

· 基础研究 ·

阿托伐他汀对氧化低密度脂蛋白信号转导途径的影响

吴兴利 杨丁友 杨中苏 赵玉生

【摘要】 目的 探讨氧化低密度脂蛋白(oxLDL)促血管平滑肌细胞增殖的信号转导机制及 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 抑制剂阿托伐他汀(atorvastatin)的干预作用。方法 采用培养兔血管平滑肌细胞方法,以细胞计数、噻唑蓝比色法测定细胞增殖能力,Western 印迹法定量蛋白激酶 B(PKB)表达水平,特异底物组蛋白 H₂B 中 $\gamma^{32}\text{P}$ 掺入量测定 PKB 活性。以磷脂酰肌醇-3 激酶(PI₃K)特异抑制剂渥曼青霉素(WT)预处理细胞,间接反映 PI₃K 活性。结果 oxLDL(50 mg/L)使细胞增殖指标增至 1.8~3.2 倍,oxLDL 可浓度(5~50 mg/L)、时间(3 min~24 h)依赖地增加 PKB 活性。WT 及阿托伐他汀均可显著抑制 VSMC 增殖及 PKB 活性,并完全逆转 oxLDL 的上述作用,阿托伐他汀对 VSMC 增殖的抑制作用可被胆固醇前体甲羟戊酸(MVA)阻止。同等浓度的 LDL 对细胞增殖及 PKB 活性无明显影响。oxLDL、低密度脂蛋白(LDL)、WT 及阿托伐他汀对 PKB 蛋白表达均无显著影响。结论 oxLDL 可能通过对 PI₃K/PKB 的活化发挥促 VSMC 增殖作用,阿托伐他汀至少部分通过抑制 PKB 信号通路而显著抑制 VSMC 增殖,并且此作用与减少 MVA 的产生有关。

【关键词】 氧化低密度脂蛋白;血管平滑肌细胞;蛋白激酶 B;阿托伐他汀

Effect of atorvastatin on the signal transduction pathway of oxidized low density lipoprotein

WU Xingli, YANG Dingyou, YANG Zhongsu, ZHAO Yusheng

Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the cellular signal transduction pathway of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation stimulated by oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and the intervention effect of atorvastatin. **Methods** Rabbit aortic VSMCs were cultured in 8 groups. Cell proliferating ability was determined by measuring cell number and mitochondrial dehydrogenase (MD) activity (MTT assay). Western blotting was used to detect the protein expression of protein kinase B (PKB), and immunoprecipitation and radioactivity of $\gamma^{32}\text{P}$ incorporated into its specific substrate histon H₂B were used to determine the PKB activity. **Results** oxLDL increased cell number and MD activity to 1.8-3.2 fold. PKB activity was elevated by oxLDL concentration-(5-50 mg/L) and time-(3 min-24 h) dependently, while LDL had no such effect as oxLDL did. Wortmannin (WT) and atorvastatin markedly inhibited VSMC proliferation and PKB activity, and reversed all the above effects of oxLDL. Atorvastatin decreased VSMC proliferation, which was impeded completely by cholesterol precursor mevalonate (MVA). OxLDL, LDL, WT and atorvastatin had no significant effect on the PKB protein expression. **Conclusions** It is suggested that PI₃K/PKB signal transduction system be one of the crucial signal pathway involved in rabbit VSMC proliferation stimulated with or without oxLDL, and atorvastatin inhibit VSMC proliferation partly by decreasing the synthesis of MVA and inhibiting PKB activity.

【Key words】 oxidized low density lipoprotein; vascular smooth muscle cell protein kinase B; atorvastatin

氧化低密度脂蛋白(oxLDL)是一强烈的促血管平滑肌细胞增殖剂,其在动脉粥样硬化(AS)形成及发展中的作用已被实验证实,但细胞内信号转导

机制尚未充分阐明^[1]。AS 病理生理学研究的进展,血管平滑肌细胞(VSMC)成为新的药物治疗靶标。他汀类降脂药为一类 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 抑制剂,大规模多中心随机对照临床试验证实可用于冠心病一、二级预防,并认为其非降脂作用可能具有更重要的意义^[2]。磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(PI₃K/PKB)是近年发现的独立信号转导系统,参

作者单位:100853 北京,解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:吴兴利,男,医学博士,副主任医师

通信作者:吴兴利,电话:010-66936762, E-mail: wxl301@ya-

hoo.com

与多种生长因子的生物学效应^[3]。阿托伐他汀为最有效的他汀类制剂,有关其非降脂作用的机制尤其是对 PI_3K/PKB 信号系统的影响仍未见报道。该实验通过观察 oxLDL 对 VSMC 增殖及 PKB 激酶活性与蛋白表达的影响,以及阿托伐他汀的干预作用,以较全面了解 oxLDL 病理生理机制及阿托伐他汀的分子药理学,为 AS 的防治提供新的可能途径及理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 5 周龄日本大耳白兔由解放军总医院动物实验室提供,DMEM 培养液(Gibco 公司),加强型小牛血清(Hyclone 公司),阿托伐他汀(辉瑞制药有限公司),甲羟戊酸(mevalonate, MVA),鼠抗兔 PKB 多克隆抗体(Sant Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 单克隆抗体(武汉博士德公司)。蛋白 A-琼脂糖(Amersham 公司), $\gamma^{32}P$ -ATP(北京亚辉公司),组蛋白 H_2B (histon H_2B , BM 公司)。

1.2 低密度脂蛋白提取及氧化^[4] 采用垂直转头单个不连续密度超速离心法提取健康人血清低密度脂蛋白,以铜离子氧化法制备 oxLDL。TBARS 比色法及 1% 琼脂糖凝胶电泳证实 LDL 已经充分氧化,符合实验要求。

1.3 细胞培养 采用贴块法培养兔主动脉平滑肌细胞。实验用第 5~6 代细胞。细胞鉴定采用形态学和免疫组化方法。

1.4 平滑肌细胞培养计数 取生长状态良好的第 5~6 代 VSMC 制成细胞悬液($4 \times 10^7/L$),接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 0.5 mL,孵育 24 h,换无血清培养液继续培养 24 h 后,加 10% 胎牛血清,同时分组加入阿托伐他汀($1 \mu mol/L$)、LDL(50 mg/L)、oxLDL(50 mg/L)、WT(100 $\mu mol/L$)、WT(100 $\mu mol/L$) + oxLDL(50 mg/L)、阿托伐他汀($1 \mu mol/L$) + oxLDL(50 mg/L)及胆固醇前体 MVA(250 $\mu mol/L$) + 阿托伐他汀($1 \mu mol/L$),以不加药物的只含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液为对照孔,每次均重复 2 孔,实验重复 3 次。培养 3 d 后以 0.125% 的胰酶消化分离细胞,用 4% 台盼蓝染色计数。

1.5 四唑蓝(MTT)比色试验 通过测定线粒体脱氢酶的活性反映细胞活力。同上细胞培养 3 d 后,每孔加入 MTT 溶液继续孵育 4 h,然后加入 DM-SO,在酶联免疫检测仪测定各孔吸光度(A)。

1.6 免疫印迹分析 按参考文献^[5]及单抗产品实

验方案进行。VSMC 培养至各指定时间后,加入裂解液裂解[50 mmol/L Tris (pH7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton-X-100, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 1 mmol/L PMSF, 50 mmol/L NaF, 0.1% β -巯基乙醇(β MG), 1 mmol/L 钒酸钠],上样后用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,按常规方法电转膜,一抗为鼠抗兔 PKB 多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 单克隆抗体。最后显色,扫描滤膜,蛋白带染色密度用 Scion Image 软件分析。

1.7 免疫沉淀^[5] 取同上裂解物上清液,加蛋白质 A-琼脂糖(protein A-sepharose)15 μ L,以预清除裂解液,继以 12 000 r/min, 4 $^{\circ}C$ 离心 5 min。上清液与 PKB 抗体 2 μ g, 4 $^{\circ}C$ 孵育 2 h,然后与 40 μ L 蛋白质 A-琼脂糖 4 $^{\circ}C$ 免疫沉淀 1 h。免疫复合物用缓冲液 A(含 500 mmol/L NaCl)洗 3 遍,缓冲液 B(含 50 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 0.03% Brij35, 0.1 mmol/L EGTA, 0.1% β MG)洗 2 遍,检测稀释液(20 mmol/L MOPS, pH 7.2, 25 mmol/L β -甘油磷酸钠, 1 mmol/L 原钒酸钠, 1 mmol/L DTT)洗 2 遍。继以 4 $^{\circ}C$ 12 000 r/min 离心 20s,收集蛋白 A-抗原-抗体复合物,缓慢吸出上清液。

1.8 PKB 激酶活性测定^[6] 将上述免疫复合物以激酶反应混合液(检测稀释液中含 25 mmol/L $MgCl_2$, 170 mmol/L ATP, 1 μ g 组蛋白 H_2B , 1 μ Ci $\gamma^{32}P$ -ATP 重悬,并在 25 $^{\circ}C$ 孵育 10 min。上清液与 40% 的三氯醋酸混合,点膜,最后置闪烁瓶中加闪烁液,由 Beckman LS9800 型液闪分析仪测各样本每分钟放射脉冲数(cpm)。

1.9 统计学处理 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,应用 STATA 软件 6.0 处理。方差齐性及数据分布情况采用 Bartlett 方法检验。方差不齐或非正态分布资料进行对数转换后行 Scheffe 方差分析。 $P < 0.05$ 为统计学有意义, $P < 0.01$ 为具有显著意义。

2 结果

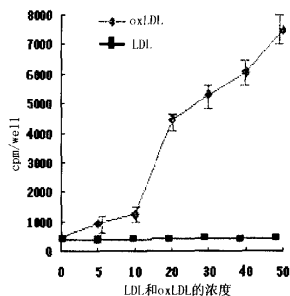
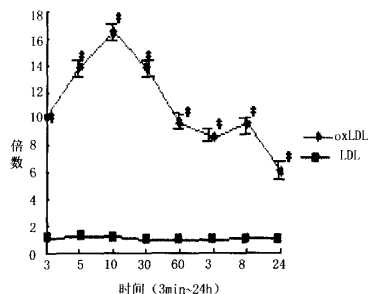
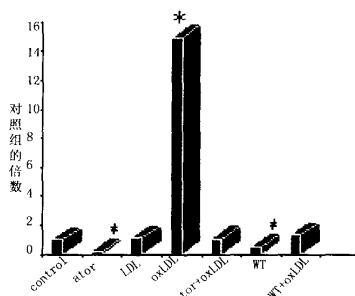
2.1 阿托伐他汀对 oxLDL 促 VSMC 增殖的抑制作用 oxLDL(50 mg/L)使 VSMC 计数和 A 值增至对照组的 1.78~3.2 倍(均 $P < 0.01$),同样浓度的 LDL 对 VSMC 增殖无显著影响。WT 及阿托伐他汀使该两指标降至对照组的 68% 以下(均 $P < 0.01$),并完全逆转 oxLDL 的作用。同时加入 MVA 可阻止阿托伐他汀的作用(表 1)。

表 1 阿托伐他汀对 oxLDL 促 VSMC 增殖作用的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

增殖参数	对 照	LDL (50 mg/L)	oxLDL (50 mg/L)	WT (100 μ mol/L)	WT+oxLDL (1 μ mol/L)	阿托伐他汀 + oxLDL	阿托伐他汀 + MVA	阿托伐他汀
细胞计数 ($\times 10^3$)	21.21 $\pm$ 2.67	22.22 $\pm$ 2.86	37.52 $\pm$ 5.11 $^{\Delta*}$	14.53 $\pm$ 1.93 $^{\Delta}$	22.34 $\pm$ 2.50	14.90 $\pm$ 0.47 $^{\Delta}$	19.67 $\pm$ 1.02	20.82 $\pm$ 2.4
MTT (A 值)	0.24 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.14 $^{\Delta*}$	0.15 $\pm$ 0.04 $^{\Delta}$	0.23 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.02 $^{\Delta}$	0.21 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03

 $^{\Delta} P < 0.01$, 与对照组比较; $^* P < 0.01$, 与其他各组比较

2.2 氧化低密度脂蛋白对 VSMC 蛋白激酶 B 蛋白表达与活性的影响 VSMC 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养至融和后, 换无血清培养液继续培养 24 h, 继以不同浓度的 oxLDL 和 LDL (5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L) 处理 10 min, oxLDL 或 LDL (50 mg/L) 处理不同时间 (3 min~24 h), WT (100 μ mol/L) 处理 30 min, WT (100 μ mol/L) 预处理 20 min 后加入 oxLDL (50 mg/L) 刺激 10 min, 阿托伐他汀 (1 μ mol/L) 孵育 24 h 后加或不加 oxLDL (50 mg/L) 处理 10 min。以只加贫血清的 DMEM 培养液为对照, 每次均重复 3 瓶, 实验重复 2 次。结果表明, oxLDL 可浓度、时间依赖性地增加 PKB 活性, 阿托伐他汀和 WT 均可抑制 PKB 活性, 并完全逆转 oxLDL (50 mg/L) 增加的 PKB 活性 (图 1~3)。

图 1 不同浓度氧化低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞蛋白激酶 B 活性的影响 $^* P < 0.01$; 组间比较图 2 氧化低密度脂蛋白影响血管平滑肌细胞蛋白激酶 B 活性的时程效应 $^{\#} P < 0.01$, 两组间比较图 3 阿托伐他汀对氧化低密度脂蛋白促血管平滑肌细胞蛋白激酶 B 活性的影响 $^{\#} P < 0.01$, 与对照组比较; $^* P < 0.01$ 与其他各组比较

3 讨论

氧化低密度脂蛋白作为强烈的致 AS 物质, 具有很强的刺激血管平滑肌细胞增殖及合成分泌效应^[7]。研究证实, oxLDL 的促巨噬细胞、VSMC 生长作用是由丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK)、蛋白激酶 C (PKC) 等信号途径介导的^[8]。Martens 等^[6]报道 oxLDL 的促单核细胞增殖作用是 PI3K 依赖性的。尽管特异的受体及信号途径尚未确定, 但普遍认为 oxLDL 由于其能干预细胞内信号而表现出广泛生物学效应。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶, 其产物包括 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₂) 和 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₃), PIP₃ 可活化 PKB。PKB 可磷酸化糖原合成酶激酶 3 (GSK3)、核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K) 及 p70S6K 相关激酶 (SRK), 催化起始翻译因子抑制剂、起始翻译因子结合蛋白 1 (4E-Bp1) 的磷酸化, 从而启动蛋白质合成与细胞分化^[5,6,9]。

本实验显示 oxLDL 可显著增加 PKB 活性, 同等浓度的 LDL 处理后, 未见 PKB 活性改变, 此与 Kusuhashi 等^[8]有关 MAPK 活性的报道不一致。他们发现 LDL、oxLDL 均可 PKC 依赖性地刺激 VSMC、内皮细胞、巨噬细胞的 MAPK 活性, 提示 PKB 途径不同于 MAPK 途径, 可能介导 oxLDL 的作用的相对较特异的信号通路。本实验同时观察

到, PI_3K 特异性抑制剂可完全逆转 oxLDL 的促 VSMC 增殖及活化 PKB 激酶作用, 说明 oxLDL 的上述作用是由 PI_3K 介导的。

他汀类药物被一系列大规模多中心随机对照临床试验证实具有理想的冠心病一、二级预防效果, 对其非调脂作用研究表明, 该类物质可抑制 VSMC 增殖、迁移, 诱导 VSMC 凋亡^[3], 并发现与抑制 HMG-CoA 还原酶, 减少异戊二烯化类生成有关, 但细胞内信号转导机制不明。最近 Martinez-Gonzalez 等^[10]发现洛伐他汀可抑制胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 等的促人 VSMC DNA 合成及 IGF-1 的上调 cfos mRNA 表达作用, 但并不抑制 PKC 活化剂 PMA 诱导的 cfos mRNA 表达, 提示洛伐他汀可能通过抑制其他信号通路最终影响 VSMC 增殖。本实验显示, 阿托伐他汀可抑制 VSMC 增殖, 并且此作用被 MVA 完全逆转, 提示阿托伐他汀对 VSMC 增殖的抑制与减少 MVA 产生有关。PKB 蛋白表达水平未见明显改变, 但可显著抑制 PKB 活性, 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时使 PKB 活性降低至对照组的 20%。提示阿托伐他汀可能通过对 PKB 活性而非蛋白表达的调节对 VSMC 发挥迅速、全面的调控作用。

总之, PI_3K /PKB 信号通路是 oxLDL 病理生理作用的重要细胞内机理之一, 阿托伐他汀可能通过调节该转导系统而抑制 VSMC 的生物学功能, 此为 oxLDL 病理生理机理研究及阿托伐他汀用于 AS 等以 VSMC 增生为主要病理改变疾病的治疗提供了新的思路与理论基础。

参考文献

- 1 Clair R W St. Pathogenesis of atherosclerosis. *Cardiol Rev*, 1997, 5:14-24
- 2 Burgering BM, Coffey PT. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction. *Nature*, 1995, 376:599-602.
- 3 吴兴利, 王士雯. 他汀类药物的非降脂作用. *中华老年医学杂志*, 2001, 20:154-156
- 4 Chuang BH. Preparation and quantification isolation of plasma lipoproteins: rapid single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res*, 1980, 21:284-289.
- 5 Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-1- and prosap-tide-induced survival in Schwann cells. *J Neurosci Res*, 1999, 57:332-344.
- 6 Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velazquez P, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1998, 273(9):4915-4920.
- 7 Herry JM, Kozak M, Stafforini DM, et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1995, 96:2322-2330
- 8 Kusunihara M, Chait A, Cader A, et al. Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(1): 141-148
- 9 Downward J. Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science*, 1998, 279(5351):673-674.
- 10 Martinez-Gonzalez J, Vinals M, Vidal F, et al. Mevalonate deprivation impairs IGF-1/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1997, 135:213-223.

(收稿日期:2003-04-28)

(本文编辑 缪其宏)

· 消 息 ·

《糖尿病足国际临床指南》出版

本书由糖尿病足国际工作组撰写, 国际糖尿病足工作组成员、中华医学会糖尿病学分会足病组组长许樟荣教授等翻译, 中华医学会糖尿病学分会主任委员钱荣立教授审校。全书分为 3 部分: 糖尿病对社会经济的影响以及采取有效的干预策略来降低这些影响的可行性, 适合于卫生政策制定者阅读; 糖尿病足预防和处理国际共识, 列出了糖尿病足病变的一系列重要概念和定义, 总结了现有的预防和处理策略, 适合于糖尿病足专家阅读; 糖尿病足预防和处理的具体临床实践指南, 适合于医务人员和所有糖尿病患者及其亲属在日常生活中阅读和应用。邮购地址: 100842 北京复兴路 22 号甲 3, 人民军医出版社图书部 秦素利收, 电话: 010-51927286, 定价: 30 元。