

辛伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块中核因子 κ B-DNA 结合活性和基质金属蛋白酶 1 及 3 表达的影响

杨晓云¹, 王琳¹, 曾和松¹, 周宁¹, 卜军¹, 袁永辉²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院心内科, 2. 病理学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 内科学; 辛伐他汀抑制核因子 κ B-DNA 结合活性; 电泳移动迁移技术; 辛伐他汀; 核因子 κ B; 基质金属蛋白酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察辛伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块中核因子 κ B-DNA 结合活性和基质金属蛋白酶 1 及 3 表达的影响, 进一步探讨辛伐他汀降脂效应以外的抗动脉粥样硬化作用机制。方法 36 只雄性新西兰大耳白兔被随机分为低脂对照组、高脂对照组和辛伐他汀组, 喂养 12 周。实验结束时, 分别用酶标法、电泳移动迁移技术、免疫组织化学和形态学方法观察三组兔的血脂水平、主动脉组织中核因子 κ B-DNA 结合活性、基质金属蛋白酶 1 和 3 的表达及血管内膜厚度。结果 实验结束时, 低脂对照组和辛伐他汀组血脂水平、核因子 κ B-DNA 结合活性、基质金属蛋白酶 1 和 3 的表达及血管内膜厚度均明显低于高脂对照组 ($P < 0.05$); 辛伐他汀组血脂水平与低脂对照组相比无明显差异, 但核因子 κ B-DNA 结合活性、基质金属蛋白酶 1 和 3 的表达及血管内膜厚度均明显低于低脂对照组 ($P < 0.05$)。结论 辛伐他汀可以抑制核因子 κ B-DNA 结合活性, 减弱基质金属蛋白酶 1 和 3 的表达, 延缓动脉粥样硬化的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Simvastatin on Nuclear Factor κ B-DNA Binding Activity and Matrix Metalloproteinase 1 and 3 Protein Expression in Atherosclerosis Model of Rabbit

YANG Xiaoyun, WANG Lin, ZENG He-Song, ZHOU Ning, PU Jun, and YUAN Yong-Hui

(Department of Cardiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Nuclear Factor κ B; Matrix Metalloproteinase; Atherosclerosis; Serum Lipids; Intima Thickness

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of simvastatin on nuclear factor κ B (NF- κ B)-DNA binding activity and on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and 3 in atherosclerotic plaque in rabbits and to explore the anti-atherosclerotic properties beyond its lipid-lowering effects. **Methods** Thirty-six New Zealand male rabbits were randomly divided into low cholesterol group (LC), high cholesterol group (HC), high cholesterol+ simvastatin group (HC+ S), and then were fed for 12 weeks. At the end of experiment, standard enzymatic assay, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), immunohistochemistry staining, and morphometry were performed to observe serum lipids, NF- κ B-DNA binding activity, MMP-1 and 3 protein expression, intima thickness and plaque area of aorta respectively in all three groups. **Results** The serum lipids, NF- κ B-DNA binding activity, expression of MMP-1 and 3 protein and intima thickness of aorta in the LC group and HC+ S group were significantly lower than those in the HC group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the serum lipids between the LC group and HC+ S group ($P > 0.05$), but the NF- κ B-DNA binding activity, the expression of MMP-1 and 3 protein and the intima thickness of aorta in the HC+ S group were significantly decreased compared with the LC group ($P < 0.05$). **Conclusions** This study demonstrates that simvastatin could inhibit the NF- κ B-DNA binding activity, reduce the expression of MMP-1 and 3 protein, and decrease atherosclerosis.

急性冠状动脉综合症的发病机制是目前心血管领域的研究重点之一, 而其发生的主要原因是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块不稳定。近年来

的研究表明, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)是导致 As 斑块不稳定的重要因素^[1]。而核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)可调控 MMP 等致炎因子的表达^[2], 促进 As 的发生和发展。他汀类药物除了降低血脂外, 还具有直接和间接的抗炎和稳定斑块作用^[3], 但他汀类药物能否通过影响核因子 κ B 信号途径而影响 MMP 的表达目前尚不清楚。本文通过研究辛伐他汀对兔 As 血管壁中核因子 κ B-DNA 结合活性以及 MMP-1 和 3 表达的影响, 进一步

[收稿日期] 2005-06-10 [修回日期] 2006-04-10

[作者简介] 国家自然科学基金(30470713)资助

[作者简介] 杨晓云, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 yangxiaoyun321@yahoo.com.cn。王琳, 主任医师, 教授, 主要从事心血管病的研究。曾和松, 主任医师, 教授, 主要从事冠心病防治方面的研究。

探讨他汀类药物抗 As 及稳定斑块的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

辛伐他汀由杭州默沙东制药有限公司提供;胆固醇、牛血清白蛋白购自武汉亚法生物技术有限公司;MMP-1 和 3 多克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供;生物素标记核因子 κ B 探针由赛百盛基因技术有限公司提供;核蛋白提取试剂盒、化学发光凝胶电泳迁移率试剂盒由美国 Pierce 公司提供;低温高速离心机采用美国 Heraeus instruments Labofuge 400R;电泳仪采用美国 Biometra standard power pack P25, HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统由华中科技大学同济医学院千屏影像技术有限公司提供。

1.2 动物分组及兔动脉粥样硬化模型的建立

3~4 月龄、体重 2.15 ± 0.25 kg 的雄性新西兰大白兔(由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供)36 只,以普通饲料适应性喂养 1 周后,按文献[4]经耳缘静脉一次性注射牛血清白蛋白 250 mg/kg 造成免疫性内皮损伤,随即按分层随机法分为三组,每组 12 只:低脂对照组每只动物每日给予低脂饲料 100 g(含 0.25 g 胆固醇及 1.25 g 猪油);高脂对照组每只动物每日给予高脂饲料 100 g(含 1 g 胆固醇及 5 g 猪油);辛伐他汀组在高脂对照组的基础上,每只动物每日上午定时给予辛伐他汀 5 mg/kg。动物分笼饲养,喂满 12 周。

1.3 血脂测定

分别于实验前、实验第 4、8 和 12 周末空腹耳缘静脉采血,采用酶标法测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)采用公式计算。

1.4 电泳移动迁移技术检测核因子 κ B-DNA 结合活性

参照核蛋白提取试剂盒说明书,从低脂对照组、高脂对照组及辛伐他汀组主动脉组织中取适量冷冻的血管组织剪碎、匀浆,提取核蛋白待测。采用含核因子 κ B 结合位点的双链寡核苷酸探针两对,其中 1 对为 5'末端生物素标记,另一对则未标记,序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG G-3'和 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5',该序列适用于哺乳类动物。按照电泳移动迁移技术(electrophor-

eric mobilishift assay, EMSA)试剂盒说明书将生物素标记的探针稀释为 10 pmol/L,未标记生物素的探针稀释为 1 nmol/L。将结合反应体系(待测核提取物、生物素标记的核因子 κ B 系列及 DNA 结合反应缓冲液)在室温下孵育 20 min,加上缓冲液混匀,在 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,将结合反应体系电转移至硝酸纤维膜上,迅速进行紫外交联;在结合/封闭缓冲液中孵育膜封闭 15 min;生物素标记一抗、化学发光试剂增强反应后,取出膜放置在胶片暗盒中 X 线曝光 5 min,置于显影剂中显影后可见密度强弱不一的显影带。采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测定其灰度值和滞后带面积,两者的乘积表示核提取物中核因子 κ B 与标记探针结合的活性。

1.5 免疫组织化学检测基质金属蛋白酶 1 和 3 的表达

MMP-1 和 3 免疫组织化学染色均采用 SP 法,具体操作步骤按说明书进行。MMP-1 和 3 多克隆抗体工作浓度均为 1:200,阳性表达表现为胞膜、胞质黄染,无黄染者为阴性,计算机图像处理分析仪测定阳性产物的光密度,每组取 6 张切片,每张切片选取 4~6 个高倍视野,取平均值。

1.6 病理形态学检查

三组动物在喂满 12 周时经兔耳缘静脉注入过量苯巴比妥钠处死,开胸、迅速分离、离断主动脉。取主动脉弓处约 0.5 cm 血管组织置入 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 24 h,经脱水、透明、浸蜡、包埋与石蜡切片处理后,HE 染色,光镜下经摄相装置输入彩色病理图像分析系统,计算各组动脉内膜厚度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对兔血脂水平的影响

实验结束时存活 32 只动物。高脂饮食喂养前,三组动物的血脂水平无明显差异。在喂养第 4、8 和 12 周末,低脂对照组和辛伐他汀组血脂水平均明显低于高脂对照组($P < 0.05$);但辛伐他汀组与低脂对照组血脂水平无明显差异(表 1)。

2.2 辛伐他汀对核因子 κ B-DNA 结合活性的影响

低脂对照组、高脂对照组和辛伐他汀组核因子 κ B-DNA 结合活性分别为 27.32 ± 3.49 、 47.90 ± 6.74 和 14.19 ± 2.89 ,高脂对照组核因子 κ B-DNA 结合

活性明显强于低脂对照组和辛伐他汀组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 辛伐他汀组核因子 κB -DNA 结合活性与低脂对照组相比明显减弱 ($P < 0.05$)。见图 1。

表 1. 三组家兔血脂水平变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	实验前	4 周	8 周	12 周
高脂对照组 ($n=9$)				
TC	1.47 $\pm$ 0.23	10.39 $\pm$ 2.65	17.27 $\pm$ 3.84	24.38 $\pm$ 4.31
TG	0.83 $\pm$ 0.22	3.29 $\pm$ 0.75	4.28 $\pm$ 0.81	6.27 $\pm$ 1.15
LDLC	0.59 $\pm$ 0.18	7.83 $\pm$ 1.63	14.13 $\pm$ 3.31	19.25 $\pm$ 3.81
低脂对照组 ($n=12$)				
TC	1.44 $\pm$ 0.22	6.55 $\pm$ 1.24 ^a	12.63 $\pm$ 2.28 ^a	14.74 $\pm$ 2.37 ^b
TG	0.82 $\pm$ 0.26	2.19 $\pm$ 0.28	3.13 $\pm$ 0.62	3.26 $\pm$ 0.56 ^a
LDLC	0.51 $\pm$ 0.17	4.46 $\pm$ 0.19 ^a	10.13 $\pm$ 2.21 ^a	12.11 $\pm$ 2.27 ^a
辛伐他汀组 ($n=11$)				
TC	1.57 $\pm$ 0.27	7.13 $\pm$ 1.32 ^a	13.19 $\pm$ 2.35 ^a	15.72 $\pm$ 2.87 ^b
TG	0.89 $\pm$ 0.34	2.31 $\pm$ 0.54	3.02 $\pm$ 0.53	3.81 $\pm$ 0.61 ^a
LDLC	0.52 $\pm$ 0.15	4.73 $\pm$ 0.83 ^a	10.59 $\pm$ 2.16 ^a	12.57 $\pm$ 2.35 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与高脂对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与低脂对照组比较。

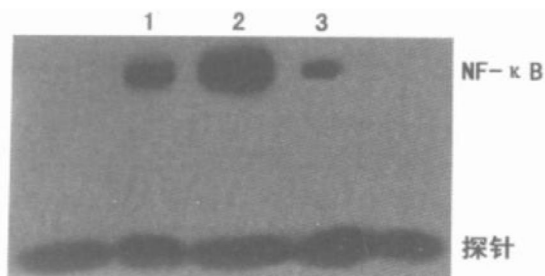


图 1. 三组兔主动脉组织核因子 κB -DNA 结合活性 1 为低脂对照组, 2 为高脂对照组, 3 为辛伐他汀组。

2.3 辛伐他汀对基质金属蛋白酶 1、3 表达的影响

MMP-1 和 3 蛋白阳性信号呈棕黄色片状颗粒, 主要位于胞膜及胞质内。高脂对照组及低脂对照组 MMP-1 和 3 阳性表达信号主要在血管新生内膜; 辛伐他汀组阳性表达也在内膜, 但内膜较薄 (图 2)。高脂对照组 MMP-1 和 3 光密度值明显大于低脂对照组和辛伐他汀组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 与低脂对照组相比, 辛伐他汀组 MMP-1 和 3 的光密度值明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2. 辛伐他汀对基质金属蛋白酶 1 和 3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	MMP-1	MMP-3
高脂对照组	0.821 $\pm$ 0.067	0.857 $\pm$ 0.061
低脂对照组	0.587 $\pm$ 0.039 ^a	0.572 $\pm$ 0.032 ^a
辛伐他汀组	0.311 $\pm$ 0.031 ^{b,c}	0.358 $\pm$ 0.024 ^{b,c}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与高脂对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与低脂对照组比较。

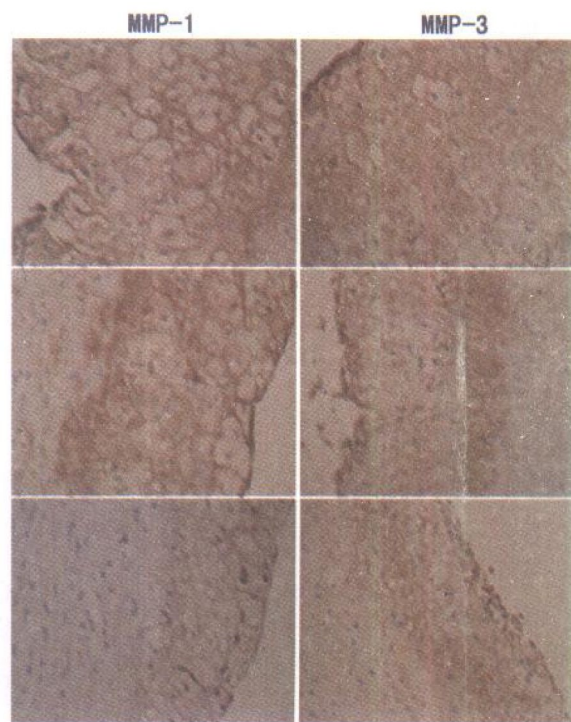


图 2. 辛伐他汀对基质金属蛋白酶 1 和 3 表达的影响 (SP 染色, $\times 400$) 上、中、下分别为高脂对照组、低脂对照组和辛伐他汀组。

2.4 辛伐他汀对血管内膜厚度的影响

光镜下, 低脂对照组和高脂对照组主动脉内膜明显增生, 可见内皮细胞变性或缺失, 内皮下大量泡沫细胞堆积; 辛伐他汀组内皮基本完整, 内膜较薄, 泡沫细胞明显减少。高脂对照组、低脂对照组和辛伐他汀组血管内膜厚度分别为 $336.91 \pm 63.60 \mu\text{m}$ 、 $219.85 \pm 51.75 \mu\text{m}$ 和 $143.08 \pm 34.12 \mu\text{m}$ 。高脂对照组血管内膜与低脂对照组和辛伐他汀组相比明显增厚 ($P < 0.05$), 辛伐他汀组血管内膜与低脂对照组相比明显变薄 ($P < 0.05$)。

3 讨论

辛伐他汀是 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 目前发现它既可降低血脂, 对 As 的炎性成分也有直接或者间接的影响^[5]。本实验结果发现, 辛伐他汀组血脂水平、核因子 κB -DNA 结合活性、MMP-1 和 3 表达及血管内膜厚度均明显小于高脂对照组与低脂对照组 ($P < 0.05$), 提示辛伐他汀可以抑制核因子 κB -DNA 结合活性及 MMP-1 和 3 的表达而发挥抗 As 作用。

Chase 等^[6]研究发现, As 的形成与核因子 κB 的激活有关。核因子 κB 是一种重要的核转录调节因

子,能调节多种炎症和免疫基因的表达,导致 As 的发生。静息状态下,核因子 κ B 由 p65、p50 亚基与其抑制蛋白 I κ B 构成三聚体、以失活状态存在于胞质中。高脂血症时,定居在动脉壁上的脂蛋白产生氧化修饰反应,通过细胞膜激活 I κ B 激酶使其磷酸化而被降解, NF- κ B 得以释放,从胞质中移位至细胞核,并暴露出 NF- κ B 的核定位序列,与炎症反应调节蛋白基因启动子区域中特定的 κ B 序列结合而被活化,引起细胞因子、粘附分子等表达增强,并通过炎症因子之间的连锁放大效应加速 As 形成。本实验结果发现,高脂对照组核因子 κ B-DNA 结合活性强于低脂对照组,其血管内膜厚度也明显大于低脂对照组,提示 As 的形成与核因子 κ B-DNA 结合活性增强有关。

本实验结果还发现,高脂对照组 MMP-1 和 3 的表达明显强于低脂对照组 ($P < 0.05$)。Nakashima 等^[7]研究表明,核因子 κ B 激活后发挥基因调控作用,使 MMP 表达上调,炎症反应增强,最终导致 As 与不稳定性斑块的形成。MMP 是一组同源的酶活性依赖 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 的中性蛋白酶,主要由巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞分泌,共分为 5 类:胶原酶(如 MMP-1)、明胶酶(如 MMP-9)、基质溶解素(如 MMP-3)、膜型基质金属蛋白酶和其他。MMP-1 在 As 斑块内主要裂解纤维帽中的 iv、 α 1 和 α 2 型胶原纤维, MMP-3 主要降解 α 1、 α 2、 α 3 和 α 4 型胶原等。新近研究表明^[8], As 的形成及发展过程也是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 重建的过程,在 As 形成的不同阶段和不同部位,ECM 的合成与降解速度是不同的,当 As 斑块内的炎症反应增强、ECM 的降解速度大于合成速度时,斑块表面的纤维帽变薄、对机械外力的抵抗作用减弱,最终会导致斑块破裂。

NF- κ B 是决定 As 进程病理状态的重要因素,故逐渐成为 As 治疗的研究靶点。本实验研究还发现,辛伐他汀组血脂水平与低脂对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$),但其核因子 κ B-DNA 结合活性、MMP-1 和 3 表达及血管内膜厚度均明显低于低脂对照组 ($P < 0.05$)。其作用可能与下列机制有关:辛伐他汀作为 HMG-CoA 还原酶抑制剂,可减少甲羟戊酸代谢途径中间产物的合成,这些中间产物如类异戊二

烯和焦磷酸法呢酯等是细胞信号转导途径的重要介质^[9],辛伐他汀可通过减少这些中间产物介导的信号转导途径而抑制 NF- κ B 活性。其途径可能有两类:一条是直接抑制 NF- κ B 与 DNA 结合;另一条是激活 I κ B,使 I κ B 与解离的 NF- κ B 重新结合成 I κ B / NF- κ B 复合物三聚体而回到胞质中。这两种途径均可阻止核因子 κ B 在细胞核发挥基因调控作用,进而减少 MMP 的表达,减轻 As 的形成^[10]。

本研究结果表明,As 的形成与核因子 κ B-DNA 结合活性增强和 MMP-1 和 3 的表达上调有关;辛伐他汀不仅能通过降低血脂而减少 As 的形成,而且还可能通过其非降脂效应—抑制核因子 κ B-DNA 结合活性、下调 MMP-1 和 3 表达、拮抗 ECM 重建而延缓 As 与不稳定性斑块的形成,为临床上防治急性冠状动脉事件的发生提供一种新的思路。

[参考文献]

- [1] Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (Matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture [J]. *Physiol Rev*, 2005, **85** (1): 1-31
- [2] Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF- κ B reduces matrix-metalloproteinase 1, -3 and -9 production by rabbit and human vascular smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, **50** (3): 556-565
- [3] Palinski W, Napoli C. Unraveling pleiotropic effects of statins on plaque rupture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1745-750
- [4] 卜军,王琳,张存泰,阮燕菲,刘念,周强.蛇毒类凝血酶对兔高脂血症及脂肪肝的形成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 483
- [5] Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (1): 115-121
- [6] Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC. Role of NF- κ B activation in metalloproteinase 1, -3 and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 765-771
- [7] Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, et al. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor- κ B and ets transcription factors [J]. *Circulation*, 2004, **109** (1): 132-138
- [8] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (3): 251-262
- [9] Jacob G, Aron A, Pina K. Functional inhibition of ras by S-trans, trans-farnesyl thiosalicylic acid attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Circulation*, 2002, **105** (20): 2416-422
- [10] 梁朝霞,高沁怡,裴著果.洛伐他汀对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 339-341

(此文编辑 文玉珊)