为高血压及高血糖性动脉粥样硬化血管重塑的机制,E-mail 为 605785807@qq.com。通讯作者李朝红,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管重构的分子机制与防治,E-mail 为 lichaozhongzq@yahoo.com。

细胞的表型、分化及正常结构和功能是必须的,只有高血压所产生的异常机械力对血管重塑起关键作用。高血压所产生的异常机械力对血管平滑肌细胞的作用前期已有研究报道,有研究指出,机械牵张力伴或不伴去甲肾上腺素可通过 $G\alpha_q$ 蛋白或 ERK 信号通路诱导血管平滑肌细胞增殖^[1]。还有研究显示,机械牵张力伴或不伴晚期糖基化终末产物可诱导血管平滑肌细胞增殖和 ERK 信号通路激活^[2]。然而,其对巨噬细胞功能和氧化应激的影响以及辛伐他汀对此种作用的影响均不明确,未见报道。

在合并高血脂的情况下,大血管易发生动脉粥样硬化病变,从而令血管重塑的过程显著加速。已知血管平滑肌细胞和巨噬细胞在粥样硬化斑块中起重要作用,血管平滑肌细胞的氧化应激前期已有大量研究报道,而对于血管壁巨噬细胞的氧化应激在动脉粥样硬化中的作用目前研究不多,机制尚不清楚。线粒体偶联的酶、细胞色素 P450、黄嘌呤氧化酶及 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)都能产生 ROS,从而引发细胞的氧化应激。虽然在不同的组织和细胞中多种酶可以产生活性氧族元素(reactive oxygen species, ROS)引发氧化应激,但越来越多的研究表明在生理条件下 NOX 是产生 ROS 最主要的来源^[3]。NOX 由多个亚单位组成,前期研究指出,NOX1 亚单位高表达于心血管系统。

本研究旨在观察机械牵张力对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 ROS 产生的影响及辛伐他汀对此作用的影响,并通过探讨 NOX1 的表达水平初步揭示辛伐他汀影响 ROS 产生的作用机制,为阐明辛伐他汀在动脉粥样硬化血管重塑中的作用机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 购自 ATCC 公司; DMEM 培养基为 Gibco 产品;胎牛血清购自天津灏洋(TBD)公司;Hoechst33342 和辛伐他汀购自 Sigma 公司;荧光探针 H2DCFDA 购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 用含 10% 标准胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。待细胞长满培养瓶时,常规使用细胞刮进行传代,刮下后,将细胞悬液离心,而后以 2×10^4 密度的细胞悬液接种于 6 孔硅胶牵拉板。

1.3 辛伐他汀工作液的配制

于瓶装辛伐他汀粉末中加入 95% 乙醇 100

μL ,混匀后加入 0.1 mol/L NaOH 15 μL ,于 50℃ 水浴箱中静置 2 h,最后定容到 1 mL,分装后于 4℃ 冰箱保存,即为 10 mmol/L(5 g/L)的储存液。

1.4 Hoechst33342 及荧光探针 H2DCFDA 对活细胞的染色

荧光探针 H2DCFDA 本身无荧光,但可自由穿透细胞膜,被细胞内的酯酶水解成 DCFH,其也不能穿透细胞膜,但容易被装载到细胞内。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH,使其变成有荧光的 DCF,故而在荧光倒置显微镜下检测 DCF 的荧光就可了解细胞内 ROS 水平。配制 H2DCFDA 荧光探针染液和 Hoechst33342 核标记荧光染液的储存液,浓度分别为 10 mmol/L、16 mmol/L,使用前溶于无血清培养基中,使二者终浓度分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、16 $\mu\text{mol/L}$,对细胞施加刺激后,吸弃培养液,用无血清的培养基清洗后,加入上述含两种荧光染液的无血清培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min;结束后吸弃培养液,用 37℃ 的无血清培养基和 PBS 各清洗 2 遍,立即于倒置荧光显微镜下观察,并拍片保存,以备分析。全过程均避光。

1.5 不同牵拉力介导的小鼠巨噬细胞 ROS 产生的检测

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 以 2×10^4 的密度接种于 6 孔牵拉板中,待细胞生长至 80% 汇合时,换用无血清的培养基饥饿细胞 12 h,用 10% 的机械牵拉力分别刺激其 0 min、10 min、30 min、60 min。结束后用荧光探针 H2DCFDA 和核标记荧光染液 Hoechst33342 检测细胞 ROS 的产生。将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 以 2×10^4 的密度接种于 6 孔硅胶牵拉板中,待其生长至 80% 汇合时,换无血清培养基同步化处理 12 h,分别以 0、0.1、0.2、0.3 及 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 预处理细胞 1 h,再施加拉伸量为 10% 的机械牵拉力,作用 10 min。另设两组对照:辛伐他汀对照组,仅使用 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀处理细胞,不施加机械牵拉力;阴性对照组,不施加任何因素。使用 H2DCFDA 探针和核标记染液 Hoechst33342 检测 ROS 的产生。根据细胞荧光定量阳性率确定其产生 ROS 水平,即 H2DCFDA 探针荧光阳性细胞数与总细胞数的比值。

1.6 Western blot 检测 NOX1 的表达

将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 以 2×10^4 的密度接种于 6 孔硅胶牵拉板中,待其生长至 80% 汇合时,换无血清培养基同步化处理 12 h。分为四组:阴性对照组、辛伐他汀对照组(浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$)、

牵拉组(给予机械牵张力 16 h)、辛伐他汀预处理 + 牵拉组(浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的辛伐他汀预处理 1 h 后,给予机械牵张力 16 h)。用 Western blot 检测以上四组 NOX1 的表达。

1.7 统计学方法

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

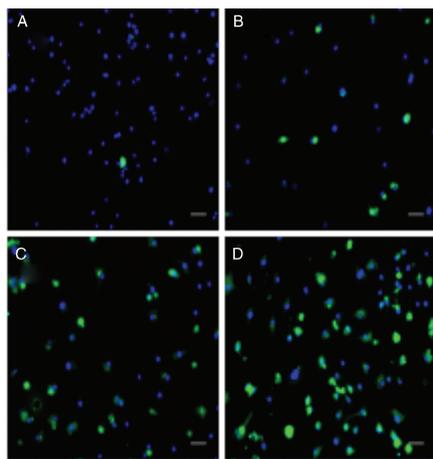


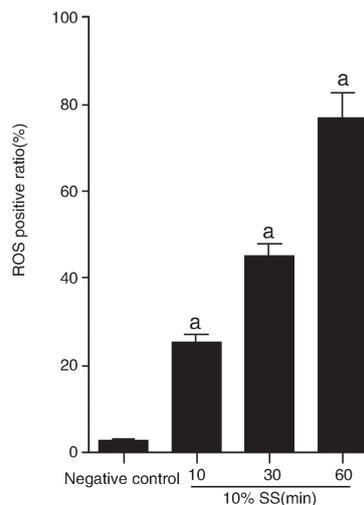
图 1. 不同牵拉时间对巨噬细胞 ROS 产生的影响 ($\times 200$)
为 $P < 0.05$,与阴性对照组比较。

Figure 1. Effects of production of ROS in mice macrophages induced by SS at different time point

2 结果

2.1 机械牵拉力对小鼠巨噬细胞 ROS 产生的影响

用牵拉仪对小鼠巨噬细胞施加拉伸量为 10% 的牵拉力,分别作用 0 min、10 min、30 min 及 60 min,孵育荧光探针和核标记染液并清洗后,倒置荧光显微镜下,根据绿色荧光判断细胞 ROS 的表达,可见发绿色荧光的细胞数目随着牵拉时间延长而增加,表示牵拉力刺激可促进细胞产生 ROS(图 1)。



A、B、C、D 分别为 10% 的牵拉力作用 0 min、10 min、30 min 及 60 min。a

2.2 辛伐他汀对机械牵拉力介导的小鼠巨噬细胞 ROS 产生的影响

巨噬细胞用无血清的培养基饥饿 24 h 后,以 10 mmol/L 的辛伐他汀预处理细胞,使其终浓度分别为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中作用 1 h,而后施加拉伸量为 10% 的机械牵张力,作用 10 min,用荧光探针和核标记荧光染液对细胞染色,倒置荧光显微镜下,辛伐他汀对机械牵张力介导的巨噬细胞产生 ROS 有抑制作用,且随着辛伐他汀浓度的增高其抑制作用逐渐增强(图 2)。

2.3 辛伐他汀对机械牵张力介导的小鼠巨噬细胞 NOX1 表达的影响

Western blot 检测显示,机械牵张力可上调 NOX1 表达,而辛伐他汀对机械牵张力介导的巨噬细胞 NOX1 的表达有抑制作用,且随着辛伐他汀浓度的增高其抑制作用逐渐增强(图 3)。

3 讨论

在本研究中,依照前期实验数据确定施加拉伸

量为 10% 的机械牵张力^[4],并且依照前期对 ROS 的检测方法^[5],证实在此作用下,血管壁巨噬细胞 ROS 的产生增加,且随着作用时间的延长 ROS 的增加越显著,表明了高血压所产生的异常机械牵张力可促进巨噬细胞 ROS 的产生,促进细胞氧化应激的发生,最终加速动脉粥样硬化的病变过程。而采用不同浓度的辛伐他汀预先处理细胞 1 h,结束后再施加拉伸量为 10% 的机械牵拉力作用 10 min,并使用荧光探针和核标记染液对细胞进行染色,清洗后于倒置荧光显微镜下观察,产生绿色荧光的细胞数目逐渐减少,说明辛伐他汀可明显抑制巨噬细胞 ROS 的产生,且随着辛伐他汀浓度的升高抑制作用亦加强。用 Western blot 证实了辛伐他汀通过抑制 NOX1 的表达从而抑制机械牵张力介导的小鼠巨噬细胞 ROS 的表达。因此本研究首次证实了高血压所产生的异常机械牵张力可促进血管壁巨噬细胞 ROS 的产生,并首次证实了辛伐他汀对此促进作用的抑制作用和作用机制。这也揭示了辛伐他汀除了前期已知的降血脂作用外,在延缓动脉粥样硬化血管重塑病变进展中的作用机制。

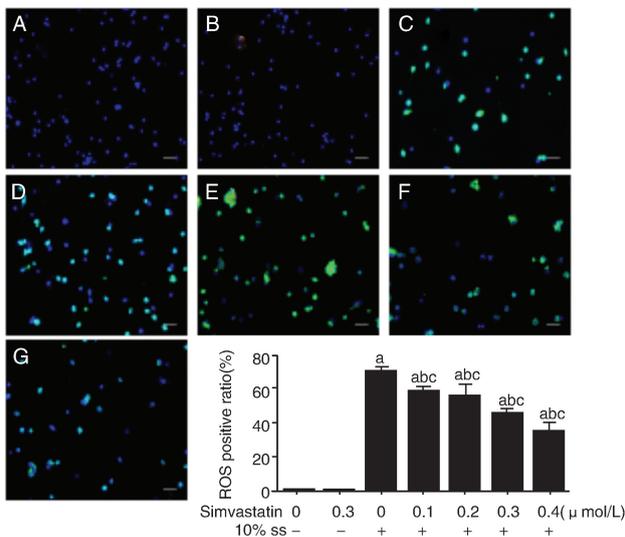


图 2. 不同浓度辛伐他汀对机械牵拉力介导的巨噬细胞 ROS 产生的影响 ($\times 200$) A 为阴性对照组, B 为辛伐他汀对照组, C 为牵拉组, D 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀预处理 + 牵拉组, E 为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀预处理 + 牵拉组, F 为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀预处理 + 牵拉组, G 为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀预处理 + 牵拉组。a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与辛伐他汀对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与牵拉组比较。

Figure 2. Effect of production of ROS in mice macrophages induced by SS after pretreatment of different concentration of simvastatin

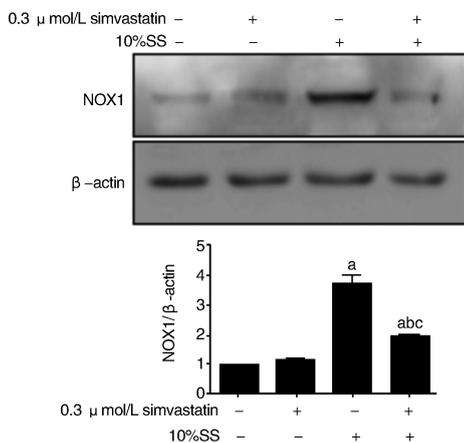


图 3. 辛伐他汀对机械牵拉力介导的小鼠巨噬细胞 NOX1 表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与辛伐他汀对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与牵拉组比较。

Figure 3. Effects of simvastatin on the expression of NOX1 of mice macrophages induced by SS

目前已知 ROS 在脉管系统中的作用是调节细胞信号通路, 从而介导各种急性和慢性的细胞表型改变, 它的这项特殊功能通过调节细胞支架性能、增殖、迁移、死亡和细胞外基质的改变使其在血管重塑过程中起到关键作用^[6]。异常增多的 ROS 参

与了动脉粥样硬化血管病变各个阶段的形成过程^[7]。已知在动脉粥样硬化病灶中发现有大量的炎症细胞浸润, 以单核/巨噬细胞的聚集为主要特征^[8], 且已有文献报道 ROS 可以激活巨噬细胞^[9], 而巨噬细胞的活化又可产生更多的 ROS, 从而导致恶性循环, 加速病变进展。在动脉粥样硬化的发病机制中, 巨噬细胞起到了至关重要的作用, 它清除脂质和组织碎片, 尤其对组织损伤和血管壁的重塑起到关键作用。由于巨噬细胞的多功能性和可塑性, 它可促进一系列的病理过程, 包括释放各种细胞因子和酶类、ROS、组织重塑因子等^[10]。因而可以认为血管壁中巨噬细胞的氧化应激是导致动脉粥样硬化血管重构的重要机制之一。

已有大量研究报道, 氧化型低密度脂蛋白可介导巨噬细胞产生大量 ROS, 诱导其氧化应激。然而, 目前关于高血压所产生的异常机械牵张力对巨噬细胞氧化应激的影响尚不清楚, 暂无报道。前期有关高血压引起的机械牵张力作用于巨噬细胞的研究指出, 氧化型低密度脂蛋白和机械牵张力刺激可分别引起细胞内 ERK1/2 活性增加, 呈时间和强度依赖性; 与氧化型低密度脂蛋白组和机械牵张力组相比, 氧化型低密度脂蛋白和机械牵张力协同处理可使 ERK1/2 磷酸化明显增加^[4]。这也证实了高血压所产生的异常机械牵张力可激活血管壁巨噬细胞内信号通路。高血压血管重构的机制尚未完全明了, 研究表明 ROS 诱导的氧化应激参与了高血压血管重构的各个环节, 在高血压血管重构的发生、发展中起重要作用^[11]。资料显示血管平滑肌细胞膜上存在上百种受体、离子通道以及未知蛋白成分等。研究发现, 血管平滑肌细胞膜上受体可直接被机械牵张力激活, 并且最近在国际上首次提出“机械牵张力可同时非特异性多通道激活细胞膜受体信号”的学术理论^[12]。该假说还指出, 机械力刺激可直接或间接地作用于细胞上的很多种分子, 包括受体、离子通道、小凹蛋白、G 蛋白、细胞骨架、激酶和转录因子, 心血管系统的细胞如何感知并且将细胞外的机械力刺激转变为胞内的生物信号是了解心血管疾病发展机制的关键所在^[13]。以上资料均证实了高血压机械牵张力对血管平滑肌细胞内信号通路的激活作用。但是巨噬细胞膜上的受体及离子通道等是否也可被机械牵张力所激活, 目前尚不确定。在高血压患者中, 血管重构加速, 但是目前血管壁中巨噬细胞的氧化应激与高血压所产生的异常机械牵张力之间的关系尚不明确。

辛伐他汀是土曲霉发酵产物的合成衍生物, 作

为他汀类的降血脂药物,用于控制血液中胆固醇的含量以及预防心血管疾病。之前有研究提出,辛伐他汀可以抑制机械牵张力或不伴氧化型低密度脂蛋白介导的大鼠血管平滑肌细胞 ERK 活性和 Ki67 表达的增加^[14]。现亦有大量研究资料指出其可抑制氧化型低密度脂蛋白所介导的巨噬细胞 ROS 的产生。

大量研究资料指出血管壁中巨噬细胞的氧化应激是导致动脉粥样硬化血管重构的重要机制之一,且在合并高血压时可显著加速血管重构的过程,因此探讨高血压产生的异常机械牵张力对巨噬细胞 ROS 产生的影响具有重要意义。本研究首次证实了高血压产生的异常机械力可促进巨噬细胞 ROS 的产生,并呈时间依赖性增多;亦首次证实了辛伐他汀可抑制上述作用,且抑制作用呈浓度依赖性增强,并揭示了其通过抑制 NOX1 的表达从而抑制 ROS 的产生。此结论是对之前提出的高血压异常机械牵张力可同时非特异性多通道激活细胞膜受体信号理论的补充,也揭示了辛伐他汀除了降血脂作用外,在延缓动脉粥样硬化血管重塑的机制中的作用。

[参考文献]

- [1] Liu S, Li Y, Zhang Z. α 1-Adrenergic receptors mediate combined signals initiated by mechanical stretch stress and norepinephrine leading to accelerated mouse vein graft atherosclerosis[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 57 (6): 1 645-656.
- [2] Li Y, Liu S, Zhang Z. RAGE mediates accelerated diabetic vein graft atherosclerosis induced by combined mechanical stress and AGEs via synergistic ERK activation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35016.
- [3] 李国华,魏欣冰,张岫美,等. NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号转导在高同型半胱氨酸血症中的作用及分子机制[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31 (5): 602-607.
- [4] 宁粉,汪照静,张征宇,等. 氧化型低密度脂蛋白协同

机械牵张力促进巨噬细胞 ERK1/2 活化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (12): 925-930.

- [5] 周玉环,刘树迎,平苏宁,等. Hoechst33342 与 DAPI 标记细胞核胞内活性氧检测效果的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (1): 75-78.
- [6] Staiculescu MC, Foote C, Meininger GA, et al. The role of reactive oxygen species in microvascular remodeling[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (12): 23 792-835.
- [7] 葛良清,石瑞正,张国刚. NADPH 氧化酶家族与高血压血管重构[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33 (5): 1 673-2 588.
- [8] 唐志晗,江璐,任重,等. 枯草溶菌素转换酶 9 siRNA 抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (3): 192-196.
- [9] Mulens-Arias V, Rojas JM, Pérez-Yagüe S. Polyethyleneimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 494-506.
- [10] Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG. Macrophages in vascular inflammation-from atherosclerosis to vasculitis[J]. *Autoimmunity*, 2015, 48 (3): 139-151.
- [11] 魏万林,刘文,张薇,等. 氧化应激与血管重构[J]. *实用老年医学*, 2008, 22 (1): 66-69.
- [12] 李朝红. 主动脉血管平滑肌细胞膜受体和离子通道介导机械牵张力信号的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (7): 615.
- [13] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transduction in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo[J]. *Cell Signal*, 2007, 19 (5): 881-891.
- [14] Zhang Z, Zhang M, Li Y. Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stretch stress and oxLDL through LOX-1 pathway[J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (1): 332-340.

(此文编辑 文玉珊)