

• 基础研究 •

辛伐他汀对大鼠肺成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及意义

奚吉成 吴清玉 陈连凤

【摘要】 目的 探讨辛伐他汀(SIM)对肺成纤维细胞(LF)的增殖、胶原合成及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)分泌的影响。方法 用消化法培养新生SD大鼠的LF,给予不同浓度的SIM干预。四氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖,细胞免疫组化法测定细胞胶原的合成,ELISA法测定细胞培养上清液MMP-2的含量。结果 随着SIM浓度(5,10,50 μ mol/L)的增高,MTT比色法 A_{490} 值、LF表达I、III型胶原的平均光密度值(A)及培养上清液中的MMP-2含量均呈递减的趋势,与对照组相比,差异均非常显著(均 $P<0.01$)。加入200 μ mol/L甲羟戊酸可明显拮抗此作用($P<0.01$)。均具有统计学意义。结论 降脂药物SIM具有抑制基本的成纤维细胞生长因子促LF增殖和胶原合成的作用,并可减少MMP-2的分泌,抑制LF黏附迁移功能,可能对防止肺移植术后闭塞性细支气管炎有一定的潜在临床应用价值。

【关键词】 辛伐他汀;成纤维细胞;肺

Effects of simvastatin on the proliferation and collagen synthesis of rat lung fibroblasts

XI Jicheng*, WU Qingyu, CHEN Lianfeng

* Heart Center, Frist Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of simvastatin on the proliferation, collagen synthesis and matrix metalloproteinase (MMP-2) excretion of rat lung fibroblasts (LFs). Methods Lung fibroblasts of Sprague-Dawley (SD) rats were isolated and cultured. Lung fibroblast proliferation was measured by thiazolyl blue (MTT) assay. Collagen synthesis was examined immunocytochemically. Matrix metalloproteinase (MMP-2) protein in the conditioned media was determined by ELISA. Results In the 5,10 and 50 μ mol/L simvastatin groups, the A_{490} value of MTT colorimetry, A value of collagen in LFs and MMP-2 protein in the conditioned media were significantly lower than those in the control group (all $P<0.01$). This effect could be blocked by the addition of mevalonate (200 μ mol/L). Conclusion Simvastatin inhibits effectively the proliferation of cultured rat LFs, the collagen synthesis and MMP-2 excretion. Further study of statins as the potential therapeutic medicines for obliterative bronchiolitis is necessary.

【Key words】 simvastatin; fibroblasts; lung

闭塞性细支气管炎是肺移植病人术后的主要并发症,严重影响肺移植病人术后的生活质量和生存率^[1]。闭塞性细支气管炎病理上表现为炎症反应引起的细小支气管结构破坏和纤维化^[2]。近年来研究

表明,他汀类药物可以通过阻断甲羟戊酸(mevalonate,MEV)的合成,抑制某些膜上的偶联蛋白的翻译后修饰,从而阻断某些细胞内信号传导通路,抑制多种细胞的增殖^[3]。本实验以基本的成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)处理培养的大鼠肺成纤维细胞(lung fibroblast, LF),促使LF增殖及细胞中胶原的合成分泌。同时加以辛伐他汀(simvastatin, SIM)干预,体外观察SIM对LF增殖及细胞内胶原合成分泌的影响,以此来探讨肺移植病人术后闭塞性细支气管炎的临床治疗新方法。

收稿日期:2006-02-01

作者单位:100016 北京市,清华大学第一附属医院心脏中心(奚吉成、吴清玉);100730 北京市,中国协和医科大学北京协和医院内科实验室(陈连凤)

作者简介:奚吉成,男,1974年4月生,江苏省东台市人,医学博士,住院医师

通讯作者:吴清玉, E-mail: wuqingyu@mail. tsinghua. edu. cn

1 材料与方法

1.1 动物 出生3d的SD大鼠,雄性,体重50g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药品和试剂 SIM为京新药业股份有限公司惠赠;达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(dulbecco modified eagle' medium, DMEM)为美国Gibco公司产品;胰蛋白酶、bFGF、四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)、甲羟酸内酯(mevalonolactone, MEV)为美国Sigma公司产品;胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购于杭州四季青生物工程材料研究所;波形蛋白单克隆抗体、角蛋白单克隆抗体、I、III型胶原多克隆抗体、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)多克隆抗体为武汉博士德公司产品;SP试剂盒为福州迈新公司产品。

1.3 溶液配制 (1) SIM 41.86mg溶于2ml纯乙醇,加入1.8ml 0.1mol/L NaOH, 80℃加热4h,用0.1mol/L HCl调pH值约为7.2,加蒸馏水定容至10ml,过滤除菌后制成SIM储备液(10mmol/L), 4℃冰箱保存备用^[4]。(2) MEV 32.5mg溶于2ml纯乙醇,加入蒸馏水定容至25ml,过滤除菌后,制成MEV储备液(10mmol/L), -20℃保存备用。

1.4 细胞培养^[5] 取出生3d的SD大鼠肺组织,无菌条件下用无菌眼科手术剪尽量剪碎,放试管中加入0.25%胰酶适量,放入37℃水浴箱中消化处理20min。吸取上清于另一试管中1000r/min离心10min,弃上清。沉淀用含20%FCS的DMEM培养液吹打散,置于细胞培养瓶中放入37℃,含5%CO₂的二氧化碳培养箱中继续培养。细胞长满后传代,用酶消化法纯化此细胞,实验用细胞为传代第3~4代细胞。

1.5 细胞鉴定 实验用细胞应用相差倒置显微镜进行LF的形态学初步鉴定,并用波形蛋白单克隆抗体及角蛋白单克隆抗体免疫组化染色进行鉴定,方法同下文细胞免疫组化染色。免疫组化波形蛋白染色阳性和角蛋白染色阴性鉴定为所需的LF,细胞纯度达98%以上。

1.6 MTT比色法检测细胞增殖^[6] 取对数生长期LF接种在96孔板中, 5×10^3 /孔, 37℃、5%CO₂及饱和湿度下培养, 24h后换含1%血清DMEM培养液使细胞同步化, 37℃继续孵育48h,使细胞进入生长静止期。弃上清,分别加入20%FCS、5μg/L bFGF、不同浓度的SIM及MEV,继续培养48h,各实验组于药物刺激结束前4h,每孔加入MTT

(5g/L) 20μl, 37℃继续培养4h后终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加入150μl DMSO,振荡10min使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上490nm波长处测定吸光度值(A₄₉₀值)。

1.7 细胞免疫组化 将LF按 1×10^8 /L密度接种到放置有几张0.8cm×0.8cm玻璃盖玻片的六孔板中,用含20%FCS的DMEM培养液,待细胞至亚融合状态,换为含1%FCS的DMEM培养液培养48h,然后换为含各种处理因素的培养液培养48h。取出长有LF的培养玻片, 0.01mol/L磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)清洗3次,然后无水乙醇固定15~20min。用SP法按试剂盒说明进行各组LF培养玻片的免疫细胞化学方法进行染色鉴定。由CCD摄像机获取数字显微图像,并用Image Pro专业图像分析软件进行光密度测定。随机检测I、III型胶原在各组20个LF中的平均A值。

1.8 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞培养上清液MMP-2蛋白含量^[7] 将待测上清加入96孔酶标板中,每孔100μl, 4℃过夜。PBS冲洗板孔3次,每孔加入2%脱脂奶粉100μl封闭, 37℃, 1h。清洗后每孔加1:100稀释的MMP-2抗体100μl, 37℃温育2h。清洗后每孔加生物素标记的二抗15μl, 37℃温育15min。清洗后每孔加入邻苯二胺(ortho-phenylene diamine, OPD)100μl室温下显色5~10min,每孔加入100μl 0.2mol/L H₂SO₄以终止反应。在酶标仪上测定A₄₉₀值。

1.9 统计学分析 数据用SPSS 11.0软件进行处理。各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间差异比较采用成组t检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对bFGF促LF增殖作用的影响 在培养液中加入5μg/L的bFGF作用于LF, 24h起的细胞计数值与无bFGF组比较即有显著差异,表明bFGF可以促进LF的增殖。加入SIM 24h,显微镜下观察, SIM使LF胞浆内颗粒增加,细胞皱缩变形、变细长,此变化随SIM浓度增加而越明显,呈现出明显的浓度依赖性。MTT比色法结果表明, SIM能显著抑制bFGF促LF增殖的作用,随着SIM浓度的增高, MTT比色法A₄₉₀值呈递减的趋势(表1), 5, 10, 50μmol/L三个浓度组与对照组相比,差异均非常显著(均 $P < 0.01$)。加入200μmol/L MEV可明显拮抗此作用($P < 0.01$),且具有统计学意义。

表 1 辛伐他汀对 LF 增殖、胶原合成及 MMP-2 分泌的影响

浓度($\mu\text{mol/L}$)	四氮唑蓝(A_{490})	I 型胶原(A)	III 型胶原(A)	基金金属蛋白酶-2(A_{490})
SIM 0	0.561 $\pm$ 0.013	0.361 $\pm$ 0.012	0.289 $\pm$ 0.012	0.140 $\pm$ 0.013
SIM 1	0.544 $\pm$ 0.020	0.352 $\pm$ 0.009	0.277 $\pm$ 0.013	0.127 $\pm$ 0.010
SIM 5	0.520 $\pm$ 0.010*	0.334 $\pm$ 0.011 $^{\Delta}$	0.260 $\pm$ 0.012 $^{\Delta}$	0.111 $\pm$ 0.011 $^{\Delta}$
SIM 10	0.508 $\pm$ 0.011*	0.324 $\pm$ 0.014*	0.232 $\pm$ 0.015*	0.083 $\pm$ 0.015*
SIM 50	0.445 $\pm$ 0.017*	0.305 $\pm$ 0.015*	0.216 $\pm$ 0.015*	0.068 $\pm$ 0.012*
SIM50+MEV200	0.567 $\pm$ 0.015*	0.354 $\pm$ 0.014*	0.283 $\pm$ 0.012*	0.138 $\pm$ 0.011*

注:与 SIM 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,* $P<0.01$,与 SIM 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\Delta}P<0.05$,与 SIM 50 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,* $P<0.01$

2.2 辛伐他汀对 bFGF 促 LF 胶原合成的影响

IM 能明显抑制 bFGF 促 LF 细胞内的胶原分泌合成作用。细胞免疫组化染色见各组 LF I、III 型胶原染色均呈阳性。阳性信号呈红色细密颗粒,位于胞浆。各组 LF 表达 I、III 型胶原的 A 值见表 1。5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度组与对照组相比,LF 中 I、III 型胶原表达显著减少($P<0.01$)。加入 200 $\mu\text{mol/L}$ MEV 可明显拮抗此作用($P<0.01$),且具有统计学意义。

2.3 辛伐他汀对 bFGF 促 LF 分泌 MMP-2 的影响

各组细胞培养上清液中的 MMP-2 蛋白含量经 ELISA 检测。与对照组相比,5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$ 三个浓度组上清液中的 MMP-2 含量显著减少($P<0.01$),表明 SIM 可以抑制 LF 合成和分泌 MMP-2。加入 200 $\mu\text{mol/L}$ MEV 可明显拮抗此作用($P<0.01$),且具有统计学意义。

3 讨论

随着外科技术的提高和免疫抑制剂的应用,肺移植已成为治疗终末期肺疾病的有效治疗手段。但术后闭塞性细支气管炎严重影响肺移植病人的生活质量和生存率,是肺移植病人主要晚期死因。闭塞性细支气管炎在病理上表现为淋巴细胞浸润支气管结构、支气管上皮细胞破坏、LF 增生和合成分泌胶原基质,最终导致细支气管部分或完全闭塞。长期以来,临床对其缺少有效的治疗方法。慢性免疫排斥反应是肺移植术后闭塞性细支气管炎的启动因素。在形成闭塞性细支气管炎的过程中,有许多间质生长因子的 mRNA 表达升高(血小板衍生生长因子-1、胰岛素样生长因子-1、内皮素-1、转化生长因子- β),这些间质生长因子均可参与间质细胞的增生和细胞外基质的重建^[8]。其来源有可能是在慢性免疫炎症过程中募集和集合来的单核巨嗜细胞及成纤维细胞。

他汀类药物是羟甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶抑制剂类的降脂药,最近的研究

发现他汀类药物可以抑制 MEV 的合成,其代谢产物是 G 蛋白与细胞膜结合所必需的构成成分^[9]。生长因子与其受体结合后可以激活 P^{21} Ras,向核内传递信号活化转录因子,使相应基因转录,促使细胞增殖和分化^[10]。他汀类药物抑制 MEV 的形成而影响其下游产物类异戊二烯的产生,抑制 Ras 蛋白的异戊二酰化,使其不能定位在细胞膜上,影响其活化,可有效抑制 P^{21} Ras 介导的有丝分裂信号传导^[3]。

本研究结果显示,SIM 在体外细胞生物学实验过程中可影响 LF 相关功能。SIM 可以明显抑制 bFGF 诱导的 LF 的生长和增殖,同时明显降低其细胞内胶原的合成,降低其对细胞外基质重建的能力。加入 MEV 能对其有拮抗作用,提示 SIM 可通过改变 MEV 通路来影响 LF 的增殖及相关功能。实验中作者还发现 SIM 可下调 LF MMP-2 的合成分泌,此作用同样能被 MEV 所拮抗。通常认为 MMP-2 参与 IV 型胶原的降解及细胞的迁移^[11]。MMP-2 的合成分泌减少,会抑制 LF 粘附、迁移生长。本实验揭示了一些新的通路参与其过程,这些通路可以作为有效治疗干预的靶点以阻断肺移植术后闭塞性细支气管炎过程中纤维化进程。LF 在肺移植术后闭塞性细支气管炎的病理进程作用越来越被人们重视。LF 数量急剧上升,大量合成胶原等细胞外基质,并参与间质胶原重建,提示在最终疤痕纤维化过程中它们均参与并起到重要作用^[12]。有效调节控制 LF 的作用,对防止闭塞性细支气管炎及减慢其病程有潜在的临床及生物学意义。SIM 是临床治疗高脂血症常用的降脂药,安全性高,可通过影响 MEV 通路而具有抗细胞增殖作用。SIM 能否防止肺移植术后闭塞性细支气管炎并减慢其病程,将有待于进一步的动物体内实验加以证实。

参考文献

- [1] Valentine VG, Robbins RC, Berry GJ, et al. Actuarial survival of heart-lung and bilateral sequential lung

- transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *J Heart Lung Transplant*, 1996, 15: 371-383.
- [2] Neuringer IP, Mannon RB, Coffman TM, et al. Immune cells in a mouse airway model of obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19: 379-386.
- [3] Johnson MD, Woodard A, Okediji EJ, et al. Lovastatin is a potent inhibitor of meningioma cell proliferation; evidence for inhibition of a mitogen associated protein kinase. *J Neurooncol*, 2002, 56: 133-142.
- [4] Jakobisiak M, Bruno S, Skierski JS, et al. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3628-3632.
- [5] 刘建中, 李晓原, 李燕, 等. 氦氖激光对大鼠肺成纤维细胞的细胞骨架的影响. *中国医学物理学杂志*, 2001, 18: 91-92.
- [6] 章静波, 张世馥, 黄东阳. 组织和细胞培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 111-112.
- [7] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 116-122.
- [8] Aris RM, Walsh S, Chalermkulrat W. Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002; 166: 417-422.
- [9] Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97: 105-116.
- [10] Vojtek AB, Der CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*, 1998, 273: 19925-19928.
- [11] Kelynack KJ, Hewitson TD, Martic M, et al. Lovastatin downregulates renal myofibroblast function *in vitro*. *Nephron*, 2002, 91: 701-707.
- [12] Alho HS, Inkien KA, Salminen US, et al. Collagens I and III in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 1519-1525.

(上接第 134 页)

效果差, 容易发生室颤, 阿斯综合征发生率高, 患者预后较差的临床特点^[2], 应引起重视。作者认为以上情况的发生与 DM 患者心脏受累血管多、冠脉病变程度重、缺血时间长等因素有关, 这种心律失常是患者预后不良的主要因素之一。

本研究结果提示, 与老年 NDM 患者相比, 老年 DM 合并 CAD 患者的冠脉三支病变比例较高; Holter 监测到这类患者的 24h 心肌缺血发作次数、缺血程度、缺血持续的时间以及严重心律失常的发作次数也明显高于 NDM 患者, 但临床上多缺乏典型的心绞痛症状, 不易引起人们的重视; 随访期内心脏事件的发生率高于 NDM 患者, 提示预后不良。

参考文献

- [1] Schneider DJ, Sobel BE. Determinants of coronary vascular disease in patient with type II diabetes mellitus and their therapeutic implications. *Clin Cardiol*, 1997, 20: 433-440.
- [2] 郭继鸿, 张萍. 动态心电图学. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 166-305.
- [3] Grimaldi A, Gonzalez I, Bosquet F, et al. Heart involvement in diabetic patients. *Presse Med*, 1990, 19: 519-524.
- [4] 胡雪松, 虞准, 方卫华, 等. 冠心病合并 2 型糖尿病与非糖尿病患者的冠状动脉造影配对分析. *中国介入心脏病学杂志*, 2002, 10: 191-193.
- [5] Deedwania PC. Mechanisms of endothelial dysfunction in the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep*, 2003, 3: 289-292.
- [6] Wallentin L, Lagerqvist B, Husted S, et al. Outcome at 1 year after an invasive compared with non-invasive strategy in unstable coronary artery disease; the FRISC II invasive randomized trial. FRISC II Investigators. *Fast revascularisation during instability in coronary artery disease. Lencet*, 2000, 356: 9-16.
- [7] 杨泽, 郑宏, 佟之复, 等. 1997 年北京城乡老年人糖尿病患病率调查. *中华老年医学杂志*. 2001, 4: 290-293.