

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.008

辛伐他汀对雷帕霉素作用下心肌微血管内皮细胞的影响

谢晓波¹ 潘 侨² 杨 静³ 刘建伟¹ 唐博恒^{1△}

(1 广州军区疾病预防控制中心 广东 广州 510507; 2 第四军医大学西京医院心血管内科 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学唐都医院惠宾科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究辛伐他汀(SIM)对雷帕霉素(RAPA)引起的体外心肌微血管内皮细胞(CMECs)损害的保护机制。**方法:** 分离、培养大鼠心肌微血管内皮细胞。经形态学及 Dil-ac-LDL 吞噬试验进行鉴定后,采用 RAPA(100 nM)处理 24 小时建立 CMECs 损伤模型,然后加入不同浓度的 SIM (0, 10⁻², 10⁻¹, 10⁰, 10¹ μM)培养 24 小时后,采用 MTT, WST-8 及 Transwell 检测受损后 CMECs 的增殖和迁移;采用 Hoechst 33258 及 Caspase-3 检查各组 CMECs 的凋亡;采用蛋白免疫印迹(Western blotting)检测 Akt/p70 S6K 磷酸化的程度;格里斯反应及实时逆转录 PCR 分别检测一氧化氮(NO)含量及一氧化氮合酶(eNOS) mRNA 的表达。**结果:** ① 经形态学及 Dil-ac-LDL 吞噬试验均表明,成功培养 CMECs; ② 低浓度 SIM 100 μM 可显著改善 100 nM RAPA 对 CMECs 增殖、迁移和凋亡的影响; ③ SIM 可通过上调 PI3K/Akt 进而上调 p70s6K 磷酸化(P<0.05 或 P<0.01); ④ SIM 通过 PI3K/Akt 促进 CMECs 分泌 NO 及 eNOS mRNA 的表达(P<0.05 或 P<0.01)。**结论:** 一定浓度下的 SIM 可改善 RAPA 作用下 CMECs 的增殖,迁移和凋亡,这些保护作用可能是通过其激活 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路实现的。

关键词: 辛伐他汀; 心肌微血管内皮细胞; p70 S6K; 一氧化氮合酶

中图分类号: Q95-3; R541.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)21-4033-05

Effect of Simvastatin on Rapamycin-treated Cardiac Microvascular Endothelial Cells

XIE Xiao-bo¹, PAN Qiao², YANG Jing³, LIU Jian-wei¹, TANG Bo-heng^{1△}

(1 Department of Disease Surveillance and Control, Centers for Diseases Control and Prevention of Guangzhou Military District,

Guangzhou, Guangdong, 510507, China; 2 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an,

Shaanxi, 710032, China; 3 Department of Huibin, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanisms underlying the protective effects of simvastatin (SIM) on rapamycin (RAPA)-treated cardiac microvascular endothelial cells (CMECs). **Methods:** CMECs isolating from rats left ventricle were cultured and identified with microscopy and Dil-ac-LDL intake assay. CMECs were then treated with rapamycin (100 nM) for 24 hours. CMECs treated with 100 nM rapamycin were added with different concentrations of simvastatin (0, 10⁻², 10⁻¹, 10⁰, 10¹ μM) respectively and then cultured for 24 h. Then cell proliferation and migration were detected by MTT, WST-8 and transwell assays. The apoptosis was determined by Hoechst 33258 staining and Caspase-3 activity assay. Western blotting was performed to assess the phosphorylation of Akt/p70S6K. Nitric oxide (NO) secretion was assessed by Griess reaction. The expression of eNOS (endothelial nitric oxide synthase) mRNA was determined by Real-Time Reverse Transcriptase PCR. **Results:** ① By observing the morphology and Dil-ac-LDL intake assay indicated that CMECs have cultured successfully. ② Low concentrations of simvastatin (100 μM) significantly improved the viability, migration and apoptosis on CMECs after pretreated with rapamycin. ③ The addition of simvastatin in CMECs resulted in rapid phosphorylation of Akt, p70 S6 kinase (p70 S6K) (P<0.05 or P<0.01). ④ After pretreatment with simvastatin, the expression of NO and eNOS increased (P<0.05 or P<0.01), which depends the activation of PI3K/Akt/ p70 S6K pathway. **Conclusion:** Certain concentrations of simvastatin could improve the viability, migration and apoptosis on CMECs after pretreated with rapamycin. These protective effects may achieve through the activation PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway.

Key words: Simvastatin; Cardiac microvascular endothelial cell; p70 S6K; Reactive oxygen species

Chinese Library Classification: Q95-3; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4033-05

前言

作者简介:谢晓波(1982-),男,硕士研究生,主要研究方向:心血管病基础研究,电话:020-61630634,

E-mail: xixibo2007@yahoo.com.cn

△通讯作者:唐博恒,电话:020-61630634,

E-mail: wwing530@gmail.com

(收稿日期:2013-11-25 接受日期:2013-12-20)

近年来,经皮腔内冠状动脉介入治疗已成为冠心病治疗的重要手段。药物支架由于其支架内药物涂层会向血管内释放抗肿瘤药物【主要为雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)或紫杉醇】,抑制细胞功能,降低早期血管内再狭窄率,而被广泛应用。但是药物支架的应用与晚期冠脉血栓的发生率增高的相关性成为研究关注的焦点。他汀类药物为 HMG-CoA 还原酶抑制剂,是治疗冠心病的常用多效型药物,它除了具备降低血脂作用外,还

能促进血管内皮细胞增殖及迁移,诱导 NO 的合成和释放,抑制凋亡和抗炎作用,同时,研究指出^[1,2]他汀类药物单独作用于内皮细胞能够改善内皮细胞功能,减轻血管炎症,促进血管新生。PI3K/Akt/mTOR 在细胞生长,增殖方面发挥主要的作用,但该信号通路在 RAPA 诱导下的心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMECs)损伤中的作用仍未有研究。因此本研究选择他汀类药物和 RAPA 共同作用下的 CMECs 为研究对象,探讨辛伐他汀(Simvastatin, SIM)对 RAPA 作用下 CMECs 的保护作用及其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和试剂

实验采用雄性 SD 大鼠,体重 95-110g(第四军医大学实验动物中心);辛伐他汀(美国 Sigma 公司);雷帕霉素(福建科瑞药业有限公司);DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);Dil-ac-LDL(美国 Molecular Probe 公司);二氨基联苯胺(DAB)(美国 Lab Vision 公司);WST-8 试剂盒(碧云天生物技术研究所);millicell 小室(Millipore 公司);Hoechst(美国 Sigma 公司);Caspase 活性检测试剂盒(美国 Chemicon 公司);抗体: Akt, phosphor-Akt (Ser73), p70S 6K, phospho-p70S 6K (Thr389)(均购自美国 Cell Signaling Technology);光泽精(Lucigenin, 美国 Sigma 公司)DHE 染色试剂盒(超氧化物阴离子荧光探针, 碧云天生物技术研究所);LY294002(中国易莱生物科技有限公司);NO 检测试剂盒(南京建成生物工程公司);引物设计(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 心肌微血管内皮细胞的分离培养与鉴定 取 100 g 左右成年雄性 SD 大鼠,0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,无菌条件下取其左心室,放入加有 PBS 和肝素的平皿,冲去血迹,将其置于 75%酒精浸泡 15 s, PBS 冲洗后,修去心内外膜,剪碎心肌组织,加入 0.2% II 型胶原酶,37℃水浴消化 6 min,加入等体积 0.25%胰酶,37℃水浴消化 5 min,再加入等量含 10%小牛血清的 DMEM 培养液中和,离心(1000 r/min, 10 min),所得细胞重悬于完全培养液(低糖 DMEM 培养液, 15%胎牛血清, 1%链霉素, 100 U/L 青霉素),置于 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养。6 h 后换液, 24 h 后再次换液,以后每 3 天换液 1 次,待细胞 80%融合后,用 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化传代,经鉴定后^[3],第 2-3 代细胞用于下一步实验。细胞爬片 24 h 后,在细胞爬片孔内加入 Dil-ac-LDL(2.4 mg/L), 37℃下孵育 3 h,多聚甲醛固定室温下固定 10 min。加入二氨基联苯胺(DAB)显色,共聚焦显微镜下观察结果。

1.2.2 细胞活性检测 取对数生长期的细胞,0.25%胰酶、0.02% EDTA 消化,以完全培养液重悬,按 1×10^4 个细胞/孔接种于 96 孔培养板,37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养,待细胞生长单层融合后换无血清培养液。随机分组,每组设立平行 8 孔:对照组只加相应培养液;实验组分别加入 RAPA (0, 10², 10¹, 100, 101 nM), RAPA(100 nM) + SIM(0, 10², 10¹, 10⁰, 10¹ μM), 孵育 24 h。然后分别采用 MTT 及 WST-8 法检测细胞活性。用酶联免疫检测仪分别在在波长 490 nm 及 450 nm 处读取各孔

A 值,记录结果。实验重复 3 次。部分结果已发表在本人以往的文献^[4],已明确地证实了 RAPA 的抑制作用,选择抑制作用适中的 RAPA 100 nM 为干扰内皮细胞的基础浓度,以此模拟 DES 植入后 RAPA 对血管内皮细胞作用的环境。并根据该部分实验结果进行后续研究。

1.2.3 细胞迁移能力检测 Transwell 迁移实验选用孔径为 8 μm 的 millicell 小室,经预实验后确定 Transwell 实验时间为 24 h。消化处于对数生长期的细胞,用无血清的低糖培养基重悬,调整细胞浓度至 3×10^5 /mL。将小室放入 24 孔板中,下室为 500 μL 含 10%胎牛血清的培养液,上室加入无血清细胞悬液 200 μL,以血清诱导细胞由上室向细胞下室迁移。在下室加入 RAPA 或 RAPA + SIM, 37℃孵育 24 h。取出小室,吸尽培养液,用棉签轻柔擦去上室面未迁移细胞, PBS 洗涤 3 次, 4%多聚甲醛固定, PBS 洗涤,结晶紫染色, PBS 洗涤,晾干。倒置显微镜计数附于下室面的细胞, 200 倍下取一直径 5 个视野计数细胞个数,求平均值,每组 3 个小室,重复 3 次。

1.2.4 细胞凋亡检测 Hoechst(33258)染色 将洁净盖玻片置于 24 孔板内,取对数生长期的细胞以 500 μL (6×10^5 /孔)密度接种于 24 孔板。随机分为七组:对照组, RAPA 组 (100 nM), SIM 组 (100 μM), RAPA(100 nM)+SIM 组 (0, 10², 10¹, 100, 101 μM)组,待细胞贴壁融合后,取出盖玻片, PBS 洗两次, 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗两次, Hoechst 33258 工作液室温染色 5 min,蒸馏水冲净晾干。在荧光显微镜下观察,每组随机选择 5 个高倍镜视野,计算阳性细胞数,其阳性细胞数与总细胞数之比即为凋亡率。Caspase-3 法按照试剂盒说明操作。

1.2.5 Western blotting 检测 除上述分组外,在原 SIM+RAPA 组增加 LY294002(PI3K 特异性抑制剂)50 u,处理时间同样为 24 h,作为新的一组。分别对各组细胞总蛋白提取、用紫外分光光度计进行蛋白定量。制备 15%的分离胶、5%的积层胶两块。用去离子水稀释细胞总蛋白,做样本处理。通电电泳,考马斯亮蓝染胶体。染色 1 h 后脱色 2-5 h。配制考马斯亮蓝脱色液:甲醇 50 mL,冰醋酸 50 mL,加去离子水 400 mL。经过半干式转膜,丽春红染色。先后采用一抗及二抗孵育。免疫印迹增强化学发光法检测。

1.2.6 NO 及 eNOS 的检测 采用硝酸还原法测定 NO 分泌量取细胞培养培养板内每孔上清 100 μL 按 NO 检测试剂盒说明书上的步骤逐一进行。采用实时逆转录 PCR 法定量各组细胞中 eNOS 的 mRNA 的量。引物设计: eNOS-F: 5'-GGAGCG-GCTGCATGACATTG-3', eNOS-R: 5'-GGTGCGTATGCGGCTT-GTCA-3'。按照 RNA 提取试剂盒说明书操作提取总 RNA,逆转录:将 RNA 2 μL, Oligo(dT) 2.5 μL, dNTP(10 μmol/L) 2.5 μL 和灭菌蒸馏水 23 μL 混匀, 65℃加热 5 min,然后迅速置冰上冷却, 700×g 离心 30 s;在其中加入 5 × RTBuffer 10 μL, 0.1 mol/L DTT 5 μL, RNase OUT 核酸酶抑制剂 2.5 μL,混匀后 37℃孵育 2 min;加入 2.5 μL 逆转录酶,混匀, 37℃孵育 50 min, 70℃加热 15 min 终止反应,最后得到 cDNA。然后行 RT-PCR 扩增。以逆转录中得到的 cDNA 为模板,分别以 eNOS-F、eNOS-R 为上下游引物,用 pfu DNA 聚合酶作 PCR 反应:扩增条件为 93℃ 3 min 预变性后, 94℃ 50 S, 56℃ 45 S, 72℃ 30 s,共 30 个循环。最后 1 轮循环完成后再 72℃延伸 10 min。反应完毕后,用 1%琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS14.0软件处理数据,两组间差异比较采用 one-way ANOVA。P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 CMECs 鉴定

细胞形态表现为铺路石样(图 1A),90%以上培养细胞 Dil-ac-LDL 吞噬试验阳性(图 1A)。两者均表明所培养细胞为 CMECs。

2.2 雷帕霉素对 CMECs 增殖和迁移的影响

不同浓度的 RAPA(0, 10⁻², 10⁻¹, 10⁰, 10¹ nM)作用于心肌微血管内皮细胞 24 h 后,MTT 检测发现,细胞 A 值显著降低,分别为 0.161±0.043、0.118±0.027、0.097±0.048、0.075±0.050,均明显低于对照组(0.252±0.064, P<0.05);Transwell 检测提示细胞迁移能力下降,按照浓度梯度分别为 67.80±5.63、63.80±7.79、40.80±9.91、30.00±8.75,均低于对照组(85.60±13.65, P<0.05,图 2)。

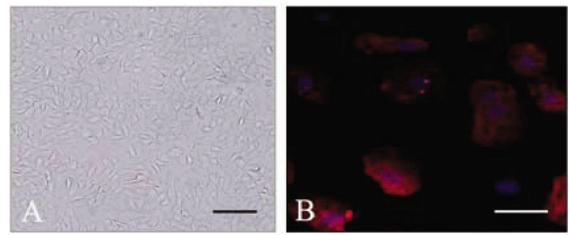


图 1-A 显微镜下心肌微血管内皮细胞为铺路石样(标尺为 40 μm); 1-B 细胞 Dil-ac-LDL 吞噬试验阳性(红色为 Dil-ac-LDL,蓝色为 DAPI,标尺为 50 μm)

Fig.1 (1-A) CMECs monolayer presents cobble stone appearance by phase-contrast microscopy (scale bar: 40 μm); (1-B) Uptake of Dil-Ac-LDL by immunofluorescence (red, Dil-Ac-LDL; blue, DAPI, scale bar: 50 μm)

2.3 SIM 对 RAPA 损伤后 CMECs 增殖、迁移及凋亡的影响

采用不同浓度的 SIM (0, 10⁻², 10⁻¹, 10⁰, 10¹ μM) 与已加入 RAPA(100 nM)的 CMECs 共孵育 24 h 后,观察到 SIM 能显著改善 RAPA 对 CMECs 的抑制作用,MTT 检测 A 值分别为

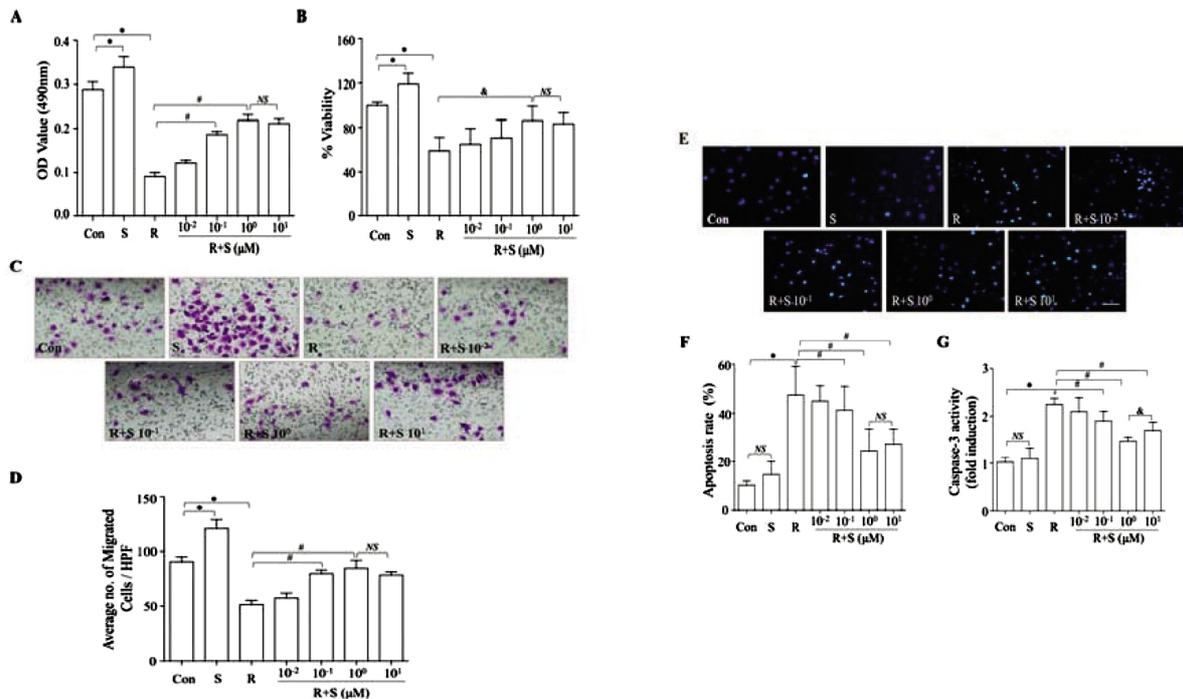


图 2 辛伐他汀改善雷帕霉素作用下心肌微血管内皮细胞的增殖,迁移和凋亡。MTT(图 A)及 WST-8(图 B)检测。Transwell 法(图 C,标尺为 550 μm)检测并定量(图 D)。与对照组比较,*P<0.05, #P<0.01, 为与单用雷帕霉素组比较, &P<0.05 为与单用雷帕霉素组比较;Hoechst 33258 染色(图 E,标尺为 50 μm)及定量分析(图 F);图 G 为 Caspase-3 活性检测。*P<0.05 为与对照组比较;#P<0.05 为与单用雷帕霉素组比较;&P<0.05 为与辛伐他汀 100 μM 组比较。缩略词:Con,对照组;S,辛伐他汀;R,雷帕霉素;NS,无统计学差异。

Fig.2 Simvastatin promoted proliferation, migration and apoptosis in rapamycin- induced CMECs. MTT assay (A) and WST-8 assay (B); Representative image (C, Scale bar: 550 μm) and quantity (D) of transwell assay. *P<0.05, vs. control, #P<0.01 vs. rapamycin alone group, &P<0.05 vs. rapamycin alone group; Representative image (E, Scale bar: 50 μm) and quantity (F) of Hoechst 33258 staining; Caspase-3 activity assay (G). *P<0.05, vs. control, #P<0.05 vs. rapamycin alone group, &P<0.05 vs. simvastatin at 100 μM group. Abbreviations: Con, control; S, simvastatin; R, rapamycin; NS, no significant.

0.122±0.014、0.186±0.017、0.219±0.029、0.211±0.025,均高于单纯 RAPA 组(0.091±0.020, P<0.05),但未达对照组水平(0.289±0.038,图 2A);WST-8 检测结果(图 2B)与 MTT 检测结果相一致。均提示在 SIM 浓度为 100 μM 时,其对雷帕霉素

损伤后的 CMECs 的保护作用达到最大。Transwell 检测结果提示:除 SIM 10-2 μM 组外,其余各组细胞迁移数量明显增加,按浓度差分别为 57.40±10.50、79.60±7.40、73.20±10.66、78.20±6.98,除 SIM 10-2 μM 组外均高于单纯采用 RAPA 处

理组(51.40± 8.74, P<0.05, 图 2C-D)。同时, SIM 可改善 RAPA 损伤后的 CMECs 的凋亡率: Hoechst (33258) 染色结果提示: (图 2E-F), 单纯加入 RAPA 凋亡率(8.28± 0.86 %)较对照组(4.94± 2.42 %)有所增加, 而单纯加入 SIM 凋亡率(2.50± 0.68 %)显著下降。在 RAPA 基础上加入 SIM, 除浓度为 SIM 10⁻² μM 外, 凋亡率(6.08± 1.42 %, 4.80± 1.83 %, 5.02± 1.52 %)均较单纯加入 RAPA 组低, 其中 SIM 100 μM 组达到最低。采用 Caspase-3 检测结果(图 2E-F)与 Hoechst(33258)染色结果相一致。均提示 SIM 可显著改善 RAPA 处理后 CMECs 的凋亡。无论是 CMECs 增殖, 迁移以及凋亡, 均在 SIM 浓度为 100 μM 时效果显著。

2.4 SIM 上调雷帕霉素作用下 CMECs 中 p70 S6K 磷酸化的水平

研究表明, CMECs 中多数的生长因子诱导反应是通过 PI3K/Akt 信号通路介导的^[9]。这一结果促使我们进一步研究这一通路是否与 RAPA 处理后 SIM 对 CMECs 的保护作用有关。首先, 我们观察了 SIM 能否激活 CMECs 中这一通路, Western blotting 结果提示: 给予 SIM 他汀处理后可上调 CMECs 中 Akt 磷酸化的程度(图 3A-B)。p70 S6K 为蛋白翻译过程的调节分子, 受控于 mTOR, 为 Akt 的下游分子^[6]。进一步对 p70 S6K 分子进行检测, 结果提示, SIM 可诱导 p70 S6K 磷酸化(图 3A-C), 从而可导致受其调节的酶活化。采用 LY294002(PI3K 特异性抑制剂)预处理后, 可消除 SIM 上调 Akt 及 p70 S6K 磷酸化的作用。反之, 采用 RAPA, 其为 mTOR 的特异性抑制剂, 仅仅可抑制 p70 S6K 的活性。这一结果提示: SIM 呈级联的形式激活 PI3K/Akt/mTOR /p70 S6K 信号途径。

2.5 SIM 促进 CMECs 分泌 NO 的作用机制

研究发现, 与对照组相比, RAPA (10⁰ nM) 可显著降低 CMECs 分泌 NO: 分别为 21.7± 2.9 μmol/L 和 36.3± 5.8 μmol/L, P<0.01, 图 6A)。SIM 100 μM 可显著增加空白对照组及采用 RAPA 预处理组 CMECs 分泌 NO 的水平: 分别为 SIM 组 46.7± 7.3 μmol/L 比对照组 36.3± 5.8 μmol/L, P<0.01。及 RAPA+SIM 组 35.1± 3.6 μmol/L 比 RAPA 组 21.7± 2.9 μmol/L, P<0.01。采用实时 PCR 对 eNOS 的水平进行检测, 结果提示: RAPA 可下调 CMECs 中 eNOS 的 mRNA 的表达(P<0.05, 图 6B)。反之, SIM 可上调其表达(P<0.05)。这一结果提示, SIM 可通过增加 eNOS 的水平, 进而增加 CMECs 基础水平及受 RAPA 处理后 NO 的水平。但是这两者的作用都可被 LY294002 50 μM 抑制。

3 讨论

目前研究表明, 所有用于治疗冠状动脉狭窄的介入手术都有再狭窄的可能^[3]。血管生物, 药理学以及生物工程学等领域的突飞猛进并没有解决再狭窄这一难题。导致这一问题主要的原因与药物洗脱支架的应用, 导致内皮细胞增殖和迁移受到抑制有关^[3,7]。所有形式的血管新生具备一些共同的特性, 包括内皮细胞的增殖和迁移等^[8]。并且, 这些现象受到很多促血管新生因子的调节。研究表明: SIM^[9]和瑞舒伐他汀^[10]有促进血管形成的作用。CMECs 的增殖是血管新生的关键步骤。已有研究指出, 普伐他汀可促进 CMECs 的增殖^[11]。并且, 他汀类药物具有抗内

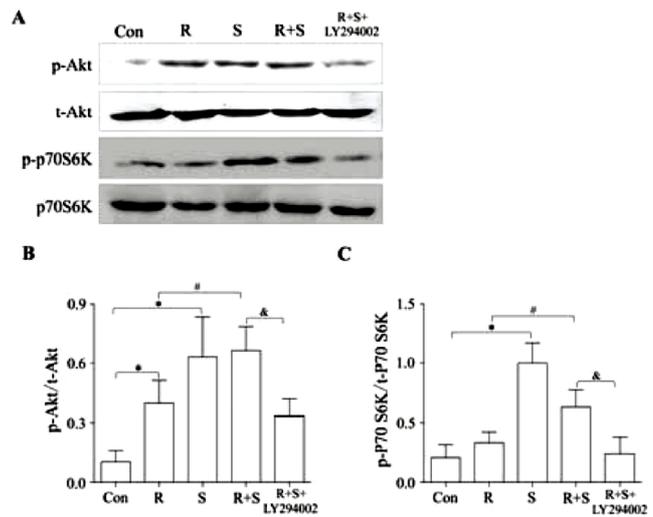


图 3 辛伐他汀呈级联方式诱导 CMECs 的 Akt 以及 P70 S6K 磷酸化。图 A 为 Akt 和 P70 S6K 磷酸化的水平代表图; 图 B 和 C 为蛋白水平定量分析; *P<0.05 为与对照组比较; #P<0.05 为与单用雷帕霉素组比较; &P<0.01 为雷帕霉素 10⁰ nM+ 辛伐他汀 10⁰ μM+LY294002 组比较。缩略词: Con, 对照组; S, 辛伐他汀; R, 雷帕霉素; LY, LY294002, 为 PI3K 特异性抑制剂。

Fig. 3 The effect of simvastatin induces phosphorylation of Akt and p70 S6K in a PI3K-dependent manner. (A) Representative blot. Quantitative densitometry data of pAkt (B) and p-p70 S6K (C). *P<0.01, vs. control, #P<0.05 vs. rapamycin alone group, &P<0.01 vs. rapamycin (10⁰ nM) and simvastatin (10⁰ μM) and LY294002 (50 μM) group. Abbreviations: Con, control; S, simvastatin; R, rapamycin; LY, LY294002, PI3K inhibitor.

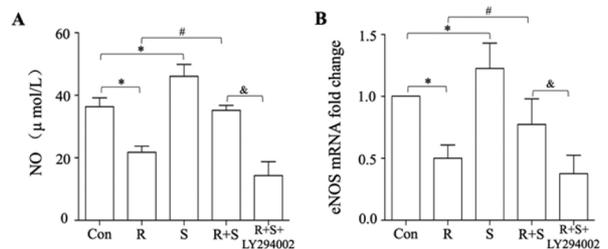


图 4 辛伐他汀对雷帕霉素处理后心肌微血管内皮细胞对 NO 释放和 eNOS 的表达的作用。各组 NO 水平(图 A); 各组 eNOS mRNA 的表达(图 B)。*P<0.05 为与对照组比较, #P<0.05 为与单用雷帕霉素组比较, &P<0.01 为雷帕霉素 100 nM+ 辛伐他汀 100 μM+LY294002 50 μM 组比较。缩略词: NO, 一氧化氮; eNOS, 一氧化氮合酶; Con, 对照组; S, 辛伐他汀; R, 雷帕霉素; LY, LY294002, 为 PI3K 特异性抑制剂。

Fig. 4 Effects of simvastatin on NO release and eNOS expression in rapamycin-induced CMECs. NO secretion (A). (B) eNOS mRNA data. *P<0.05, vs. control, #P<0.05 vs. rapamycin alone group, &P<0.01 vs. rapamycin (100 nM) and simvastatin (100 μM) and LY294002 (50 μM) group. Abbreviations: Con, control; S, simvastatin; R, rapamycin; LY, LY294002, Akt inhibitor.

皮祖细胞凋亡的作用^[12]。因此, 我们研究了是否 SIM 可促进 RAPA 作用下 CMECs 的增殖, 迁移和存活及其作用机制。

根据本实验的结果, 我们发现, 与前述研究^[11]一致, 低浓度(100 μM)的 SIM 可显著增加 CMECs 的增殖和迁移, 同时降低其凋亡率。反之, 更高浓度(101 μM)的 SIM 并没有对 CMECs

的改善作用出现相应的提高。进一步证实,治疗剂量他汀类药物可促进内皮细胞的增殖、迁移和存活^[13]。

研究指出,Akt 磷酸化可能有助于 CMECs 的存活,生长和迁移的功能^[5]。Akt 的激活可通过抑制细胞凋亡促进内皮细胞的存活^[14]并促进内源性 NO 的合成^[15]。mTOR 是 PI3K/Akt 信号通路重要的下游分子,其参与细胞生长和增殖的调节^[16],并对血管新生起重要的作用^[17]。研究证实,mTORc1 激活可导致 p70 S6K 的磷酸化,并且 RAPA 对其有抑制作用^[18]。而 PI3K/Akt/mTOR/p70 S6K 在细胞生长,增殖方面发挥主要的作用^[16]。但是,mTOR 信号通路在 RAPA 诱导的 CMECs 的损伤中的作用仍未有研究。为了证实 Akt 在 RAPA 诱导的 CMECs 的损伤中作用,我们采用 Western blotting 法检测了各组 CMECs 磷酸化的程度。本研究发现,SIM 不仅可激活 CMECs 中的 mTOR/p70 S6K 信号通路,并且,由于这种作用可完全被 LY294002 抑制,并部分受到 RAPA 的抑制。由此可得到这样的结论:SIM 促进内皮细胞的增殖,迁移和存活是通过 PI3K/Akt/mTOR/p70 S6K 信号通路,并呈级联方式调节这条通路的活性。

研究指出^[19],PI3K/Akt 信号通路参与 CMECs 分泌 NO 的过程。NO 是最重要的血管舒张因子^[20]。RAPA 对 NO 分泌的抑制作用有浓度依赖性^[6]。本实验结果指出:SIM 处理可增加 eNOS 的活性,因而介导 CMECs 分泌 NO 增加。这一作用可被 RAPA 及 LY294002 的作用抑制。表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与了 RAPA 损伤下 SIM 对 CMECs 的保护作用的机制之中,并与其 NO 分泌及 eNOS 的表达有关。

总之,目前研究表明:低浓度(100 μ M)的 SIM 可促进 CMECs 的增殖,迁移及存活。这一作用至少部分是通过 PI3K/Akt/mTOR/p70 S6K 信号通路实现的;SIM 对 mTOR/p70 S6K 的激活呈级联方式;并且低浓度(100 μ M)的 SIM 可促进 CMECs 对 NO 的释放。我们的研究提出这一可能:Akt/mTOR 信号通路可能在他汀类药物的多效性方面有重要的作用。

参考文献(References)

- [1] Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005, 25(7): 287-294
- [2] Fadini GP, Albiero M, Boscaro E, et al. Rosuvastatin stimulates clonogenic potential and anti-inflammatory properties of endothelial progenitor cells[J]. Cell biology international, 2010, 34(7): 709-715
- [3] Seedial SM, Ghosh S, Saunders RS, et al. Local drug delivery to prevent restenosis [J]. Journal of vascular surgery, 2013, 57 (5): 1403-1414
- [4] 谢晓波,王东娟,王晨,等.辛伐他汀对雷帕霉素作用下大鼠心肌微血管内皮细胞的影响[J].心脏杂志,2010,22(6): 846-851
Xie Xiao-bo, Wang Dong-juan, Wang Chen, et al. Effects of simvastatin on rapamycin-treated cardiac microvascular endothelial cells [J]. Chinese Heart Journal, 2010, 22(6): 846-851
- [5] Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, et al. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis[J]. Cell cycle, 2006,5(5): 512-518
- [6] Miriuka SG, Rao V, Peterson M, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death[J]. American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2006, 6(9): 2069-2079
- [7] Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization[J]. Circulation, 2007, 115(8): 2435-2441
- [8] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. Nature medicine, 2003, 9(6): 653-660
- [9] Shen W, Shi HM, Fan WH, et al. The effects of simvastatin on angiogenesis: studied by an original model of atherosclerosis and acute myocardial infarction in rabbit [J]. Molecular biology reports, 2011, 38(6): 3821-3828
- [10] Zhou J, Cheng M, Liao YH, et al. Rosuvastatin Enhances Angiogenesis via eNOS-Dependent Mobilization of Endothelial Progenitor Cells[J]. PloS one, 2013, 8(5): e63126
- [11] Katsumoto M, Shingu T, Kuwashima R, et al. Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, on vascular endothelial cells and angiogenesis [J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2005, 69(12): 1547-1555
- [12] Ruckerl D, Jenkins SJ, Laqtom NN, et al. Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo[J]. Blood, 2012, 120(6): 2307-2316
- [13] Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis[J]. Circulation, 2002, 105(6): 739-745
- [14] Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway [J]. The Journal of clinical investigation, 2001, 108 (3): 391-397
- [15] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation [J]. Nature, 1999, 399(1673): 601-605
- [16] Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway[J]. Current opinion in cell biology, 2005, 17(6): 596-603
- [17] Li W, Petrimpol M, Molle KD, et al. Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2 [J]. Circulation research, 2007, 100(1): 79-87
- [18] Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive[J]. Nature cell biology, 2004, 6(11): 1122-1128
- [19] Iantorno M, Chen H, Kim JA, et al. Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells [J]. American journal of physiology Endocrinology and metabolism, 2007, 292(3): E756-764
- [20] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology [J]. British journal of pharmacology, 2006, 147 (Suppl 1): S193-201