DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.029
第23卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 12
2001年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2001

文章编号:1000-5404(2001)12-1447-03

论著

辛伐他汀对血管升压素诱导大鼠心脏成纤维细胞增殖的影响

徐 琳,赵连友,范延红,田建伟,杨学东,张海涛,陈永清,彭育红 (第四军医大学唐都医院心脏内科,西安 710038)

提 要:目的 探讨辛伐他汀(Simvastatin,Sim)对血管升压素(AVP)诱导的新生SD大鼠心脏成纤维细胞(CFs)增殖的影响,为防治高血压心肌纤维化提供理论依据。方法 采用胰酶消化、差速贴壁法培养新生SD大鼠CFs,以^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入法测定DNA合成、四氮唑盐(MTT)比色法测定细胞数目,分别观察不同浓度Sim对AVP诱导CFs增殖的作用及甲羟戊酸(Mevalonate,MVA)干预的影响。结果 ①CFs(200个细胞)的^{3}H-TdR掺入率随着Sim干预浓度的增加而降低,其中10^{-6}mol/L Sim和10^{-5}mol/L Sim组的^{3}H-TdR掺入率分别为(1 175±202.66)、(771±164.86)cpm,明显低于对照组(1 955±372.45)cpm($P<0.01$);② MTT比色法A_{490}值随Sim浓度的增加而降低,其中10^{-6}、10^{-5}mol/L Sim组的A_{490}值分别为0.215±0.041和0.163±0.018,均较对照组A_{490}值0.393±0.048显著降低($P<0.01$);③$10^{-5}$mol/L Sim+10^{-3}mol/L MVA组的^{3}H-TdR掺入率、MTT比色法A_{490}值分别为(1 995±353.83)cpm和0.418±0.045,均显著高于10^{-5}mol/L Sim组($P<0.01$)。结论 辛伐他汀可抑制AVP诱导的CFs DNA的合成和细胞数目增加,提示Sim可抑制CFs增殖,其机制可能通过甲羟戊酸代谢途径实现的。

关键词:辛伐他汀;甲羟戊酸;血管升压素;心脏成纤维细胞;细胞增殖
中图法分类号:R541.3 文献标识码:A

Effects of simvastatin on proliferation of rat cardiac fibroblasts induced by arginine vasopressin *in vitro*

XU Lin, ZHAO Lian-you, FAN Yan-hong, TIAN Jian-wei, YANG Xue-dong, ZHANG Hai-tao, CHEN Yong-qing, PENG Yu-hong (Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of simvastatin (Sim) on the proliferation of rat cardiac fibroblasts (CFs) induced by arginine vasopressin (AVP) for theoretical bases of preventing and treating cardiac myofibrosis due to hypertention. **Methods** CFs of neonatal Sprague-Dawley (SD) rats were isolated with trypsin digestion method and those growth-arrested were stimulated with 10^{-7}mol/L AVP in the presence of various concentrations of Sim and mevalonate (MVA). The DNA synthesis of CFs was measured with ^{3}H-Thymidine (^{3}H-TdR) incorporation. MTT colorimetry was adopted to evaluate cell number. **Results** ①Sim decreased ^{3}H-TdR incorporation in CFs in a concentration-dependent manner. ^{3}H-TdR incorporation values of 10^{-6}mol/L Sim and 10^{-5}mol/L Sim group (1 175±202.66 and 771±164.86 cells in every 2 000 cells, respectively) were significantly lower than those of the control (1 955±372.45 in every 2 000 cells) (both $P<0.01$); ② A_{490} values of 10^{-6} mol/L Sim and 10^{-5} mol/L Sim group (0.215±0.041, 0.163±0.018, respectively) were significantly lower than those of the control (0.393±0.048) (both $P<0.01$). ③ ^{3}H-TdR incorporation in CFs and A_{490} value of 10^{-5}mol/L Sim+10^{-3}mol/L MVA group (1 995±353.83 cells in every 2 000 cells, 0.418±0.045 respectively) were significantly higher in comparison with 10^{-5}mol/L Sim group (both $P<0.01$). **Conclusion** The results indicate that Sim can decrease CFs number and DNA synthesis induce by AVP and MVA pathway may play an important role in the CFs proliferation.

Key words: simvastatin; mevalonate; arginine vasopressin; cardiac fibroblasts; proliferation

高血压左室肥厚(LVH)是影响心血管疾病病情进展的独立危险因素,高血压病(EH)伴左室肥厚患者急性心机梗死、心力衰竭、猝死及其他心血管疾病发病率增加6~8倍。现认为,心脏成纤维细胞(CFs)增殖导致心肌纤维化(MF)可能是EH左室肥厚的主要病理基础。血管升压素(AVP)是下丘脑分泌的多肽,能够诱导CFs增殖,参与MF和LVH的发生和发展,并和EH患者病情密切相关[1,2]。因此,高血压治疗的新目标是消退LVH、改善MF和恢复心肌功能。目前认为,他汀类药物(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, HMG-CoA还原酶抑制剂)不仅能显著降低血清胆固醇和低密度脂蛋白,而且还具有抑制血管平滑肌细胞(VSMC)增殖、防止血栓形成及保护内皮等功能,其影响已远超过调脂所带来的效应[3,4]。关于HMG-CoA还原酶抑制剂能否改善MF,目前尚不十分清楚。本研究拟观察辛伐他汀(Simvastatin,Sim)对AVP介导的CFs增殖的影响,并进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

出生1~3 d的SD大鼠,本校实验动物中心提供。胰蛋白酶、四氮唑盐(MTT)和甲羟戊酸均为Sigma公司产品;AVP购自美国Pennisular Lab;辛伐他汀(Merck公司惠赠);DMEM培养基(GIBCO公司产品);胎牛血清(FCS)(浙江金华市靖湖犊牛利用研究所产品);^{3}H-TdR购自中国原子能研究院同位素研究所;2500E型CO_2培养箱(美国NuAire公司);3550型自动酶联检测仪(Beckman公司);LS6500

作者简介:徐 琳(1974-),女,江苏省沭阳县人,硕士,主要从事防治高血压病方面的研究。电话:(029)3377633

收稿日期:2001-06-06;修回日期:2001-09-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

型液态闪烁计数仪(美国 Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CFs 培养及鉴定 无菌取出生后 1~3 d 的SD 大鼠心室,剪碎,0.125%胰酶在 37 ℃下分散细胞,每隔 5 min 收集一次细胞,1 000 r/min 离心 4 min×2 次,将所得全部细胞置于含 100 ml/L FCS 的 DMEM 培养液中,在 50 ml/L CO_2、37 ℃、饱和湿度条件下培养 60~90 min,根据 CFs 较心肌细胞贴壁速度快的原理,采用差速贴壁法,倾去上清液,剩下的细胞即为 CFs,加入含 100 ml/L FCS 的 DMEM 继续培养。经倒置显微镜、透射电镜、免疫组化纤维粘连蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为 CFs,纯度达 98%,台盼蓝染色细胞活力大于 97%。生长近融合时按 1∶3 传代,实验采用 2~4 代细胞。

1.2.2 CFs 的 DNA 合成功能测定 以^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入率反映 CFs 的 DNA 合成功能。取对数生长期 CFs,0.25%胰酶消化,用含 10%胎牛血清的 DMEM 调整细胞悬液浓度为 1×10^4/ml,加入 96 孔培养板中,每孔加入 200 μl,静置培养至细胞接近融合。弃上清,加入无血清 DMEM,继续培养24 h,使细胞维持生长静止状态。分别加入不同试剂干预。在最后的干预药物加入时,同时加入^{3}H-TdR 7.4×10^4 Bq/ml 和维生素 C 50 mg/L,12 h 后吸弃上清液,二蒸水冲洗,加 10%三氯乙酸洗 5 min,加 0.3 mol/L NaOH 处理 30 min,多头细胞收集器收集细胞裂解液至玻璃纤维滤纸上,烤干。将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中,每管加入闪烁液 0.5 ml,液态闪烁计数仪测定放射性。结果以 cpm 值表示。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖 将 CFs 接种在 96 孔板中,2 000 个/孔,37 ℃、50 ml/L CO_2及饱和湿度下培养;根据实验的目的和要求在药物干预前 24 h 将培养液换成无血清 DMEM 培养液使之静止,药物干预 72 h,终止培养,每孔加入 MTT 20 μl,37 ℃继续培养 4 h;吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,振荡混匀 10 min 使结晶充分溶解;在酶联免疫检测仪上 490 nm 波长处测定光吸收值(A_{490}值),用只加培养液不加细胞的空白孔调零。

1.2.4 实验分组 实验分 4 组:①空白对照组;②$10^{-7}$ mol/L AVP 组;③$10^{-7}$ mol/L AVP+Sim(10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L)组;④$10^{-7}$ mol/L AVP+10^{-5} mol/L Sim+MVA(10^{-6}、10^{-5}、10^{-4}、10^{-3} mol/L)组

1.3 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用多个样本均数比较的 ANOVA 方差分析,两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 AVP 对 CFs DNA 合成功能和细胞数目的影响

10^{-7} mol/L AVP 的^{3}H-TdR 掺入率和 MTT 法 A_{490}值明显高于空白对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 AVP 和 MVA 对 CFs DNA(2 000 个细胞)合成及细胞数目的影响

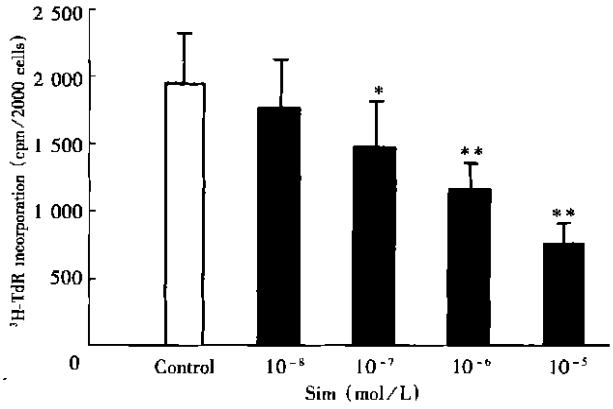
Tab 1 Effects of AVP and MVA on CFs DNA synthesis and cell number

Group	n	^{3}H-TdR incorporation (cpm)	A_{490} values
Blank	6	1 608±204.32	0.347±0.024
10^{-7}mol/L AVP	6	1 955±372.45△	0.393±0.048△
10^{-5}mol/L Sim	6	771±164.86	0.163±0.018
10^{-5}mol/L Sim+10^{-6}mol/L MVA	6	854±219.09	0.173±0.027
10^{-5}mol/L Sim+10^{-5}mol/L MVA	6	1 225±323.16 #	0.221±0.049 #
10^{-5}mol/L Sim+10^{-4}mol/L MVA	6	1 612±308.57 ##	0.324±0.047 ##
10^{-5}mol/L Sim+10^{-3}mol/L MVA	6	1 995±353.83 ##	0.418±0.045 ##

△: $P<0.05$ *vs* blank; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 10^{-5}mol/L sim group

2.2 Sim 对 CFs DNA 合成功能的作用

Sim 以浓度依赖方式使 CFs(2 000 个细胞)的^{3}H-TdR 掺入率降低.其中 10^{-7}、10^{-6}和 10^{-5}mol/L Sim 组的^{3}H-TdR 掺入率显著低于对照组 10^{-7}mol/L AVP 组,而 10^{-8}mol/L Sim 组的^{3}H-TdR 掺入率与 10^{-7}mol/L AVP 组比较无显著性差异($P>0.05$),见图 1。



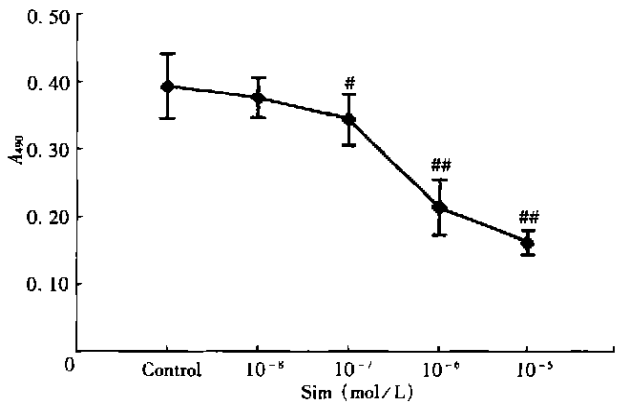
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 1 不同浓度 Sim 对 CFs DNA 合成功能的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of Sim on DNA synthesis of CFs

2.3 Sim 对 CFs 数目的影响

在 10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}和 10^{-5}mol/L Sim 的作用下,MTT 法 A_{490}值随着 Sim 浓度的增加,A_{490}值呈递减趋势。其中 10^{-7}、10^{-6}和 10^{-5}mol/L Sim 组的 A_{490}值均低于对照组 10^{-7}mol/L AVP A_{490}值;10^{-8}mol/L Sim 的 A_{490}值与对照组 A_{490}值比较差异无显著性($P>0.05$),见图 2。



#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

图 2 不同浓度 Sim 对 AVP 诱导的 CFs 数目的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of Sim on CFs number induced by AVP

2.4 MVA 对 CFs DNA 合成功能和细胞数目的影响

MVA(10^{-5}、10^{-4}、10^{-3}mol/L)+10^{-5}mol/L Sim 的^{3}H-TdR 掺入率和 A_{490}值分别显著高于 10^{-5}mol/L Sim 组(分别$P<0.05$、$P<0.01$ 和$P<0.01$),而 10^{-6}mol/L MVA+10^{-5}mol/L Sim 组的^{3}H-TdR掺入率和 A_{490}值分别与 10^{-5}mol/L Sim 组比较均无显著

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性差异($P > 0.05$), 见表 1。

3　讨论

众多资料表明, CFs 增殖和胶原合成增加可导致 MF, 并参与了高血压心室重塑过程[5], 也是 EH 患者心脏收缩和舒张功能障碍而引起充血性心力衰竭的病理基础[6]。大量研究证实, 血流动力学因素即外周循环阻力对于诱导 MF 并不重要, 而体液因素在诱导 MF 中占重要地位[3]。AVP 是下丘脑分泌的多肽, 能够促进大鼠 VSMC 增殖, 在 LVH 的发生、发展过程中具有重要作用, 伴左室肥厚的 EH 患者血浆 AVP 水平显著高于不伴左室肥厚的 EH 患者[2,7]。最近研究发现, AVP 呈剂量依赖性地促进 CFs 增殖和胶原合成, 导致 MF。

本研究结果显示, AVP 可使 CFs 的 ^{3}H-TdR 掺入率增加, Sim 呈浓度依赖方式减少 AVP 诱导的 CFs ^{3}H-TdR掺入率增加, 表明Sim 可使 CFs 的 DNA 合成减少, 这与文献[8] 报道氟伐他汀可减弱自发性高血压大鼠 VSMC 的 DNA 合成的结果是一致的。本研究还显示, AVP 使 CFs 数目增加的效应可被 Sim 所逆转, 且呈浓度依赖性, 说明Sim 能够抑制 AVP 诱导的CFs 增殖。由此可见, Sim 能拮抗 AVP 诱导的 MF, 这为防治高血压左室重塑提供了新的思路。

本研究还发现, MVA 呈浓度依赖性拮抗 Sim 抑制 CFs DNA 合成增强和 CFs 数目增加的作用。当加入 1 mmol/L MVA 时, Sim 对 CFs 增殖的抑制作用能被大部分、甚至完全地解除, 说明 MVA 对于高血压 MF 的 CFs 异常增殖具有促进作用, 这与文献[9~12] 报道氟伐他汀、辛伐他汀在体外抑制 VSMC、血管内皮细胞、肾小球系膜细胞和肾间质细胞的增殖能被外源加入的 MVA 所阻断相一致, 也进一步支持 Sim 抗 CFs 增殖的作用。业已证实, 胆固醇生化代谢途径中许多产物对于细胞的生物功能有影响, 其中 HMG-CoA 还原酶是该途径催化乙酰辅酶 A 合成 MVA 的限速酶, 细胞增殖至少需要胆固醇和非甾醇类异戊二烯两种 MVA 的衍生物。前者是细胞膜、核膜、线粒体膜等装配所必需的成分; 后者其功能单位组成疏水键与 P21ras 蛋白 C 末端附近的半胱氨酸残基共价结合使之异戊二烯化锚定于细胞膜, 是 P21ras 蛋白活化进而通过 ras 依赖的细胞内信号转导通路, 启动核内原癌基因的转录和翻译, 诱导 DNA 合成, 促进细胞增殖和分化的前提。由于 Sim 竞争性阻断 HMG-CoA 还原酶的结合位点, 抑制胆固醇的生物合成, 并减少了 MVA 及其衍生物的生成, 阻断了蛋白质翻译后的异戊二烯加工过程, 使活化的 P21ras 失活而从细胞膜上脱离, 进而干扰了 ras 介导的细胞信号转导, 导致 DNA 合成和细胞增殖受抑[13,14]。Sim 抗 CFs 增殖作用可能与其有关, 其确切的机制有待进一步研究。

综上所述, 不难看出 Sim 抑制 CFs 增殖的作用具有临床意义。Sim 阻断了 MVA 途径的起始位点, 使该途径中提供 CFs 生长所必需原料的多个环节均被抑制, 加之其良好的调整血脂作用, 故认为 Sim 治疗高血压病 MF 和消退左室肥厚具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] 杨学东, 赵连友, 李雪, 等. 精氨酸加压素诱导大鼠心脏成纤维细胞胶原合成的作用[J]. 心脏杂志, 2000, 12(3): 169－171, 173.

[2] 赵连友, 曹世平. 高血压患者血浆精氨酸加压素浓度的变化及其与病情的关系[J]. 中华心血管病杂志, 1993, 21(3): 147－149.

[3] Negre-aminou P, Vliet A K, Erck M, *et al*. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types [J]. Biochem Biophys Acta, 1997, 1 345(3): 259－268.

[4] Ortiz M B, Coin M, Gomez M B, *et al*. Mevalonate dependency of the early cell cycle mitogenic response to epidermal growth factor and prostaglandin F2α in swiss mouse 3T3 cells [J]. J Cell Physiol, 1995, 162(1): 139－146.

[5] Weber K T, Brilla C G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and rennin-angiotensin-aldosterone system [J]. Circulation, 1991, 83(6): 1 849－1 865.

[6] Booz G W, Baker K M. Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts [J]. Cardiovas Res, 1995, 30(4): 537－543.

[7] Chapman D, Weber K T, Eghabali M, *et al*. Regulation of fibrillar collagen type Ⅰ, Ⅲ and basement membrane type Ⅳ collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium [J]. Circ Res, 1990, 67(4): 787－794.

[8] 林志鸿, 谢良地, 许昌声, 等. 氟伐他汀对高血压血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 高血压杂志, 2000, 8(3): 253－255.

[9] Laufs U, Marra D, Node K, *et al*. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors atten-ate vascular smooth muscle proliferation by preventing Rho GTPase-induced down-regulation of P^{27}kipl [J]. J Bio Chem, 1999, 274(31): 21 926－21 931.

[10] MB, Bellosta S, Bernini F, Ferri N, *et al*. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitor [J]. Atherosclerosis, 1998, 137(Suppl): s101－s109.

[11] Rogler G, Lackner K J, Schmitz G, *et al*. Mevalonate is essential for growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro [J]. Basic Res Cardiol, 1995, 90(6): 443－449.

[12] Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L, *et al*. Direct of effects of statins on the vascular wall[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 31(5): 773－778.

[13] Singh S V, Mohas R R, Agrral R, *et al*. Novel anti-carcinogenic activity of an organ sulfide from garlic: inhibition of H-ras oncogene transformed tumor growth in vivo by disulfide is associated with inhibition of p21ras procession [J]. Biochem Biophys Res Commu, 1996, 225(2): 660－665.

[14] Vrtovsnik F, Couettes, Prie D, *et al*. Lovastatin inhibition of renal epithelial tubular cell proliferation involves a P21ras activated AP-1-dependent pathway [J]. Kidney Int, 1997, 52(4): 1 016－1 027.

（编辑　冷怀明）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net