

## 阿托伐他汀对家兔动脉粥样硬化 VSMC 凋亡的影响及其相关分子机制

杨国勋, 傅华军, 刘唐威, 李健玲, 申颖, 钱静

(广西医科大学第一附属医院心血管病研究所, 广西壮族自治区南宁市 530021)

[关键词] 阿托伐他汀; 血管平滑肌细胞; 大电导钙激活钾通道; KCNMB1 基因; ERK 信号通路

[摘要] **目的** 分析家兔动脉硬化时大电导钙激活钾通道(BKCa)的表达以及阿托伐他汀干预后的变化,探讨阿托伐他汀对家兔动脉硬化血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡的影响及其相关分子机制。**方法** 家兔分为正常组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组,HE染色观察家兔动脉粥样硬化病变,TUNEL检测VSMC凋亡并计算凋亡指数(AI),原位杂交法检测兔胸主动脉BKCa $\beta$ 亚单位KCNMB1基因的表达,蛋白印迹法检测磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(p-ERK1/2)的表达。**结果** 动脉粥样硬化组胸主动脉内膜显著增厚,呈较典型的动脉粥样硬化病变;阿托伐他汀组VSMC凋亡指数较正常组、动脉粥样硬化组明显升高( $36.51\% \pm 1.53\%$ 比 $6.80\% \pm 1.08\%$ 、 $27.83\% \pm 1.36\%$ , $P < 0.01$ );动脉粥样硬化组KCNMB1基因的表达较正常组明显下调( $105.12 \pm 5.50$ 比 $147.33 \pm 5.76$ , $P < 0.01$ ),而阿托伐他汀组KCNMB1基因的表达较动脉粥样硬化组明显增加( $116.43 \pm 6.92$ 比 $105.12 \pm 5.50$ , $P < 0.01$ );阿托伐他汀组p-ERK1/2表达量低于动脉粥样硬化组( $0.90 \pm 0.14$ 比 $3.48 \pm 0.91$ , $P < 0.01$ )。**结论** 阿托伐他汀诱导动脉粥样硬化VSMC凋亡,该现象可能与其上调BKCa的KCNMB1基因表达及抑制ERK信号途径磷酸化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of atorvastatin on VSMC apoptosis in rabbits with atherosclerosis and its molecular mechanism

YANG Guo-Xun, FU Hua-Jun, LIU Tang-Wei, LI Jian-Ling, SHEN Ying, QIAN Jing

(Institute of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Vascular smooth muscle cells; Big conductance calcium-activated potassium channel; KCNMB1 gene; ERK signal pathway

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the expression of calcium activated potassium channel (BKCa), phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) and apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMC) from rabbits with atherosclerosis before and after atorvastatin treatment, and to discuss whether atorvastatin-induced VSMC apoptosis in rabbits with atherosclerosis is associated with BKCa upregulation and ERK signaling pathway inhibition. **Methods** Experimental rabbits were divided into normal group, atherosclerosis group and atorvastatin group. Tissue samples were taken and rabbit atherosclerotic lesions were observed by HE staining, TUNEL assay was used to measure the apoptosis of VSMC, qPCR and Western blot were performed for detection of rabbit aortic BKCa KCNMB1 mRNA and p-ERK1/2 protein, respectively. **Results** In atherosclerosis group, the intima of thoracic aorta was significantly thickened, showing typical atherosclerotic lesions. The apoptotic index of VSMC in atorvastatin group was significantly higher than that in normal group and atherosclerosis group ( $36.51\% \pm 1.53\%$  vs.  $6.80\% \pm 1.08\%$  and  $27.83\% \pm 1.36\%$ ,  $P < 0.01$ ). The KCNMB1 mRNA expression in atherosclerosis group was significantly lower than that in normal group ( $105.12 \pm 5.50$  vs.  $147.33 \pm 5.76$ ,  $P < 0.01$ ), while the KCNMB1 mRNA expression in atorvastatin group was significantly higher than that in atherosclerosis group ( $116.43 \pm 6.92$  vs.  $105.12 \pm 5.50$ ,  $P < 0.01$ ). Phosphorylation of ERK1/2 in atorvastatin group was lower than that in atherosclerosis group ( $0.90 \pm 0.14$  vs.  $3.48 \pm 0.91$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Atorvastatin can induce VSMC

[收稿日期] 2016-05-31

[修回日期] 2017-02-23

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013175)

[作者简介] 杨国勋, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向为高血压、冠心病的基础与临床, E-mail 为 bdyanguoxun@163.com。

apoptosis, which may be related to the upregulation of KCNMB1 gene expression and the inhibition of phosphorylation of ERK signaling pathway.

动脉粥样硬化是临床常见心脑血管疾病的病理基础,因此减少以及防治动脉粥样硬化对减少心脑血管疾病的发生具有重要的意义。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖与凋亡失衡在动脉粥样硬化的发生及发展中起重要作用。大电导钙激活钾通道(big conductance calcium-activated potassium channel, BKCa)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号途径均被认为参与平滑肌细胞凋亡的调节<sup>[1-2]</sup>。BKCa为VSMC上最主要的钾离子通道,由 $\alpha$ 和 $\beta$ 两种亚单位组成,其中 $\beta$ 1亚基主要分布于动脉平滑肌,编码 $\beta$ 1亚基的基因为KCNMB1。ERK包括ERK1和ERK2,磷酸化ERK(phosphorylated ERK, p-ERK)是其活化形式<sup>[3]</sup>。阿托伐他汀诱导动脉粥样硬化早期VSMC凋亡是其抗动脉粥样硬化机制之一,但是否通过影响BKCa表达和ERK信号途径来实现以及它们的关系尚未完全阐明。本研究试图通过检测BKCa表达和p-ERK1/2水平变化来研究阿托伐他汀对家兔VSMC凋亡的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康3~4月龄家兔20只,雌雄各半,由广西医科大学动物实验中心提供。

### 1.2 主要仪器和试剂

倒置显微镜(Olympus公司);高速低温离心机(Eppendorf公司);切片机、病理图像分析仪DMR+Q550型(德国LEICA公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche Diagnostics GmbH公司);KCNMB1原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);p-ERK1/2抗体(R&D公司); $\beta$ -actin内参抗体(EarhOx公司)。阿托伐他汀片剂,每片10 mg,辉瑞制药有限公司生产,生产批号为20100830。

### 1.3 动物分组和模型制备

家兔随机分为3组:正常组8只,雌兔3只,雄兔5只,每天给予普通饲料;动脉粥样硬化组6只,雌兔3只,雄兔3只,每天每只给予高胆固醇饲料100 g;阿托伐他汀组6只,雌兔4只,雄兔2只,前10周喂养同动脉粥样硬化组,后6周每天每只加服阿托伐他汀5 mg,一次予温水灌服。家兔分笼饲养,每笼2只,不限饮水,观察16周。

### 1.4 标本处理

实验结束后禁食12 h,经耳缘静脉注入空气处死动物,分离胸主动脉,生理盐水冲洗,分离外膜脂肪组织及筋膜,用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,3~4  $\mu$ m厚度切片待用。

### 1.5 胸主动脉平滑肌细胞凋亡测定

用TUNEL法制备凋亡细胞切片以进行光学显微镜观察并拍照。结合凋亡细胞形态特征来综合判断,每只家兔观察2张切片,每张切片随机记数5个高倍视野下的凋亡细胞数,凋亡指数(apoptotic index, AI)=凋亡细胞数/细胞总数 $\times$ 100%。

### 1.6 胸主动脉 KCNMB1 基因表达的检测

采用原位杂交法检测胸主动脉KCNMB1基因的表达。每只兔取2张切片,使用病理图像分析仪,高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个),每个视野随机测量20个胞浆内的灰度值,计算均数,作为该视野的灰度值,然后进行整理和统计分析。

### 1.7 p-ERK1/2 蛋白的表达检测

收集实验兔胸主动脉标本,采用Western blot检测相关蛋白表达,其中p-ERK1/2的磷酸化检测位点为Thr202/Tyr204。用凝胶图像分析软件扫描,测定蛋白条带的灰度值,结果用实测值与内参 $\beta$ -actin的比值表示。

### 1.8 统计学分析

所得数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用SPSS19.0统计软件进行分析。多组间比较采用方差分析,方差不齐改用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动脉粥样硬化模型的鉴定

光镜下HE染色显示,正常组兔胸主动脉内膜光滑完整,未见明显增厚,内皮紧贴内弹力膜,中层弹力膜与平滑肌相间排列,排列整齐;动脉粥样硬化组兔胸主动脉内膜增厚明显,粥样斑块向内膜表面隆起,可见大量泡沫细胞,薄纤维帽,中膜弹力纤维断裂,平滑肌细胞极性紊乱;阿托伐他汀组兔胸主动脉可见动脉粥样硬化斑块,内膜稍增厚,泡沫细胞含量较少,可见较厚纤维帽(图1)。因此,动物模型符合实验需求。

2.2 兔胸主动脉平滑肌细胞凋亡情况

三组兔胸主动脉组织切片 TUNEL 染色后均可见细胞核碎裂、胞质充满深棕色颗粒的细胞(图 2), 表明这些细胞发生了凋亡。正常组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组细胞凋亡指数分别为  $6.80\% \pm 1.08\%$ 、 $27.83\% \pm 1.36\%$ 、 $36.51\% \pm 1.53\%$ , 正常组细胞凋亡指数很低, 阿托伐他汀组细胞凋亡指数较动脉粥样硬化组明显升高( $P < 0.01$ )。

2.3 兔胸主动脉平滑肌细胞 KCNMB1 mRNA 的表达

原位杂交检测表明, 正常组 KCNMB1 mRNA 高表达, 动脉粥样硬化组 KCNMB1 mRNA 表达明显减弱, 阿托伐他汀组 KCNMB1 mRNA 的表达与动脉粥样硬化组相比明显增加( $P < 0.01$ ; 图 3)。正常组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组 KCNMB1 mRNA 表达的灰度值分别为  $147.33 \pm 5.76$ 、 $105.12 \pm 5.50$ 、 $116.43 \pm 6.92$ 。

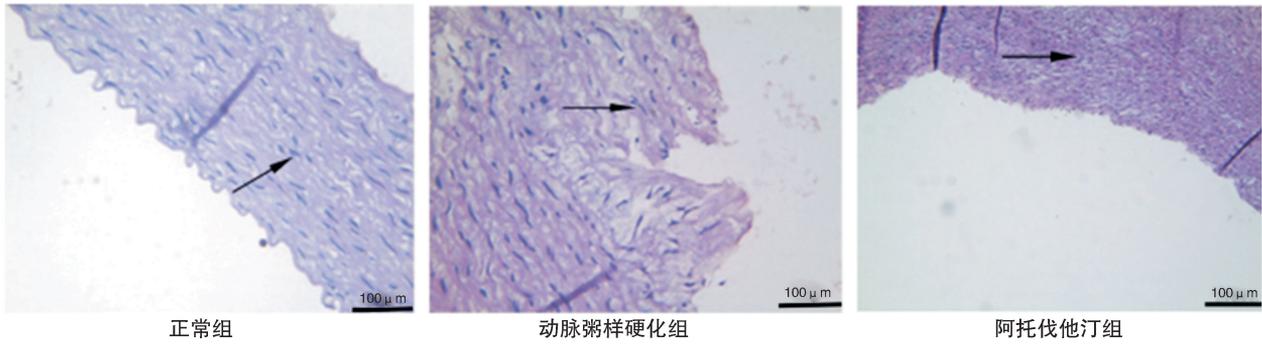


图 1. 各组兔胸主动脉组织形态学改变  
Figure 1. Morphological changes of rabbit thoracic aorta tissues in each group

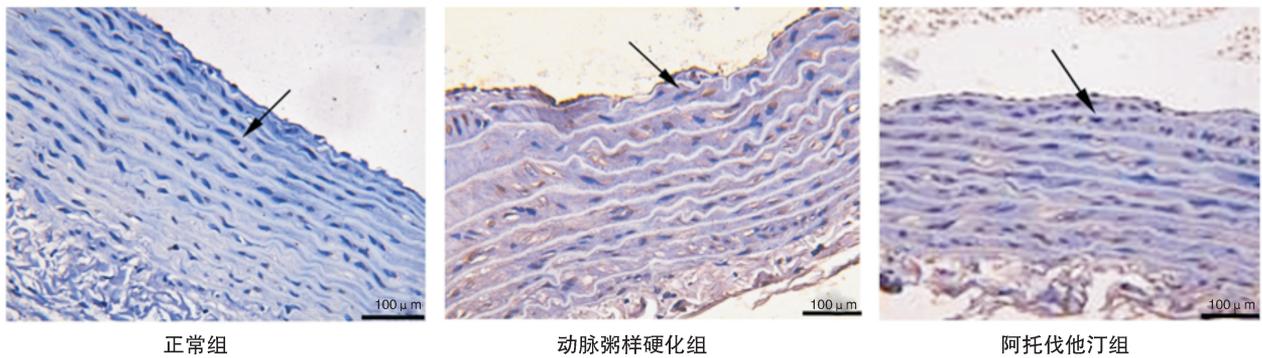


图 2. 兔胸主动脉平滑肌细胞凋亡检测  
Figure 2. Apoptosis detection of rabbit thoracic aortic smooth muscle cells

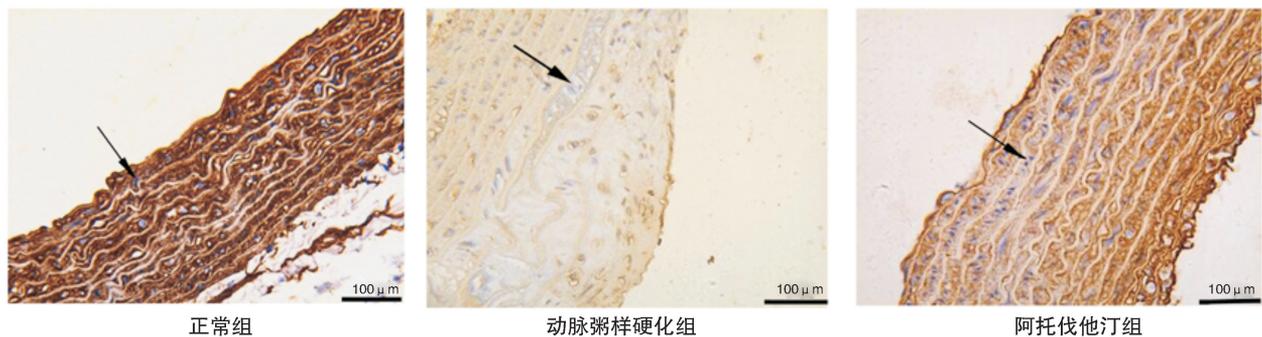


图 3. 兔胸主动脉平滑肌细胞 KCNMB1 mRNA 表达  
Figure 3. KCNMB1 mRNA expressions in rabbit thoracic aorta smooth muscle cells

#### 2.4 阿托伐他汀对兔胸主动脉平滑肌细胞 p-ERK1/2 表达的影响

动脉粥样硬化组 p-ERK1/2 呈高表达,阿托伐他汀干预后显著抑制 p-ERK1/2 的表达( $P<0.01$ ;图4)。动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组 p-ERK1/2 表达量分别为  $3.48\pm 0.91$ 、 $0.90\pm 0.14$ 。

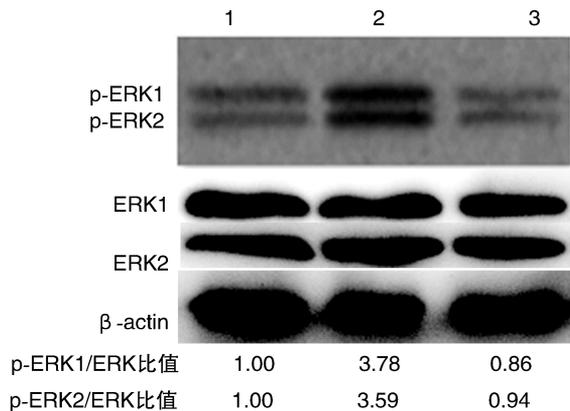


图4. 各组兔胸主动脉平滑肌细胞 p-ERK1/2 的表达 1 为正常组,2 为动脉粥样硬化组,3 为阿托伐他汀组。

Figure 4. Expression of p-ERK1/2 in rabbit thoracic aortic smooth muscle cells in each group

### 3 讨论

研究发现在正常血管和动脉粥样硬化各个阶段的 VSMC 都存在细胞凋亡,但正常 VSMC 增殖和凋亡指数都很低<sup>[4]</sup>。随着动脉粥样硬化发生发展,平滑肌细胞的增殖和凋亡均增加,VSMC 的表型可由收缩型转化为合成型,表现出显著的增殖特性<sup>[5-6]</sup>。平滑肌细胞增殖速率若大于凋亡速率,则会导致血管壁细胞数量增多、内膜增厚、管腔变窄,因此,调节增殖与凋亡之间的平衡对于抗动脉粥样硬化尤为重要。他汀类药物具有抗动脉粥样硬化作用,其是否通过诱导 VSMC 凋亡尚有争议。Doyon 等<sup>[7]</sup>认为,阿托伐他汀不能诱导自发性高血压大鼠胸主动脉 VSMC 凋亡;而 Suski 等<sup>[8]</sup>发现,阿托伐他汀在体外呈时间和剂量依赖性诱导 VSMC 凋亡。本研究中,正常组 VSMC 凋亡指数很低;动脉粥样硬化组随着 VSMC 增殖明显的同时,凋亡亦明显增加。而阿托伐他汀组凋亡指数明显高于动脉粥样硬化组,说明阿托伐他汀在动脉粥样硬化早中期可以诱导 VSMC 凋亡增加,从而抑制动脉粥样硬化向纤维斑块发展而起到抗动脉粥样硬化的作用。

有报道诱导 VSMC 凋亡的机制涉及到 BKCa 离子通道和 Ras/ERK 信号通路。BKCa 激活、开放可诱导各种 VSMC 凋亡增加<sup>[9-11]</sup>。Ras/MAPK/ERK 通路是多种细胞生长、增殖、老化以及凋亡所必需的信号转导机制之一<sup>[12]</sup>。研究报道,5-羟色胺通过上调 p-ERK1/2 抑制肺动脉平滑肌细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究中,原位杂交法检测可见阿托伐他汀组 KCNMB1 mRNA 的表达明显增加,同时,阿托伐他汀干预后 p-ERK1/2 的表达明显低于动脉粥样硬化组,阿托伐他汀组凋亡指数明显高于动脉粥样硬化组。因此,推测阿托伐他汀可能通过上调 KCNMB1 mRNA 的表达抑制 Ras/MAPK/ERK 通路诱导 VSMC 凋亡增加,调节增殖与凋亡平衡。

阿托伐他汀通过上调 BKCa 的 KCNMB1 mRNA 表达诱导 VSMC 凋亡,其进一步的机制是否是通过抑制 ERK 信号通路来实现呢?本课题组的前期研究发现,体外培养兔主动脉 VSMC,用低浓度 TEA 阻断 BKCa 通道后,p-ERK1/2 的表达并没有明显改变。在体外实验中,用 PD98059 (MEK 抑制剂)抑制 ERK1/2 的磷酸化,结果亦未能阻止有丝分裂剂刺激导致的 BKCa 表达下调<sup>[14-15]</sup>。由此推测,阿托伐他汀分别通过影响 BKCa 和 Ras/ERK 通路诱导动脉粥样硬化兔 VSMC 凋亡。但 BKCa 和 ERK 分别阻断后,其相互之间的变化以及对凋亡的影响还有待进一步研究,以便得到更直接的证据。

#### [参考文献]

- [1] Cordeiro B, Shinn C, Sellke FW, et al. Rottlerin-induced BKCa channel activation impairs specific contractile responses and promotes vasodilation [J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 99 (2): 626-634.
- [2] Hutchins EJ, Belrose JL, Szaro BG. Phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K at an extracellular signal-regulated kinase phosphorylation site promotes neurofilament-medium protein expression and axon outgrowth in *Xenopus* [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 607: 59-65.
- [3] 肖娟, 罗兴林. BKCa 对血管平滑肌细胞周期及增殖调控的影响 [J]. *西南军医*, 2012, 14(3): 445-447.
- [4] 杨佳音, 简蓉蓉, 许雅丽, 等. CD73 对动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞的作用 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2015, 42(3): 300-306.
- [5] Rinaldi B, Finicelli M, Donniacuo M, et al. G-CSF contributes at the healing of tunica media of arteriotomy-injured rat carotids by promoting differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(1): 215-223.

(下转第 504 页)

分数及心腔的大小,这些常常决定手术方式的选择。同时,TTE还能鉴别其他的致死性胸痛的疾病,如急性肺栓塞及急性心肌梗塞等。过去,TTE被认为诊断急性主动脉夹层作用有限<sup>[6]</sup>,然而这些资料都是基于过去相对陈旧的研究。随着超声心动图技术的发展(良好的二维分辨率及谐波成像),TTE诊断主动脉夹层有着高敏感性及特异性(分别是97%和100%)<sup>[7]</sup>。

TTE诊断主动脉夹层具有一定的缺点。对主动脉壁内血肿、高位升主动脉夹层及破裂口的定位显影不良。通过多切面的探查方法,可以显示大多数成年人的胸主动脉。TTE对声窗差的患者(肥胖、肺气肿、胸廓畸形、机械通气)诊断价值具有局限性。TTE对夹层累及主动脉弓降部及弓部的分支血管、胸降主动脉的显示常常受限。有研究对52例经手术证实的急性主动脉夹层患者的TTE图像进行回顾性研究发现,TTE对破裂口及弓部分支血管受累的数据显示仅仅为53.8%和57.9%<sup>[8]</sup>。

CTA是诊断主动脉夹层金标准<sup>[6,9]</sup>。但是CTA不够方便、迅速,尤其不能做床旁检查,常常导致延误治疗。CTA需要静脉注射造影剂,对病人是一个潜在的高风险。TTE具有快速、无创、安全、便携、无放射性、无血流动力学影响及不影响紧急心脏外科手术的准备。临床怀疑主动脉夹层时,TTE是首选的确诊本病的重要手段,尤其是急诊床旁超声心动图检查。

#### [参考文献]

- [1] Evangelista A, Avegliano G, Aguilar R, et al. Impact of contrast-enhanced echocardiography on the diagnostic algorithm of acute aortic dissection [J]. *European Heart J*, 2010, 31(4): 472-479.
- [2] 邹帅. 主动脉夹层相关蛋白及信号通路研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(5): 536-540.
- [3] Sobczyk D, Nycz K. Feasibility and accuracy of bedside transthoracic echocardiography in diagnosis of acute proximal aortic dissection [J]. *Cardiovascular Ultrasound*, 2014, 13(1): 189-189.
- [4] 孙文字, 毕研文. 主动脉夹层的临床表现及诊断 [J]. *山东医药*, 2009, 49(18): 111.
- [5] Harris C, Croce B, Cao C. Type A aortic dissection [J]. *Ann Cardiothorac Surg*, 2016, 5(3): 256.
- [6] Pepi M, Breithardt OGE. Echocardiography in aortic diseases: EAE recommendations for clinical practice. [J]. *Europ Heart J Cardiovascul Imag*, 2010, 11(8): 645-658.
- [7] Ceconi M, Chirillo F, Costantini C, et al. The role of transthoracic echocardiography in the diagnosis and management of acute type a aortic syndrome [J]. *American Heart J*, 2012, 163(1): 112-118.
- [8] 韩建成, 李治安, 何怡华, 等. 床旁经胸超声心动图在急性主动脉夹层 Stanford 细化分型中的应用价值 [J]. *心肺血管病杂志*, 2011, 30(2): 122-125.
- [9] Ranasinghe AM, Strong D, Boland B, et al. Easily missed acute aortic dissection [J]. *BMJ*, 2011, 343(7818): 317-319.

(此文编辑 朱雯霞)

(上接第466页)

- [6] 肖国梁, 陈小东. 血管平滑肌表型转化及其影响、调控因素的研究现状 [J]. *广东医学院学报*, 2010, 28(3): 317-319.
- [7] Doyon M, Hale TM, Huot-Marchand JE, et al. Does atorvastatin induce aortic smooth muscle cell apoptosis in vivo [J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 54(1-2): 5-12.
- [8] Suski M, Gebska A, Olszanecki R, et al. Influence of atorvastatin on angiotensin I metabolism in resting and TNF- $\alpha$ -activated rat vascular smooth muscle cells [J]. *JRAAS*, 2014, 15(4): 378-383.
- [9] Xie MJ, Ma YG, Gao F, et al. Activation of BKCa channel is associated with increased apoptosis of cerebrovascular smooth muscle cells in simulated microgravity rats [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(6): C1489-500.
- [10] Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging [J]. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(3): 192-222.
- [11] 崔海鹏, 董建一, 李慧玲, 等. Ras/MAPK/ERK 通过协同 NF-

- $\kappa$ B 促进肝癌细胞中 Cyclin D1 的表达 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(6): 1-6.
- [12] Liu Y, Tian HY, Yan XL, et al. Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by pERK1/2 and PDK through 5-HT1B receptors and 5-HT transporters [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22(6): 451-457.
- [13] 李明星, 王勇, 蒋德旗, 等. 参与肺动脉平滑肌细胞增殖信号转导机制及信号转导抑制剂的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 605-610.
- [14] Hong E, Lee E, Kim J, et al. Elevated pressure enhanced trail-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via ERK1/2-inactivation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2015, 20(4): 535-548.
- [15] Massa A, Casagrande S, Bajetto A, et al. SDF-1 controls pituitary cell proliferation through the activation of ERK1/2 and the Ca<sup>2+</sup>-dependent, cytosolic tyrosine kinase Pyk2 [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1090(12): 385-398.

(此文编辑 文玉珊)