



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2021.07.014

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.07.014

• 临床研究 •

辛伐他汀对烟雾暴露大鼠肺血管 Toll 样受体 4 表达及肺血管重塑的影响

熊玮 王萍 曾玉兰 周薇 彭红星 周月泉

[摘要] **目的** 探讨辛伐他汀对烟雾暴露大鼠肺血管 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达及肺血管重塑的影响。**方法** 将 30 只清洁级雄性健康 SD 大鼠随机分为正常对照组、烟雾暴露组及辛伐他汀干预组, 每组各 10 只。正常对照组大鼠吸入新鲜空气, 常规食物喂养。烟雾暴露组及辛伐他汀干预组大鼠均接受 8 周的烟雾暴露, 辛伐他汀干预组大鼠在暴露时间内行辛伐他汀鼻饲灌胃。造模结束后取 3 组大鼠的肺动脉和左主支气管标本, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肺血管形态学变化, 并测量各组大鼠肺血管管壁面积/血管总面积 (WA%)、血管壁厚度/血管外径 (WT%)。采用免疫组织化学染色法检测肺血管 TLR4 蛋白表达水平。采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肺血管 TLR4 mRNA 的表达水平。采用 *Pearson* 法分析 TLR4 与肺血管重塑的相关性。**结果** 烟雾暴露组和辛伐他汀组大鼠 WA%、WT%、肺动脉 TLR4 蛋白及 TLR4 mRNA 表达水平明显高于正常对照组, 辛伐他汀组大鼠 WA%、WT%、TLR4 蛋白及 TLR4 mRNA 表达水平明显低于烟雾暴露组 ($P < 0.05$)。*Pearson* 相关分析结果显示, TLR4 mRNA 与 WA%、WT% 均呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** 烟雾暴露可上调大鼠肺血管 TLR4 蛋白的表达水平, 诱导肺血管重塑; 而辛伐他汀药物干预能够降低其 TLR4 mRNA 的表达水平, 逆转肺血管重塑。

[关键词] 辛伐他汀; Toll 样受体 4; 肺血管重塑; 烟雾暴露

[中图分类号] R562.1

[文献标识码] A

Effects of simvastatin on Toll-like receptor 4 expression and pulmonary vascular remodeling in smoke-exposed rats Xiong Wei, Wang Ping, Zeng Yulan, Zhou Wei, Peng Hongxing, Zhou Yuequan. Department of Respiratory Medicine, Liyuan Hospital affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of simvastatin on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and pulmonary vascular remodeling in smoke exposure rats. **Methods** Thirty clean grade male healthy SD rats were randomly divided into normal control group, smoke exposure group and simvastatin intervention group, with 10 rats in each group. Rats in the normal control group inhaled fresh air and were fed with conventional food. Rats in smoke exposure group and simvastatin intervention group were exposed to smoke for 8 weeks. At the end of modeling, the pulmonary artery and left main bronchus specimens of the 3 groups were taken to observe the morphological changes of pulmonary vessels by hematoxylin-eosin (HE) staining method, and the pulmonary vascular wall area/total vascular area (WA%) and vascular wall thickness/vascular diameter (WT%) were measured. The expression of TLR4 protein in pulmonary vessels was detected by immunohistochemistry. The expression of TLR4 mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Pearson* method was used to analyze the correlation between TLR4 and pulmonary vascular remodeling. **Results** WA%, WT% and the expression levels of TLR4 protein and TLR4 mRNA in pulmonary artery in smoke exposure group and simvastatin group were significantly higher than those in normal control group, and WA%, WT% and the expression of TLR4 protein and TLR4 mRNA in simvastatin group were significantly lower than those in smoke exposure group ($P < 0.05$). *Pearson* correlation analysis showed that TLR4 mRNA was positively correlated with WA% and WT% ($P < 0.05$). **Conclusion** Smoke exposure can upregulate the expression level of TLR4 protein and induce pulmonary vascular remodeling. Simvastatin can reduce its expression level of TLR4 mRNA and reverse pulmonary vascular remodeling.

[Key words] Simvastatin; Toll-like receptor 4; Pulmonary vascular remodeling; Smoke exposure

基金项目: 华中科技大学自主创新基金资助项目 (2015QN027)

作者单位: 430077 武汉, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院呼吸内科

通讯作者: 王萍, E-mail: universeli@163.com

肺动脉高压是以出现右心衰竭或全心衰竭为特征的严重难治性疾病,而肺血管重塑引起压力性血流受阻是肺动脉高压的重要病理特征,也是其中心环节^[1]。吸烟是公认的严重社会危害行为,烟草烟雾中的尼古丁等多种生物碱及含硫化合物不仅可诱发肺癌,引起慢性支气管炎或哮喘急性发作,还可诱发肺血管重塑。Toll 样受体 (TLR) 4/核因子 (NF)- κ B 信号通路参与血管平滑肌细胞增殖、血管内皮再生及新生血管的形成,在血管重塑中发挥重要作用^[2]。他汀类药物广泛用于调脂、稳定动脉斑块等,而其抗炎、抗平滑肌增殖、进而减轻血管周围炎症反应、扩张血管及降低血流阻力等作用近年来也得到广泛关注^[3-5]。目前他汀类药物已应用于肺动脉高压的治疗中且初见成效,但他汀类药物影响肺血管重塑的作用机制还需进一步探讨。近年来发现,免疫分子 TLR4 参与肺血管重塑,本研究通过对烟雾暴露建立的肺血管重塑大鼠模型进行药物干预治疗,观察他汀类药物对 TLR4 的表达及血管重塑的影响,以期为他汀类药物对肺动脉高压的治疗提供基础实验依据。

材料与方法

1. 材料:清洁级健康雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 190 ~ 210 g,由华中科技大学同济医学院附属梨园医院老年医学研究所动物实验室饲养。兔抗 TLR4 多克隆抗体试剂盒购自武汉谷歌生物公司,Trizol 试剂盒购自 Ambion 公司,Mix 试剂盒、M-MLV 逆转录酶试剂盒均购自 Invitrogen 公司, β -actin 引物由武汉谷歌生物公司合成。奥林巴斯光学显微镜购自日本奥林巴斯公司,实时定量聚合酶链反应 (PCR) 仪购自日本 TOYOBO 公司,N2 分光光度计购自上海精科,医学图文分析系统型号为 HMIAS-2000(武汉千屏影像公司)。

2. 方法

(1)实验分组和实验模型制备:将 SD 大鼠随机分为正常对照组、烟雾暴露组和辛伐他汀干预组,每组各 10 只。正常对照组大鼠吸入新鲜空气,常规食物喂养。烟雾暴露组和辛伐他汀组大鼠烟雾暴露方法如下:接受烟雾暴露的大鼠在暴露期间,转移于点燃香烟的烟雾暴露箱内,烟雾暴露箱体大小约为 105 cm \times 60 cm \times 50 cm,香烟每次 20 支,焦油含量 8 mg,用测氧仪监测箱体中的氧浓度(21%左右),根据氧浓度测量结果来决定通气孔的个数。烟雾暴露组大鼠每天烟雾暴露 2 次,每次 1 小时,两次暴露之间至少间隔 4 小时,暴露时间为 8 周;辛伐他汀干预组大鼠烟雾暴露方法和时间同烟雾暴露组,且在暴露时间内每日早上 9 时左右以 10 mg/kg 辛伐他汀鼻饲灌胃 1 次。

(2)病理标本制作:3 组大鼠均于第 8 周结束造模,用 1% 戊巴比妥钠(90 mg/kg)麻醉大鼠后,放血处死,迅速得到病理标本。取右肺动脉冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱,备存用于逆转录 (RT)-PCR 检测;取左主支气管,按常规步骤制成石蜡切片,用于苏木素-伊红 (HE) 染色及免疫组织化学染色。

(3)HE 染色:在光学显微镜下,观察各组大鼠标本肺血管及肺泡的病理变化情况。严格挑选出厚度约为 4 μ m 的切片进行 HE 染色,每张切片选取肺血管结构完整且直径为 50 ~ 200 μ m 的 5 支肺血管作为观察对象,采用医学图文分析系统测量血管的内径和外径,计算血管壁厚度、血管壁面积和血管总面积,并计算管壁面积/血管总面积 (WA%)、管壁厚度/血管外径 (WT%)。

(4)免疫组织化学染色法检测肺动脉 TLR4 的表达:实验采用 PV6000 二步法进行免疫组化染色,具体步骤如下:在光学显微镜下观察,选取厚度约 4 μ m 的病理切片,用于免疫组化。首先按照常规步骤脱蜡水化,经过酸化、修复,室温孵育后,加入兔抗 TLR4 多克隆抗体,在 4 $^{\circ}$ C 环境下过夜,再加 DAB 显色试剂显色,最后在光学显微镜下观察。每个视野下,随机选取直径约 100 ~ 200 μ m 动脉 5 支,每组随机选取 25 个视野。后采集图像,并测定每个视野下阳性细胞数量和总细胞数量,用彩色图文分析系统计算出平均积分吸光度值 (IA)。肺动脉阳性染色的判断标准:肺动脉壁上出现棕黄色颗粒。

(5)RT-PCR 检测肺动脉 TLR4 mRNA 的表达:取出预留冻存的肺动脉,按照 Trizol 试剂盒提供的步骤提取各组肺动脉总 RNA,取 1 μ g 的 RNA 逆转录为 cDNA (按逆转录试剂盒说明进行操作),提取 1 μ l 的 cDNA 用于实验,按试剂盒说明书取吸光度值为 1.8 ~ 2.0 的 cDNA 用于 PCR 扩增反应。TLR4 上游引物为 5'-TATCCAGAGCCGTTGGTGTATCT-3',下游引物为 3'-AATGAAGATGATGCCAGAGCG-5',扩增长度为 85 bp;内参 β -actin 上游引物为 5'-CGCTAACATCAAATGGGGTG-3',下游引物为 3'-TTGCTGACAATCTCTTGAGGGAG-5',扩增长度为 201 bp。TLR4 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,40 个循环;最后由计算机计算各组 Ct 值,采用 $\Delta\Delta$ Ct 进行相对定量分析。目的 mRNA 含量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

3. 统计学处理:应用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。采用 Pearson 法分析 TLR4 与肺血管重塑的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 组大鼠 WA%、WT% 比较:烟雾暴露组和辛伐他汀组大鼠 WA%、WT% 明显高于正常对照组,辛伐他汀组大鼠 WA%、WT% 明显低于烟雾暴露组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠 WA%、WT% 比较(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	WA%	WT%
正常对照组	35.16 ± 0.88	22.18 ± 1.22
辛伐他汀组	46.78 ± 0.91 ^a	40.45 ± 1.09 ^a
烟雾暴露组	69.85 ± 0.80 ^{ab}	63.58 ± 1.67 ^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与辛伐他汀组比较,^b $P < 0.05$

2.3 组大鼠肺血管典型 HE 染色结果:正常对照组大鼠肺泡相对完整,肺动脉管腔规则,管壁无明显增厚,血管周围炎性细胞较少;烟雾暴露组大鼠肺泡可见明显融合,肺动脉管壁可见锯齿状改变,管腔变形,血管周围炎性细胞增多;辛伐他汀组大鼠肺泡亦可见融合情况,但较烟雾暴露组减轻,肺动脉壁增厚及管腔变形情况有所改善,血管周围炎性细胞较烟雾暴露组少。见图 1。

3.3 组大鼠肺动脉 TLR4 蛋白表达水平比较:烟雾暴露组(0.54 ± 0.09)和辛伐他汀组(0.34 ± 0.07)肺动脉 TLR4 蛋白表达水平明显高于正常对照组(0.28 ± 0.09),辛伐他汀组 TLR4 蛋白表达水平明显低于烟雾暴露组($P < 0.05$)。

4.3 组大鼠肺动脉典型 TLR4 免疫组化染色结果:正常对照组大鼠肺动脉阳性染色较浅,烟雾暴露组大

鼠肺动脉阳性染色明显加深,辛伐他汀组大鼠肺动脉染色程度介于对照和烟雾暴露组之间。见图 2。

5.3 组大鼠肺动脉 TLR4 mRNA 表达水平比较:烟雾暴露组(3.81 ± 0.32)和辛伐他汀组(1.31 ± 0.23)大鼠肺动脉 TLR4 mRNA 表达水平明显高于正常对照组(1.00 ± 0.12),辛伐他汀组大鼠肺血管 TLR4 mRNA 表达水平明显低于烟雾暴露组($P < 0.05$)。

6. 相关分析结果:Pearson 相关分析结果显示,TLR4 mRNA 与 WA% ($r = 0.888$)、WT% ($r = 0.767$) 均呈正相关($P < 0.05$)。

讨 论

肺血管重塑过程也是血管慢性炎症过程,且肺血管重塑广泛参与慢性阻塞性肺疾病(COPD)、特发性肺间质纤维化(ITP)及其他慢性肺部炎症性疾病的病程^[6]。TLR4 是体内重要的免疫分子,在免疫反应、炎症损伤、脂质代谢之间发挥纽带作用,TLR4 活化后在血管慢性炎症方面发挥重要作用,且 TLR4/NF- κ B 信号通路参与肺血管增生或新生及冠状动脉硬化等血管性疾病的重要环节^[7-8]。前期实验结果已证实烟雾暴露会影响 TLR4 的表达,且 TLR4 的表达与肺血管重塑相关,具体机制可能与 TLR4/NF- κ B 信号通路活化后炎症因子释放增强,进而诱导血管平滑肌增生有关^[9]。广泛用于降脂、调脂稳定斑块的羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂除具有调脂作用外,在抗炎、抗血管增殖、诱导血管平滑肌凋亡等方面发挥重要作用^[10],已被用于肺动脉高压及动脉硬

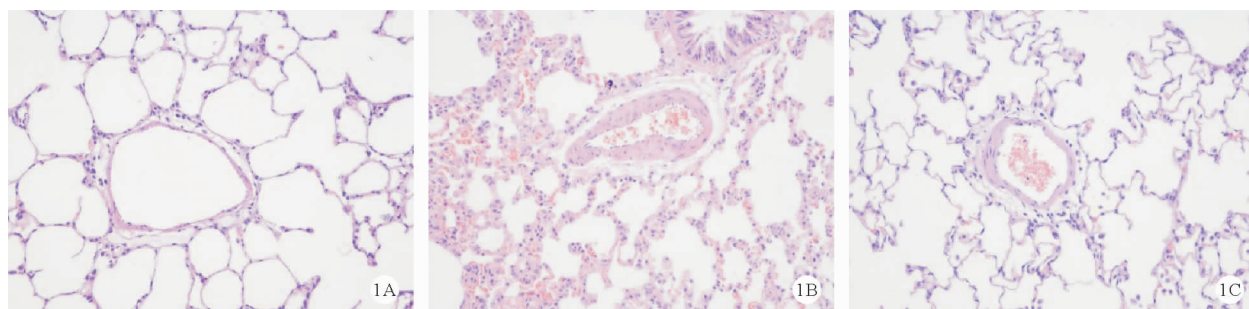


图 1 3 组大鼠肺血管 HE 染色结果(A:正常对照组;B:烟雾暴露组;C:辛伐他汀组;×200)

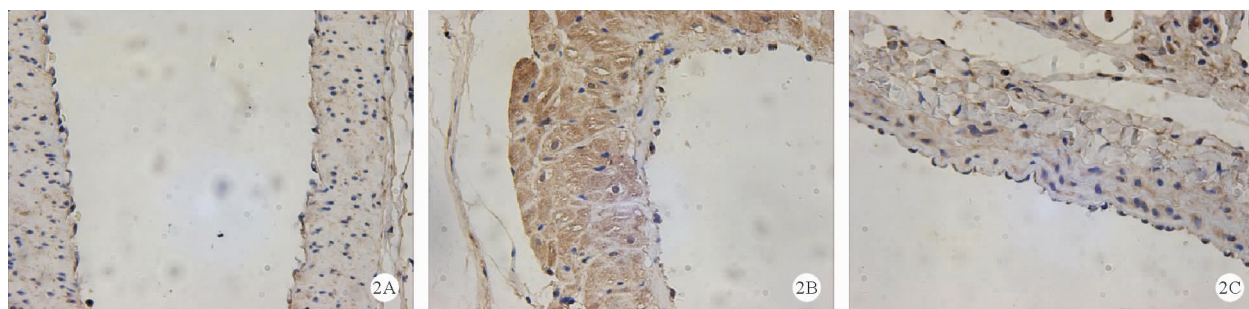


图 2 3 组大鼠肺动脉典型 TLR4 免疫组化染色结果(A:正常对照组;B:烟雾暴露组;C:辛伐他汀组;×200)

化的防治。辛伐他汀是第一代 HMG-CoA 还原酶抑制剂的代表药物,且已有助于肺动脉高压治疗的实例。尽管如此,辛伐他汀在肺动脉高压的治疗中仍处于初级阶段,对肺血管重塑的药理机制还不甚明确。因此本实验通过对烟雾暴露后发生肺血管重塑的大鼠模型加以辛伐他汀干预,观察其对血管的保护作用,并初步探讨其与近年来发现的 TLR4 是否关联。

缺氧缺血、大气污染、细菌或病毒感染等均可诱发肺血管炎症改变。本实验通过烟雾暴露制备肺血管炎症损伤模型,对大鼠口服辛伐他汀干预治疗,观察其肺血管重塑改变。2003 年 Nishimura 等^[11]提出他汀类药物可通过抗炎机制在减轻血管重塑中发挥作用;2011 年陈丹丹等^[12]对比格犬进行实验证实他汀类药物通过抑制比格犬白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子等炎症因子的释放减轻血管重塑,改善肺动脉高压,而本次实验结果发现,辛伐他汀干预治疗后,大鼠肺血管管壁增厚及变形情况有所减轻,且在光镜下观察发现血管周围炎症细胞数量明显减少,提示辛伐他汀对血管重塑有改善作用,且可能与减少炎症细胞浸润有关。本实验结果与上述研究结果一致,证实辛伐他汀在烟雾暴露大鼠肺血管重塑治疗中,发挥了一定作用。

他汀类药物在干预血管炎症方面的作用已成为研究热点。目前已有动物实验结果证实他汀类药物对 TLR4 有调节作用。许旭光等^[13]通过对大鼠鼻饲辛伐他汀后,检测到 TLR4 蛋白表达水平受到抑制,大鼠动脉硬化程度减轻,且 TLR4 蛋白表达水平与辛伐他汀的浓度有关,其机制可能与辛伐他汀抑制氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)-TLR4 信号通路,从而引起下游的肿瘤坏死因子等释放减少有关;李悦妍等^[14]通过动物实验证实阿托伐他汀能够改善动脉粥样硬化程度,可能与下调 TLR4 表达引起单核细胞趋化蛋白(MCP-1)和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)等炎症因子的表达有关,且 TLR4 蛋白表达水平与他汀类药物的剂量有关。本研究发现,经辛伐他汀干预后,大鼠肺血管形态有改善,且周围的炎症渗出减轻,检测到 TLR4 蛋白表达水平下降,PCR 结果证实 TLR4 mRNA 表达水平在辛伐他汀干预后明显下降,与血管重塑程度呈正相关,初步提示辛伐他汀有抑制 TLR4 蛋白表达、减轻炎症反应的作用。而我们前期实验结果证实,TLR4/NF- κ B 参

与血管平滑肌增殖,诱导血管重塑,因此初步推测辛伐他汀对血管重塑的改善作用可能与 TLR4/NF- κ B 活化被抑制、炎症反应被有效减轻有关。

综上所述,辛伐他汀在烟雾暴露后的大鼠肺血管重塑中能够有效改善血管炎症反应,减轻血管重塑,其机制可能与引起 TLR4 蛋白表达水平下降有关。而辛伐他汀影响 TLR4 下游哪些炎症因子的表达及是否还有其他的作用途径还需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] 刘琳,袁国航,吴瑶瑶,等. 微小 RNA-23a 在大鼠肺动脉高压发病机制中的作用[J]. 临床内科杂志,2019,36(1):55-57.
- [2] Budulac SE, Boezen HM, Hiemstra PS, et al. Toll-like receptor polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS One,2012,7(8):e43124.
- [3] Chen W, Smmaini S, Mitra S, et al. Critical role for integrin- β 4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2012,303(4):L279-285.
- [4] 张伟华,陆慰萱,刘春萍. 辛伐他汀和他达拉非对野百合碱致肺动脉高压大鼠肺血管重塑的影响[J]. 中国结核和呼吸杂志,2009,32(12):952-954.
- [5] 王晓芸,张懿,孙朝荣,等. 不同剂量辛伐他汀对急性缺血性脑卒中患者血清微小 RNA-182 和微小 RNA-497 水平及预后的影响[J]. 中国医药,2020,15(11):1719-1722.
- [6] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity:update on Toll-like receptors[J]. Nature Immunol,2010,11(5):373-384.
- [7] 郑晓云,刘先哲. Toll 样受体 4 对动脉粥样硬化发生发展的研究进展[J]. 生命科学,2012,24(10):1174-1178.
- [8] Seneviratne AN, Sivaqurunathan B, Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta,2012,413(1):3-14.
- [9] 王萍,曾玉兰,熊玮,等. TLR4/NF- κ B 在烟雾暴露大鼠肺血管重塑中的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(11):2083-2087.
- [10] Hot A, Lavocat F, Lenief V, et al. Simvastatin inhibits the pro-inflammatory and pro-thrombotic effects of IL-17 and TNF-alpha on endothelial cells[J]. Ann Rheum Dis,2013,72(5):754-760.
- [11] Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, et al. Simvastatin Rescues Rats From Fatal Pulmonary Hypertension by Inducing Apoptosis of Neointimal Smooth Muscle Cells[J]. Circulation,2003,108(13):1640-1645.
- [12] 陈丹丹,钱菊英,陈发东,等. 阿托伐他汀逆转早期野百合碱诱导肺动脉高压机制[J]. 中国分子心脏病学杂志,2011,11(1):26-31.
- [13] 许旭光,张延斌,孔刘莎. 辛伐他汀通过抑制 TLR4 信号通路调节血管平滑肌细胞炎症因子的表达[J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(12):1220-1224.
- [14] 李悦妍,金玉庆,苗伟,等. 阿托伐他汀对冠状动脉粥样硬化模型兔 Toll 样受体 4 及下游信号表达的影响[J]. 山东大学学报,2014,52(6):1-6.

(收稿日期:2020-11-18)

(本文编辑:余晓曼)