

阿托伐他汀抑制球囊损伤后腹主动脉 Cyr61 的表达

付 鹏¹, 梁春宇², 牛铁生¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110004;

2. 齐齐哈尔医学院附属第二医院心内一科, 黑龙江省齐齐哈尔市 161006)

[关键词] 阿托伐他汀; Cyr61; 球囊损伤; 内膜增生

[摘要] **目的** 观察球囊损伤大耳白兔腹主动脉 Cyr61 的表达以及阿托伐他汀对 Cyr61 表达的影响, 探讨阿托伐他汀抑制损伤动脉内膜增生的机制。 **方法** 形态学观察球囊损伤后不同时间的大耳白兔腹主动脉标本内膜增生情况, 采用免疫组织化学和蛋白印迹法检测 Cyr61 的表达。 **结果** 球囊损伤后可见新生内膜在术后 7 天出现, 术后 14 天明显增厚, 术后 28 天继续增厚, 形成的新生内膜厚度不均, 较假手术组明显增厚 ($P < 0.01$)。球囊损伤后 7 天、14 天 Cyr61 的表达均明显增加, 与假手术组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。而阿托伐他汀组 7 天、14 天 Cyr61 表达与球囊损伤组相比受到抑制, 差异显著 ($P < 0.01$); 28 天时 Cyr61 的表达与假手术组和球囊损伤组比较差异没有显著性 ($P > 0.05$)。 **结论** 在球囊损伤的动脉内膜上 Cyr61 的表达明显, 这种表达可以被阿托伐他汀抑制, 提示 Cyr61 在内膜增生中发挥重要作用, 阿托伐他汀抑制内膜增生可能是通过抑制 Cyr61 表达而发挥作用的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Atorvastatin on Cyr61 Expression in Abdominal Artery After Balloon Injury

FU Peng¹, LIANG Chun-Yu², and NIU Tie-Sheng¹

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China; 2. The First Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Cyr61; Balloon Injury; Intimal Hyperplasia

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of Cyr61 and the effect of atorvastatin on Cyr61 expression in abdominal artery after balloon injury and explore the mechanism of intimal hyperplasia inhibition in injured arteries by atorvastatin. **Methods** Intimal hyperplasia was studied by histological morphology method and the expressions of tissue Cyr61 was detected by immunohistochemistry and Western blot at different time-points in abdominal artery of rabbits with balloon injury. **Results** Intimal hyperplasia was present at day 7 after balloon injury, obvious thickening at day 14 and continue thickening after 28 days, neointimal thickness was uneven, significantly different than that in the control group. The expressions of Cyr61 detected by immunohistochemistry and Western blot increased significantly after balloon injury at day 7 and at day 14, and these results were significantly different from control group ($P < 0.01$). The expression of Cyr61 decreased significantly after inhibited by atorvastatin at day 7 and at day 14 were significantly different between atorvastatin group and injury group ($P < 0.01$). There was no significant difference of the expression of Cyr61 between the balloon injury group and atorvastatin group at day 28 ($P > 0.05$). **Conclusions** Cyr61 expressed obviously in injury group, but these expressions were inhibited significantly in atorvastatin group. This outcome indicated that Cyr61 may play an important role in intimal hyperplasia. Atorvastatin can inhibit the expression of Cyr61, which suggested that atorvastatin may inhibit intimal hyperplasia by decreasing the expressions of Cyr61.

富含半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich 61, Cyr61) 是结缔组织生长因子家族成员之一, 是富含半胱氨酸

[收稿日期] 2013-07-11

[基金项目] 辽宁省教育厅科研计划项目 (L2010611)

[作者简介] 付鹏, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 fup@sj-hospital.org。梁春宇, 硕士, 住院医师。通讯作者牛铁生, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础与介入治疗, E-mail 为 niuts@sj-hospital.org。

酸的分泌性肝素连接蛋白,其编码蛋白具有明显的促有丝分裂原性和趋化性,能刺激细胞增殖、趋化、黏附和促进细胞外基质形成^[1]。它能够启动血管平滑肌细胞的生长,迁移和黏附^[2],在促进平滑肌细胞的增殖过程中起重要作用。已证实血管平滑肌细胞的活化、增殖和迁移是导致动脉壁过度增生的中心环节^[3],可见,Cyr61在动脉损伤后动脉壁增生过程中起重要作用。已有大量的临床和实验研究证明他汀类药物除具有降脂作用以外,还具有改善内皮功能,抑制内膜增生的作用,而这些作用的具体机制目前仍不是十分清楚。本研究旨在观察阿托伐他汀抑制球囊损伤后兔腹主动脉内膜增生的作用与Cyr61表达的关系,探讨阿托伐他汀抑制血管损伤后内膜增生过程的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

阿托伐他汀(美国辉瑞公司);山羊抗人多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊 IgG 二抗(北京中山公司);免疫组织化学试剂盒(博士德公司);球囊导管(Cordis 公司)。

1.2 实验分组

72 只健康雄性日本大耳白兔,由中国医科大学实验动物中心提供,随机分成假手术组、球囊损伤组和阿托伐他汀组,每组 24 只。每组再随机分成术前组、术后 7 天组、术后 14 天组、术后 28 天组,每组各 6 只。

1.3 动物模型制备

将兔用 20 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,于右腹股沟处脱毛、消毒、钝性分离并暴露 2~3 cm 股动脉,结扎远端,近心端用动脉夹夹闭,眼科剪与血管呈 45°在靠近远心端结扎线处沿血管壁剪一斜形切口,切开管径的 1/3,将冠状动脉成形术中所用的带短导丝的 3.5×30 mm 球囊导管从股动脉切口中插入,将球囊导管送至胸主动脉处固定导管,外接压力泵,加压至 12 kPa 充分扩张球囊,回拉球囊直至有阻力为止,反复 3 次,每次约 30 s,拔出导管,结扎股动脉近端,缝合切口,术中肝素化,术后常规青霉素预防感染。阿托伐他汀组予阿托伐他汀[2.5 mg/(kg·d)]灌胃。假手术组予生理盐水灌胃,不进行球囊扩张与牵拉。分别于术前、术后 7 天、14 天、28 天处死动物,各 6 只,取腹主动脉 4 cm 检验。取材后一部分标本迅速置入液氮罐中,后转于 -80℃ 低温冰

箱中保存,用于 Western blot 检测;另一部分用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,常规病理连续切片,切片厚度 5 μm,分别作 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.4 HE 染色观察血管腔的形态和内膜厚度

HE 染色形态学观察光学显微镜下血管腔的形态、内膜增厚情况,并拍照记录。根据组织学的划分,内弹力膜以内为血管内膜,在 4 倍物镜下将血管横断面完整的 HE 染色结果摄入计算机图形分析系统中,计算内膜厚度。每张切片测 5 次,取平均值。

1.5 免疫组织化学检测 Cyr61 蛋白表达

石蜡包埋的血管组织常规切片、脱蜡、水化、灭活内源性过氧化物酶、抗原修复、正常血清封闭、一抗(1:200)4℃过夜、二抗(1:200)孵育 20 min、SABC 孵育 20 min(各步骤间用 0.1 mol/L PBS 缓冲液漂洗切片 5 min×3 次)、DAB 显色、苏木精复染、分化、脱水、封片。以 PBS 缓冲液为一抗作阴性对照,以人肿瘤细胞切片作为阳性对照,着棕褐色处为阳性信号。每例随机抽取染色清晰的切片 5 张,光镜下随机选取 5 个视野,利用 Image-ProPlus 软件进行半定量分析,测定阳性染色积分光密度(IOD)值,再除以图像中血管壁面积,获得平均 IOD 值。

1.6 Western blot 检测 Cyr61 蛋白表达

取各组血管组织 2 cm,用裂解缓冲液提取总蛋白质,用 Bradford 方法测定蛋白质浓度。等量蛋白质分别采用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至醋酸纤维滤膜上,室温下摇动封闭 1 h,经洗膜后,加入抗多克隆抗体(1:200 稀释)4℃过夜,室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶耦联兔抗羊 IgG(1:300 稀释),最后用化学发光底物进行发光显迹。以 β-actin 为内参,采用 ScnImage 图像分析软件分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,与内参 β-actin 的灰度值相比进行定量分析。

1.7 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 球囊损伤后腹主动脉内膜改变

假手术组血管腔没有新生内膜,可见内膜由单层内皮细胞及少量细胞外基质构成,血管层次较清楚;中膜平滑肌细胞核呈梭形,内皮细胞下未见有血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)潜入。单纯球囊损伤后 7 天新生内膜开始出现,14 天明显增厚,且内膜面积增大,可见大量排列紊乱的 VSMC,胞核多为圆形或椭圆形,不同于中

膜的梭形核;28 天内膜继续增生,内膜增生厚度不均,且较假手术组明显增厚($P < 0.01$)。阿托伐他汀组与球囊损伤组各时点相比,除 7 天时无差异,14 天和 28 天内膜厚度明显减小,管腔面积增大,阿托伐他汀组 14 天、28 天时内膜增生明显被抑制($P < 0.01$;图 1 和表 1)。

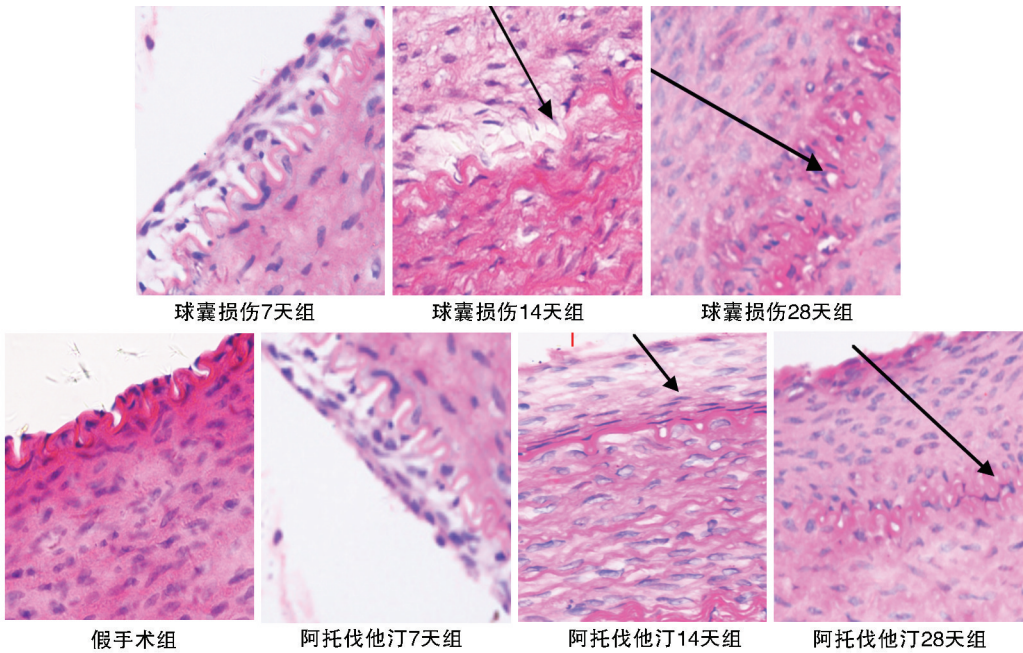


图 1. 光学显微镜下观察血管形态学改变(×400)
Figure 1. Optical microscope was used to observe the changes of vascular morphology

表 1. 不同组间不同时间段血管内膜厚度($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Table 1. Neointimal thickness in different times between the different groups

分 组	术前	术后 7 天	术后 14 天	术后 28 天
假手术组	6. 12 ± 0. 57	6. 43 ± 0. 53	6. 53 ± 0. 39	6. 70 ± 0. 51
球囊损伤组	6. 49 ± 0. 60	17. 71 ± 1. 52 ^a	73. 58 ± 3. 92 ^a	162. 18 ± 7. 77 ^a
阿托伐他汀组	6. 20 ± 0. 50	18. 02 ± 3. 37 ^a	44. 88 ± 3. 82 ^{ab}	117. 73 ± 6. 68 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与球囊损伤组相比。

2. 2 Cyt61 的免疫组织化学染色情况

球囊损伤组新生内膜在 7 天后开始出现阳性免疫反应产物, 主要定位于增生内膜细胞浆内, 增生内膜 VSMC 呈强阳性表达; 14 天内膜阳性表达有所下降, 有向腔面聚集的趋势; 术后 28 天内膜仍有少量表达。假手术组内膜未见明显着色。阿托伐他汀组 7 天、14 天时内膜改变与球囊损伤组具有明显差异($P < 0.01$), 但 28 天时无明显差异(图 2 和表

2)。
2. 3 Cyt61 的蛋白印迹检测情况

球囊损伤后 7 天 Cyt61 的表达明显增加, 7 天至 14 天表达达高峰, 14 天至 28 天时表达开始回落, 但 28 天时仍未回到假手术组水平; 阿托伐他汀组 7 天、14 天时 Cyt61 的表达与球囊损伤组相比具有显著性差异($P < 0.01$), 28 天时表达与球囊损伤组无差异, 仍未回到术前水平(图 3 和表 3)。

表 2. 免疫组织化学检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Immunohistochemical detection results

分 组	术前	术后 7 天	术后 14 天	术后 28 天
假手术组	0. 0505 ± 0. 0019	0. 0498 ± 0. 0019	0. 0495 ± 0. 0021	0. 0499 ± 0. 0016
球囊损伤组	0. 0498 ± 0. 0011	0. 2850 ± 0. 1871 ^a	0. 2040 ± 0. 0055 ^a	0. 0531 ± 0. 0017
阿托伐他汀组	0. 0499 ± 0. 0019	0. 0895 ± 0. 0016 ^{ab}	0. 0626 ± 0. 0076 ^{ab}	0. 0532 ± 0. 0021 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与球囊损伤组相比。

表 3. Western blot 检测 Cyr61 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The expression of Cyr61 detected by Western blot

分 组	术前	术后 7 天	术后 14 天	术后 28 天
假手术组	0.4187 ± 0.0051	0.4167 ± 0.0054	0.4193 ± 0.0033	0.4166 ± 0.0043
球囊损伤组	0.4161 ± 0.0049	0.7179 ± 0.0026 ^a	0.6142 ± 0.0120 ^a	0.4350 ± 0.0012
阿托伐他汀组	0.4175 ± 0.0047	0.5720 ± 0.0040 ^{ab}	0.5198 ± 0.0295 ^{ab}	0.4340 ± 0.0018

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与球囊损伤组相比。

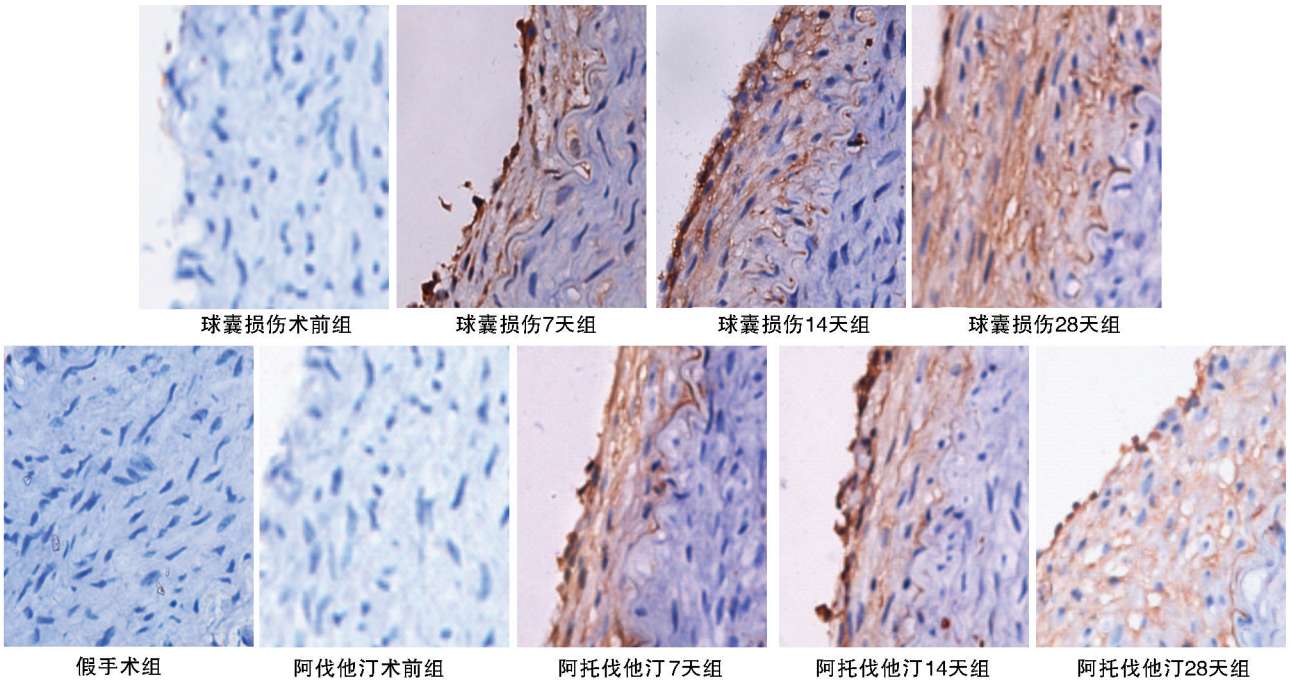


图 2. 免疫组织化学染色检测 Cyr61 表达($\times 400$)

Figure 2. The expression of Cyr61 detected by immunohistochemical staining

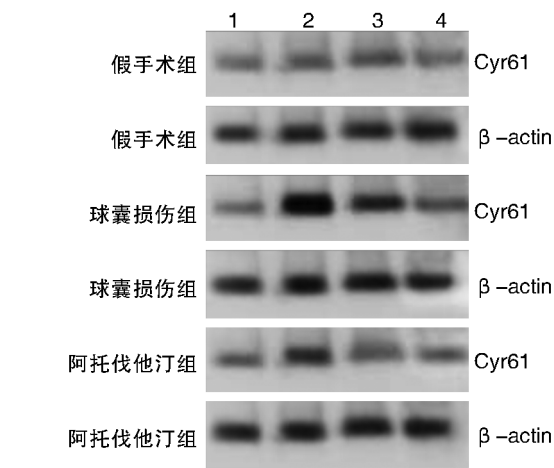


图 3. 蛋白印迹分析 Cyr61 的表达 1 为术前, 2 为术后 7 天, 3 为术后 14 天, 4 为术后 28 天。

Figure 3. The expression of Cyr61 detected by Western blot

3 讨 论

阿托伐他汀是一种选择性、竞争性的 HMG-CoA

还原酶抑制剂,是 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A 转变成甲羟戊酸过程的限速酶,主要用于冠心病降脂治疗,除此以外,阿托伐他汀还具有改善血管内皮功能^[4]、抗炎^[5,6]、抑制 VSMC^[7] 及维持斑块稳定性^[8] 等非降脂作用。实验证实他汀能抑制 VSMC 增殖^[9],近年来相关研究表明他汀类药物还有抑制裸金属支架植入术后大鼠腹主动脉内膜增生的作用,从而抑制 PCI 术后再狭窄^[10],但阿托伐他汀是否通过何种途径抑制 PCI 术后再狭窄,目前尚不清楚。

在胚胎发育期,Cyr61 表达最明显的是在间充质细胞分化为软骨细胞和发展中的循环系统的血管壁^[11],2000 年 Wu 等^[12] 首次发现 Cyr61 作为一个已知的血管生成的诱导物,在球囊损伤的猴动脉内膜中呈现高表达趋势,这个发现提供了 Cyr61 在心肌梗死再狭窄发病机制中的第一个环节。随后,Grzeszkiewicz 等^[13] 证实通过 Cyr61 整合素 $\alpha 6 \beta 1$ 和细胞表面的蛋白多糖介导平滑肌细胞黏附,并且利用大鼠颈动脉球囊损伤模型进一步证实,Cyr61 在未损伤血管中

呈现低水平表达,损伤后 4 天中膜平滑肌层 Cyr61 的表达显著上调,7 天达高峰并持续至 28 天。在这个过程中,中膜平滑肌细胞降解细胞外基质,从中膜迁移至新生内膜,重组细胞外基质并在新生内膜内增殖。Hilfiker 等^[14]研究表明人正常动脉血管没有明显的 Cyr61 的染色,而在人颈动脉斑块旋切术和冠状动脉移植手术的动脉粥样硬化血管中 Cyr61 mRNA 及蛋白均呈高表达,在载脂蛋白 E 基因缺陷鼠动脉粥样硬化模型上 Cyr61 mRNA 及蛋白均高表达,说明 Cyr61 参与动脉粥样硬化的形成及血管的狭窄。Matsumae 等^[15]利用基因敲除将基因敲除后抑制大鼠球囊损伤后平滑肌细胞增殖和内膜增生。本实验通过对球囊损伤后兔腹主动脉采用免疫组织化学染色及蛋白印迹分析的方法,发现球囊损伤后 Cyr61 表达与大鼠球囊损伤后表达趋势一致,这与 Hilfiker 等的研究结果一致。平滑肌细胞的迁移、增殖是内膜增生的主要原因,我们的研究证实在增殖的平滑肌细胞中 Cyr61 明显高表达^[16],有研究表明 Cyr61 可促进 VSMC 黏附并诱导其趋化。体外实验显示,重组 Cyr61 蛋白呈剂量依赖性促进培养的大鼠血管平滑肌细胞黏附,并通过 G(α)12/13 信号系统诱导平滑肌细胞趋化和迁移^[17];本实验通过免疫组织化学染色及蛋白印迹分析的方法表明,阿托伐他汀在球囊损伤后干预 7 天及 14 天时 Cyr61 的表达受到明显抑制,内膜增生厚度较球囊损伤组也受到抑制。提示阿托伐他汀抑制动脉损伤后内膜增厚除了自身对血管平滑肌的抑制作用之外,可能与对 Cyr61 表达的抑制有关,阻断 Cyr61 促进 VSMC 增殖、迁移、黏附,从而推测阿托伐他汀抑制 PCI 术后再狭窄作用可能与其抑制 Cyr61 表达有关。

综合本研究结果我们认为,Cyr61 表达变化在血管损伤的修复过程中发挥一定的作用,且与损伤后的血管内膜增厚、管腔狭窄密切相关,阿托伐他汀能明显抑制 Cyr61 的表达从而抑制内膜增殖和管腔狭窄,而其对 PCI 术后再狭窄的抑制作用可能与抑制 Cyr61 的表达有某种密切联系,当然这种通过对 Cyr61 的抑制作用而达到抑制动脉损伤后再狭窄的作用仅仅是阿托伐他汀非降脂作用的一个方面,其详细的机制仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor[J]. FEBS Lett, 1993, 327 (2): 125-130.
- [2] Chen N, Leu SJ, Lau LF, et al. Identification of a novel integrin α -phavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogen-

- ic activities in vascular endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (42): 44 166-176.
- [3] Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, et al. Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolaemic subjects[J]. Br J Clin Pharmacol, 2002, 54 (4): 395-399.
- [4] 冷爱文. 阿托伐他汀对不稳定心绞痛患者内皮素-1 和一氧化氮的影响[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31 (2): 121-123.
- [5] 马琦琳, 张赛尼, 黄澄, 等. 不同剂量阿托伐他汀和停药后对肥胖高胆固醇血症患者内皮功能和炎症因子的影响[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30 (1): 9-13.
- [6] 王敬祥, 张月兰, 田文, 等. 阿托伐他汀在大鼠颈总动脉球囊损伤模型中对 NF- κ B 及其相关炎症因子的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (2): 135-139.
- [7] Marzilli M. Pleiotropic effects of statins: evidence for benefits beyond LDL-cholesterol lowering[J]. Am J Cardiovasc Drug, 2010, 10 (Suppl1): 3-9.
- [8] 仲英杰, 张子为, 徐郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化和钙化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (4): 305-310.
- [9] Kaneda T, Tsuruoka S, Fujimura A. Statins inhibited erythropoietin-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649 (1-3): 38-43.
- [10] Esemuede N, Lee T, Maier KG, et al. Lovastatin inhibits thrombospondin-1-induced smooth muscle cell chemotaxis[J]. J Surg Res, 2011, 168 (1): 149-154.
- [11] Kireeva ML, MO FE, Yang GP, et al. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16 (4): 1 326-334.
- [12] Wu KJ, Yee A, Zhu NL, et al. Characterization of differential gene expression in monkey arterial neointima following balloon catheter injury[J]. Int J Mol Med, 2000, 6 (4): 433-440.
- [13] Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, et al. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin α (6) β (1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans[J]. Endocrinology, 2002, 143 (4): 1 441-450.
- [14] Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Fuchs M, et al. Expression of CYR61, an angiogenic immediate early gene in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II[J]. Circulation, 2002, 106 (2): 254-260.
- [15] Matsumae H, Yoshida Y, Ono K, et al. CCN1 knockdown suppresses neointimal hyperplasia in a rat artery balloon injury model[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28 (6): 1 077-083.
- [16] 付鹏, 牛铁生, 孙贤贤. 血管紧张素 II 上调血管平滑肌细胞富含半胱氨酸蛋白 61 的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (6): 431-434.
- [17] Kim YM, Lim SC, Han CY, et al. G(α)12/13 induction of CYR61 in association with arteriosclerotic intimal hyperplasia: effect of sphingosine-1-phosphate[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31 (4): 861-869.

(此文编辑 文玉珊)