

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.03.006

文章编号: 1005-8982(2017)03-0027-07

## 瑞舒伐他汀抑制血管平滑肌细胞表型转化的机制研究

韩庆<sup>1</sup>, 沈德良<sup>2</sup>, 王勃<sup>2</sup>, 张金盈<sup>2</sup>

(1. 郑州大学附属郑州市中心医院 心血管内科, 河南 郑州 450007;

2. 郑州大学第一附属医院 心血管内科, 河南 郑州 450052)

**摘要:目的** 研究瑞舒伐他汀是否可以抑制大鼠主动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)表型转化及其机制。**方法** SD大鼠主动脉VSMCs原代细胞培养鉴定,取4~7代细胞用于实验。用不同浓度的瑞舒伐他汀干预VSMCs,Western blot检测各组标本中骨骼肌肌动蛋白(SM-actin)、平滑肌22α(SM-22α)、滑肌肌球蛋白重链(SM-MHC)、骨桥蛋白(OPN)的表达,噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况,划痕试验观察细胞迁移情况。通过免疫组织化学法(ICC)检测SM-actin的表达从而观察VSMC的形态。转染过表达KLF-4或空白对照质粒至离体培养的VSMCs中,用瑞舒伐他汀干预,并采用上述实验方法检测VSMCs表型转化情况。**结果** MTT结果显示,与对照组比较,瑞舒伐他汀组VSMCs增殖能力降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。划痕试验结果显示,与对照组比较,他汀组VSMCs迁移减少,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Western blot检测显示,与对照组比较,他汀组VSMCs中SM-22α、SM-MHC、OPN表达增多,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ICC结果显示,与对照组VSMCs的细胞形态比较,他汀组VSMCs形态变细、变长。转染KLF-4过表达质粒后,与对照组比较,转染KLF-4过表达质粒可以增加VSMCs的增殖和迁移,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),逆转他汀对VSMCs表型转化有抑制作用。**结论** 瑞舒伐他汀通过下调KLF-4,抑制大鼠主动脉VSMCs表型转化。

**关键词:** 动脉粥样硬化;瑞舒伐他汀;血管平滑肌细胞;表型转化

**中图分类号:** R543.31

**文献标识码:** A

## Rosuvastatin inhibits phenotype transformation of vascular smooth muscle cells by down-regulation of KLF-4

Qing Han<sup>1</sup>, De-liang Shen<sup>2</sup>, Bo Wang<sup>2</sup>, Jin-ying Zhang<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University,

Zhengzhou, Henan 450007, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated

Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**Abstract: Objective** To verify whether Rosuvastatin could inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotype switch by down-regulation of KLF-4. **Methods** The primary culture and identification of SD rat VSMCs were conducted, VSMCs in the 3rd to 5th passages were used for the following experiments. After treatment with different concentrations of Rosuvastatin, MTT was used to investigate the proliferative ability of VSMCs. Transwell chambers and wound healing were employed to test the migration ability of VSMCs. IHC was used to detect the expression of SM-actin and the morphological structure of VSMCs. Western blot was used to investigate the expressions of SM-actin, SM-MHC, SM-22α, osteopontin (OPN) and KLF-4 in VSMCs. After KLF-4 was transfected into VSMCs, the methods were used again to test the phenotype changes of the VSMCs. **Results** Compared with the control group, the migration and proliferation ability of the VSMCs were decreased in the Rosuvastatin group. The expressions of SM-actin, SM-22α and SM-MHC in the Rosuvastatin group were significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression of OPN also increased ( $P<0.05$ ). IHC showed the VSMCs in the Rosuvastatin group became thinner and longer than those of the control group. After KLF-4 was transfected into VSMCs, the proliferation and migration ability of the VSMCs increased ( $P<0.05$ ). Over-

expression of KLF-4 reversed the effect of Rosuvastatin on VSMCs phenotype transformation. **Conclusions**

Rosuvastatin inhibits VSMCs phenotype switch by down-regulation of KLF-4.

**Keywords:** atherosclerosis; Rosuvastatin; VSMCs; phenotype switch

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的增殖和迁移是动脉粥样硬化发展过程中重要的病理基础,也是造成支架植入术或冠状动脉搭桥术后冠状动脉再狭窄的重要原因<sup>[1]</sup>。最近有研究显示,血管平滑肌细胞在不同的分化阶段具有不同的细胞表型,不同表型之间的平滑肌细胞生理特性相差巨大,并且在外界因素发生变化时,VSMCs 不同表型之间可以相互转化<sup>[2]</sup>。正常血管中的 VSMCs 一般是已分化的收缩型平滑肌细胞,在血管受到损伤时,一些已分化的收缩型 VSMCs 可以去分化,成为分泌型细胞。收缩型 VSMCs 低增殖、低分泌,特异性表达骨骼肌肌动蛋白 (skeletal muscle actin, SM-actin)、平滑肌 22 $\alpha$  (smooth muscle 22 $\alpha$ , SM-22 $\alpha$ )、平滑肌球蛋白重链 (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC) 等具有标志意义的特征性蛋白,分泌型 VSMCs 增殖加快,细胞外基质分泌增加<sup>[3]</sup>,骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 等蛋白表达增多<sup>[4]</sup>。过去的实验结果显示,在粥样斑块中,收缩型 VSMCs 减少,分泌型 VSMCs 增多<sup>[5]</sup>。最近研究证实,动脉粥样硬化 SMCs 表型转化在动脉硬化的病理发展过程中具有重要的作用<sup>[6]</sup>。

他汀类药物通过降脂、改善内皮功能、减轻或消除炎症反应、抑制血管平滑肌增殖等作用延缓动脉粥样硬化的发生、发展<sup>[7-9]</sup>。瑞舒伐他汀可以显著减少低密度脂蛋白受体<sup>-1</sup>小鼠主动脉内粥样硬化斑块的面积,抑制高半胱氨酸 (Homocysteine, Hcy) 诱导的 VSMCs 表达 MMPs 等,破坏细胞外基质平衡的蛋白<sup>[10]</sup>。但是瑞舒伐他汀是否可以抑制 VSMCs 表型转化,以及其作用机制尚未探明。本实验通过用不同浓度的瑞舒伐他汀干预 VSMCs,观察瑞舒伐他汀对 VSMCs 表型转化及对 Kruppel 样因子 4 (Kruppel-like factor 4, KLF4) 表达的影响,再通过 VSMCs 中转染过表达 KLF-4 质粒,观察过表达 KLF-4 对 VSMCs 表型转化的影响,验证 KLF-4 是否参与他汀抑制 VSMCs 表型转化的过程。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体级 SD 大鼠,雌雄不

限,50 d 左右,体重 150~180 g 购自浙江省医学科学院实验动物中心)。

1.1.2 实验试剂 胎牛血清 (美国 Gibco 公司),瑞舒伐他汀 (美国 Sigma 公司),RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司),无内毒素质粒小、大提取试剂盒、脂质体 2000 均购自上海英骏公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (瑞士 Roche 公司),噻唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] (美国 Emresco 公司),兔或鼠抗兔 SM-actin、SM-22 $\alpha$ 、SM-MHC、OPN、KLF-4、 $\beta$ -actin 多克隆抗体均购自英国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗、异硫氰酸荧光素、异硫氰酸荧光素 fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 均购自美国 Jackson 公司,蛋白免疫印迹相关试剂 (江苏碧云天生物技术研究所)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 VSMC 原代细胞培养 采用组织贴块法培育大鼠胸主动脉 VSMCs,采用形态学观察和细胞免疫荧光检测 SMA,鉴定 VSMCs。通过 SMA 与 DAPI 核染的关系鉴定 VSMCs 的纯度,取第 3~5 代细胞用于后续实验。使用脂质体 Lipofectamine 2000 转染,转染时使用不含胎牛血清改良伊格尔培养基培养基,在转染 6 h 后改换含 10%胎牛血清的培养液继续培养 24 h,提取细胞中的总蛋白,通过 Western blot 检测 KLF-4 的表达鉴定转染效率。

1.2.2 实验分组 实验分两部分,第一部分用以验证瑞舒伐他汀是否可以抑制 KLF-4 的表达及 VSMCs 表型转化。VSMCs 分 4 组:对照组、1 $\mu$ mol/L 瑞舒伐他汀组、5 $\mu$ mol/L 瑞舒伐他汀组、20 $\mu$ mol/L 瑞舒伐他汀组 [瑞舒伐他汀用 0.1%二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解]。第二部分用以验证瑞舒伐他汀通过下调 KLF-4 抑制 VSMCs 表型转化。细胞分为 4 组:对照组、他汀组、过表达 KLF-4 组、他汀 + 过表达 KLF-4 组。

1.2.3 KLF-4 过表达质粒构建及转染 通过 Pubmed 查找 KLF-4 基因序列,引物根据 Genebank 中 KLF-4 mRNA 序列设计引物。正向引物:5'-CGCG GATCCATGAGCAGCCACCTGGCGAGTC-3';反向引物:5'-CCGCTCGAGTCATTAATAAATGCCTCCTCATG

TGT-3'。通过 Primestar 法进行聚合酶链反应扩增 *KLF-4* 基因片段,获得的 *KLF-4* 基因片段用 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外线观察目的条带,胶回收,靶基因恢复 *KLF-4* 和质粒 DNA 的 T4DNA 连接酶相同的酶切连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,涂板,筛选重组质粒,质粒提取后测序验证。将 VSMC 细胞接种至 6 孔板,生长至 50%~70%密度时,以脂质体 Lipofectamine 2000 分别转染 *KLF-4* 或空白对照各 100 pmol,24 h 后,提取总蛋白鉴定转染效率,进行后续试验。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达量** 转染过表达 *KLF-4* 的质粒或者空白质粒的 VSMCs 血清饥饿 24 h 同步化,用 1.2.2 中不同的瑞舒伐他汀干预,培养 48 h 后,提取各组细胞中总蛋白,二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法定量蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶每孔加入 30  $\mu$ l 样品,70 V 30 min 进行蛋白浓聚,110 V 2 h 进行凝胶电泳,并用孔径 0.45  $\mu$  m 聚偏氟乙烯膜 250 mA 100 min 进行转膜。转膜后常温下三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 tris buffered saline and tween 20, TBST) 洗膜 3 次,封闭 1 h 后,以 1:1 000 浓度加入兔 (鼠) 抗人 SM-actin 一抗 (或抗 SM-22 $\alpha$ 、SM-MHC、OPN、*KLF-4*、 $\beta$ -actin 一抗),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,常温下 TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 (鼠) 二抗孵育后增强化学发光法检测。柯达胶片暗室显影,Quantity one 软件分析。

**1.2.5 MTT 法检测 VSMCs 增殖** 转染过表达 *KLF-4* 的质粒或者空白质粒的 VSMCs 在 96 孔板中培养,血清饥饿 24 h 同步化之后,用 1.2.2 中不同浓度的瑞舒伐他汀干预,每组细胞设 3 个复孔,2 个不加细胞的空白孔。细胞在各自条件下培养 24、48 和 72 h。培养结束后,每孔加入 MTT 液 20  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 下继续孵育 4~6 h,小心弃去培养上清液,每孔加入 150  $\mu$ l DMSO 溶液,震荡 10 min,选择 492 nm 波长在酶联免疫检测仪测定各孔光密度 optical density, OD) 值并记录。以时间为横轴,吸光值为纵轴绘制各组 VSMCs 细胞生长曲线。

**1.2.6 细胞划痕实验检测 VSMCs 迁移** 转染过表达 *KLF-4* 的质粒或者空白质粒的 VSMCs 在 6 孔板中培养,血清饥饿 24 h 同步化之后,用 1.8 mmol/L 羟甲基脲作用 12 h 抑制细胞增殖,100  $\mu$ l 黄色枪头垂直孔板制造细胞划痕,吸掉细胞培养液,磷酸盐缓冲溶

液 phosphate buffer saline, PBS) 冲洗 3 次,用 1.2.2 中不同浓度的瑞舒伐他汀干预,在相应的培养条件下培养细胞,拍照记录 0、12、24、48 和 72 h 图片,Image pro plus 6.0 软件分析计算细胞迁移面积,并以迁移面积与原划痕面积比值来表示各组 VSMCs 迁移的多少。

**1.2.7 细胞免疫荧光法检测各组 SM-actin 在细胞中的分布及表达** VSMCs 按 1.2.2 中分组在 96 孔板中培养,同步化之后加入不同浓度的瑞舒伐他汀,培养 48 h 后, PBS 洗 3 遍,4%多聚甲醛固定,0.25% Triton X 100 穿破细胞膜,山羊血清室温封闭 1 h,加入稀释 250 倍的 anti-SMA 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 清洗 3 遍,加入结合有异硫氰酸荧光素的山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 遍,荧光显微镜拍照后图片用 Image pro plus 6.0 软件分析。

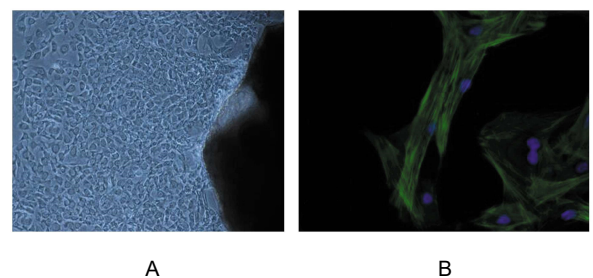
### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组均比较用单因素方差分析,若方差齐则两两比较用 LSD-*t* 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VSMCs 原代培养鉴定

组织贴块法培养 SD 大鼠胸主动脉 VSMCs, 8d 左右组织块周围有细胞爬出, 2 周左右细胞融合可传代。传代后细胞呈典型峰谷状排列生长, 用 SM-actin 细胞免疫荧光鉴定 VSMC, DAPI 核染后确定细胞纯度 >99%。见图 1。



A: VSMCs 从组织块周围爬出 (苏木精-伊红染色 $\times$ 100); B: 细胞免疫荧光鉴定 ( $\times$ 400)

图 1 VSMCs 原代培养鉴定

### 2.2 瑞舒伐他汀抑制 VSMCs 表型转化

**2.2.1 瑞舒伐他汀抑制 VSMCs 增殖和迁移** 不同浓度的瑞舒伐他汀处理 12 h 后, 各组 OD 值比较, 差异无统计学意义 ( $F=7.531, P=0.012$ )。与对照组比较, 24 h 后瑞舒伐他汀组 OD 值降低, 差异有统计

学意义  $F=7.513, P=0.012$ ), 并与瑞舒伐他汀的浓度呈正相关, 说明瑞舒伐他汀可抑制 VSMCs 的增殖。各干预因素处理 48 h 后, 与对照组比较, 瑞舒伐他汀组 VSMCs 的迁移面积减少, 差异有统计学意义  $F=15.682, P=0.001$ ), 并与瑞舒伐他汀的浓度呈正相关, 说明瑞舒伐他汀可抑制 VSMCs 的迁移。见图 2。

**2.2.2 瑞舒伐他汀抑制 VSMCs 形态变化** 不同浓度的瑞舒伐他汀处理 48 h 后, 各组平滑肌细胞中 SM-actin 荧光形态不同, 对照组中形态变圆, SM-actin 排列紊乱, 失去 VSMCs 原有的细胞形态。与对照组比较, 瑞舒伐他汀组中 VSMCs 细长呈梭形, SM-actin 排列整齐。见图 3。

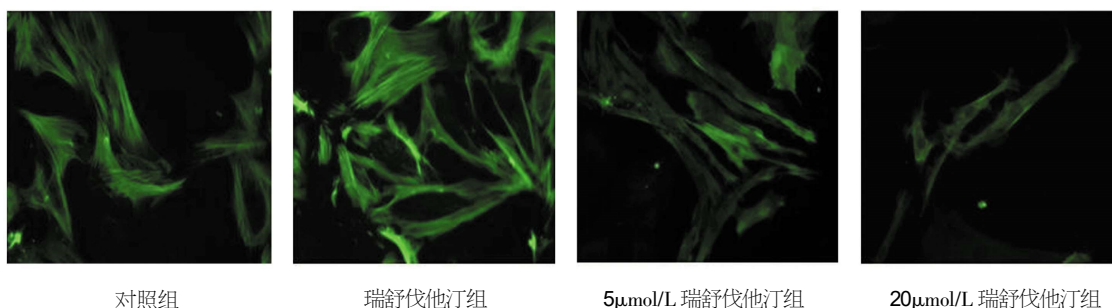
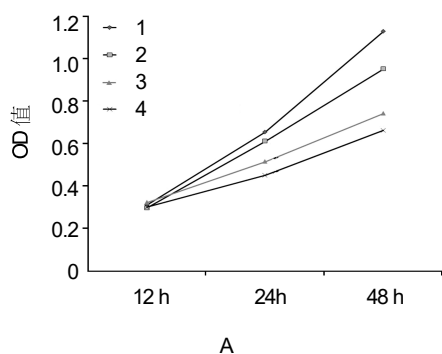
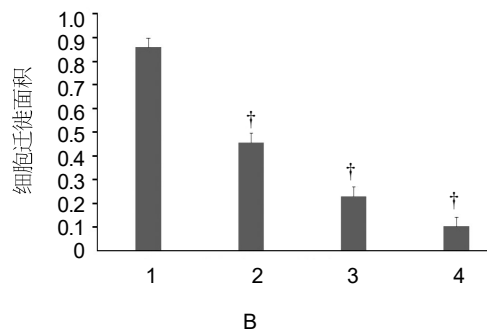
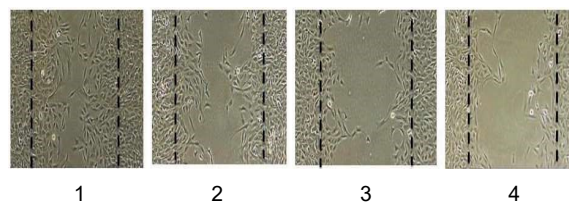


图 3 瑞舒伐他汀抑制 VSMCs 形态变化

对照组比较, 瑞舒伐他汀组 VSMCs 中 SM-22α 和 SM-MHC 表达增加, 差异有统计学意义  $F=18.917, P=0.000$ ), 并与瑞舒伐他汀的浓度呈正相关; OPN 和 KLF-4 的表达增加, 差异有统计学意义  $F=22.371, P=0.000$ 。见图 4。

**2.3 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 表型转化的抑制作用**

**2.3.1 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 增殖和迁移的抑制作用** 与空质粒对照组比较, 转染过表达 KLF-4 质粒组 VSMCs 中 KLF-4 的表达增加, 差异有统计学意义  $F=22.838, P=0.000$ 。与对照组比较, 瑞舒伐他汀组 OD 值降低, 差异有统计学意义  $F=9.436, P=0.002$ ); 转染过表达 KLF-4 质粒后, 与对照



1: 对照组; 2: 1 μmol/L 瑞舒伐他汀组; 3: 5 μmol/L 瑞舒伐他汀组; 4: 20 μmol/L 瑞舒伐他汀组

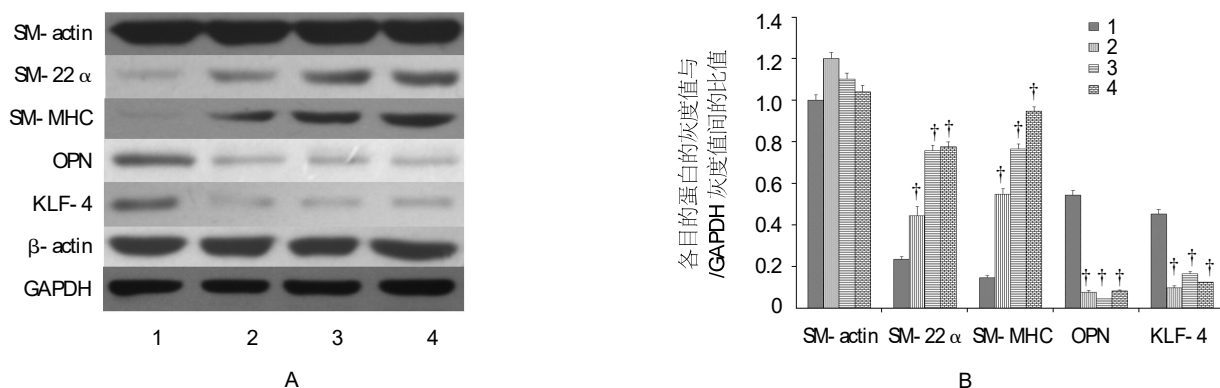
† 与对照组比较,  $P < 0.05$

图 2 瑞舒伐他汀抑制 VSMCs 增殖和迁移

**2.2.3 瑞舒伐他汀影响 VSMCs 内细胞表型相关蛋白及 KLF-4 的表达** 各组 VSMCs 中 SM-actin 表达量比较, 差异无统计学意义  $F=1.346, P=0.349$ 。与

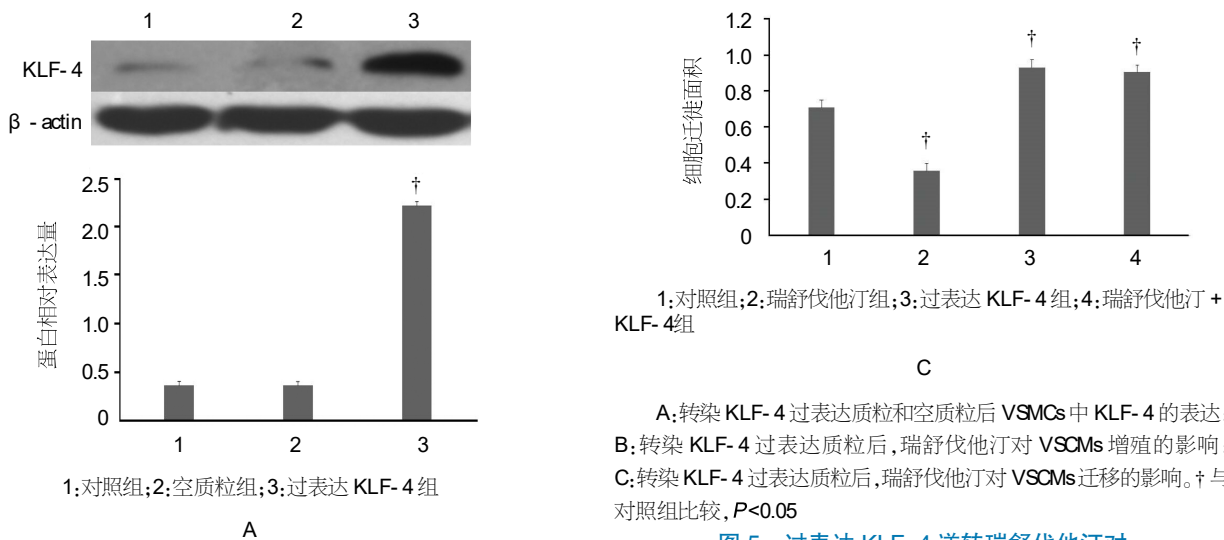
组比较, KLF-4 组、瑞舒伐他汀 + KLF-4 组的 OD 值升高, 差异有统计学意义  $F=33.562, P=0.000$ ), 说明过表达 KLF-4 可以增加 VSMCs 的增殖, 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 增殖的抑制的作用。与对照组比较, 瑞舒伐他汀组 VSMCs 迁移面积减少, 差异有统计学意义  $F=18.255, P=0.000$ ); 与对照组比较, KLF-4 过表达组和瑞舒伐他汀 + KLF-4 组 VSMCs 迁移面积增加, 差异有统计学意义  $F=22.938, P=0.000$ ), 说明过表达 KLF-4 可以增加 VSMCs 的迁移, 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 迁移的抑制作用。见图 5。

**2.3.2 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 形态变化的抑制作用** 与对照组比较, 瑞舒伐他汀组中 VSMCs 细长呈梭形, SM-actin 排列整齐。转染过表达



1:对照组;2:1μ mol/L 瑞舒伐他汀组;3:5μ mol/L 瑞舒伐他汀组;4:20μ mol/L 瑞舒伐他汀组。†与对照组比较, P<0.05

图 4 Western blot 检测各组 VSMCs 中 SM-actin、SM-22α、SM-MHC、OPN 及 KLF-4 的表达

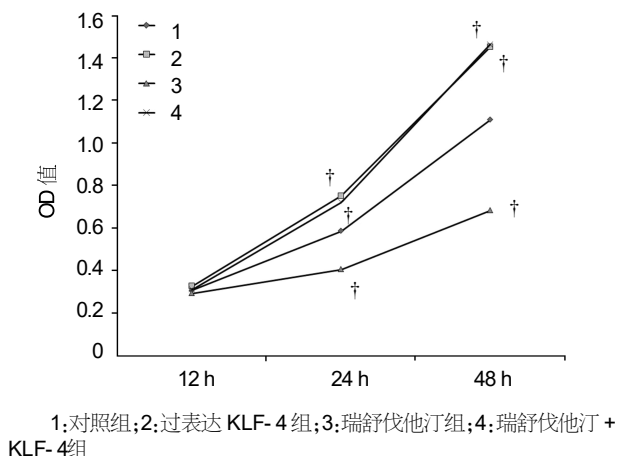


1:对照组;2:空质粒组;3:过表达 KLF-4 组

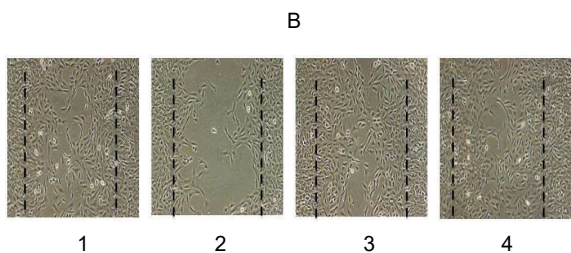
1:对照组;2:瑞舒伐他汀组;3:过表达 KLF-4 组;4:瑞舒伐他汀 + KLF-4组

A:转染 KLF-4 过表达质粒和空质粒后 VSMCs 中 KLF-4 的表达; B:转染 KLF-4 过表达质粒后,瑞舒伐他汀对 VSMCs 增殖的影响; C:转染 KLF-4 过表达质粒后,瑞舒伐他汀对 VSMCs 迁移的影响。†与对照组比较, P<0.05

图 5 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 增殖和迁移的抑制作用



1:对照组;2:过表达 KLF-4 组;3:瑞舒伐他汀组;4:瑞舒伐他汀 + KLF-4组



KLF-4 质粒后, KLF-4 组和瑞舒伐他汀 + KLF-4 组中 VSMCs 形态变圆, SM-actin 排列紊乱, 失去 VSMCs 原有的细胞形态, 说明过表达 KLF-4 可以导致 VSMCs 形态变圆, 逆转瑞舒伐他汀的作用。见图 6。

**2.3.3 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 内细胞表型相关蛋白的影响** 与对照组比较, 瑞舒伐他汀组 SM-MHC、SM22α 表达增加, 差异有统计学意义 ( $F=31.541, P=0.000$ ), OPN、KLF-4 表达减少, 差异有统计学意义 ( $F=35.518, P=0.000$ ); 转染过表达 KLF-4 质粒后, 与对照组比较, KLF-4 组、瑞舒伐他汀 + KLF-4 组的 SM-MHC、SM22α 表达减少, 差异有统计学意义 ( $F=5.784, P=0.032$ ), OPN 表达增加, 差异有统计学意义 ( $F=6.723, P=0.000$ ), 说明过表达 KLF-4 可以减少 SM-MHC、SM22α 的表达, 增加 OPN 的表达, 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 表型转化的抑制作用。见图 7。

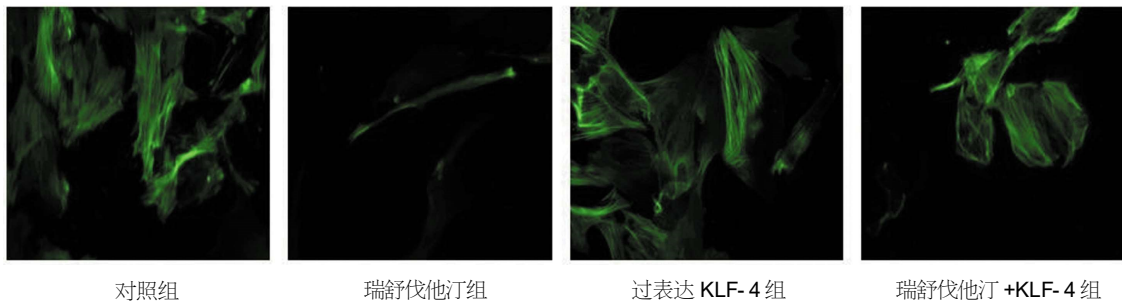
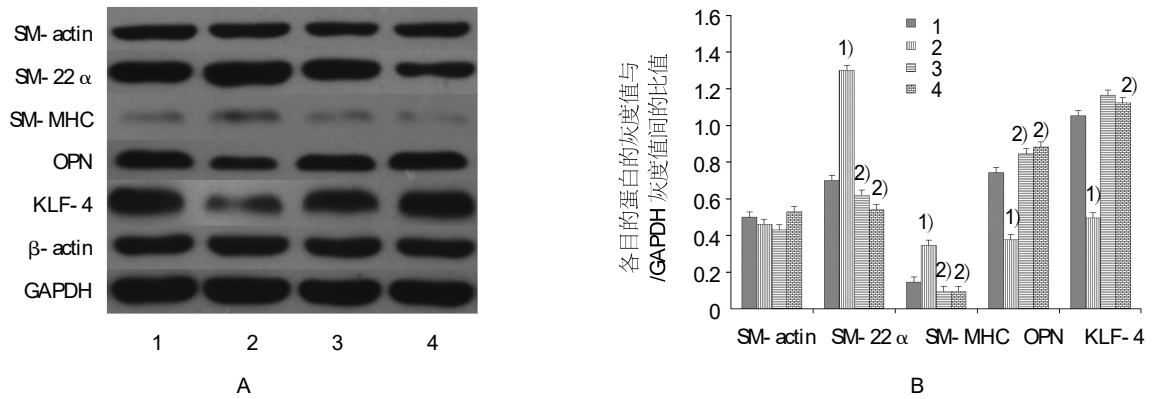


图 6 过表达 KLF-4 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 形态变化的抑制作用



1:对照组 2:瑞舒伐他汀组;3:过表达 KLF-4 组;4:瑞舒伐他汀 +KLF-4 组。† 与对照组比较,  $P < 0.05$

1) 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与瑞舒伐他汀组比较,  $P < 0.05$

图 7 Western blot 检测各组 VSMCs 中 SM-actin、SM-22α、SM-MHC、OPN 及 KLF-4 的表达

### 3 讨论

在不同的外界因素刺激下,VSMC 有不同的细胞表型,具有很强的可塑性。在正常血管中膜中,VSMCs 是一种高分化细胞,细胞形态呈梭形,主要起维持血管形状和收缩血管的作用,具有低增殖、迁移慢、蛋白分泌少等特征<sup>[9]</sup>。当发生动脉粥样硬化等血管疾病时,VSMCs 可以去分化为未分化的细胞,细胞形态变圆,收缩性能下降,表现出高增殖、高迁移、高蛋白分泌等特征<sup>[11]</sup>,在血管疾病的发生、发展中发挥重要的作用。

目前已经发现一大批特异性比较高,可以当作已分化成熟 VSMCs 标志的蛋白,如与细胞收缩密切相关的 SM-actin、SM-MHC、Calponin、SM22α、Smoothelin 等蛋白,以及参与细胞骨架构成的 H-caldesmon、Telokin、β-vinculin、Metavinculin、Desmin 等蛋白<sup>[9]</sup>。该蛋白在收缩型 VSMCs 中高表达,其表达量随着 VSMCs 的去分化而逐渐减少。相反,OPN、MMPs、糖基蛋白等在去分化的分泌型 VSMCs 中高表达,并且表达量跟细胞的去分化程度呈正相关<sup>[9]</sup>。因此结合 VSMCs 的增殖和迁移,再检测 SMα-actin、SM-MHC、

SM22α 及 OPN 等蛋白的表达,是近几年来国内外研究者常用的用来鉴别 VSMCs 不同细胞表型的方法。

瑞舒伐他汀是一种选择性羟甲基戊二酸甲酰辅酶 A 还原酶抑制剂,通过减少甲羟戊酸的生成,从而抑制胆固醇的合成,进而降低血清中低密度脂蛋白的水平。最近许多研究表明,他汀类药物的疗效不仅能用其降脂作用来解释,而且具有保护血管内皮细胞、抗氧化、抗炎、抗心肌重构等作用<sup>[12]</sup>。笔者的实验结果显示,瑞舒伐他汀可以抑制 VSMCs 的增殖和迁移,使 VSMCs 细胞形态呈细长的梭形,增加 SM-MHC、SM-22α 的表达,减少 OPN 在 VSMCs 中的表达,从而证实瑞舒伐他汀可以抑制 VSMCs 表型转化,这可能也是其抗动脉粥样硬化的机制之一。同时,笔者也发现瑞舒伐他汀可以抑制 VSMCs 中 KLF-4 的表达。

KLF-4 是一种真核锌指蛋白转录因子,在细胞增殖分化、血管生成和肿瘤转移进展等多种生理、病理过程中发挥重要作用。过去的研究显示,转化生长因子-α、血小板衍生生长因子 platelet-derived growth factor-BB、PDGF-BB、Hcy 等众多因素对 VSMCs 增殖有影响<sup>[13-16]</sup>。CHENG<sup>[17]</sup>和 DAVIS-DUSENBERY 等<sup>[18]</sup>

发现, microRNA-145 是通过抑制 KLF-4 而减少 VSMCs 的表型转化。与此同时, ZHENG 等<sup>[19]</sup>的实验结果显示, 在用 PDGF-BB 诱导 VSMCs 表型转化时, KLF-4 的表达升高, 抑制 KLF-4 的表达可以抑制 PDGF-BB 诱导 VSMCs 表型转化的作用。与上述研究结果相符, 笔者通过向 VSMCs 转染过表达 KLF-4 的质粒, 发现 KLF-4 可以促进 VSMCs 的增殖和迁移, 可以逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 表型转化的抑制作用。

本实验采用不同浓度的瑞舒伐他汀干预 VSMCs, 发现瑞舒伐他汀具有抑制 VSMCs 表型转化, 减少 KLF-4 表达的作用。之后通过进一步向 VSMCs 转染过表达 KLF-4 质粒, 发现过表达 KLF-4 可以促进 VSMCs 的增殖和迁移, 逆转瑞舒伐他汀对 VSMCs 表型转化的抑制作用, 最终证实瑞舒伐他汀是通过下调 KLF-4, 抑制 VSMCs 的表型转化。

#### 参 考 文 献:

- [1] ROTLLAN N, WANSCHER A C, FERNANDEZ-HERNANDO A, et al. Genetic evidence supports a major role for AKT1 in vsmcs during atherogenesis[J]. *Circ Res*, 2015, 116(11): 1744-1752.
- [2] OWENS G K, KUMAR M S, WAMHOFF B R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [3] ALEXANDER M R, OWENS G K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease[J]. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 13-40.
- [4] JIANG H, LUN Y, WU X, et al. Association between the hypomethylation of osteopontin and integrin beta3 promoters and vascular smooth muscle cell differentiation in great saphenous varicose veins[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18747-18761.
- [5] GOMEZ D, OWENS G K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2): 156-164.
- [6] CHISTIakov D A, OREKHOV A N, BOBRYshev Y V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, 214(1): 33-50.
- [7] KOHLI P, WATERS D D, NEMR R, et al. Risk of new-onset diabetes and cardiovascular risk reduction from high-dose statin therapy in pre-diabetics and non-pre-diabetics: an analysis from TNT and IDEAL[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(4): 402-404.
- [8] ROSENSON R S, KENT S T, BROWN T M, et al. Underutilization of high-intensity statin therapy after hospitalization for coronary heart disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(3): 270-277.
- [9] SHI Y F, CHI J F, TANG W L, et al. Effects of rosuvastatin on the production and activation of matrix metalloproteinase-2 and migration of cultured rat vascular smooth muscle cells induced by homocysteine[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2013, 14(8): 696-704.
- [10] 季军, 潘一峰, 何霞, 等. 超声靶向转染 c-myc 基因的反义肽核酸抑制兔髂动脉平滑肌细胞增生的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(2): 32-36.
- [11] LIU R, LESLIE K L, MARTIN K A. Epigenetic regulation of smooth muscle cell plasticity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 24(4): 567-579.
- [12] TOUSOULIS D, PSARROS C, DEMOSTHENOUS M, et al. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: the emerging role of statins[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(23): 2491-2502.
- [13] ZHENG B, HAN M, WEN J K. Role of Kruppel-like factor 4 in phenotypic switching and proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(2): 132-139.
- [14] YU K, ZHENG B, HAN M, et al. ATRA activates and PDGF-BB represses the SM22 alpha promoter through KLF4 binding to, or dissociating from, its cis-DNA elements[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90(3): 464-474.
- [15] SIVRITAS D, BECHER M U, EBRAHIMIAN T, et al. Antiproliferative effect of estrogen in vascular smooth muscle cells is mediated by Kruppel-like factor-4 and manganese superoxide dismutase[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(4): 563-575.
- [16] GARVEY S M, SINDEN D S, SCHOPPEE BORTZ P D, et al. Cyclosporine up-regulates Kruppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(1): 34-42.
- [17] CHENG Y, LIU X, YANG J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation[J]. *Circ Res*, 2009, 105(2): 158-166.
- [18] DAVIS-DUSENBERY B N, CHAN M C, RENO K E, et al. Down-regulation of Kruppel-like factor-4 (KLF4) by microRNA-143/145 is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein 4[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(32): 28097-28110.
- [19] ZHENG B, HAN M, BERNIER M, et al. Kruppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(34): 22773-22785.

(童颖丹 编辑)