

# 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

许旭光<sup>1</sup>, 张延斌<sup>1</sup>, 孔刘莎<sup>2</sup>, 王诚<sup>1</sup>

(1. 徐州医学院附属医院心内科; 2. 徐州医学院附属医院肾内科, 江苏省徐州市 221002)

[关键词] 辛伐他汀; 氧化型低密度脂蛋白; Toll 样受体 4; 血管平滑肌细胞; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子  $\alpha$

[摘要] **目的** 通过检测血管平滑肌细胞(VSMC)炎症因子白细胞介素 6 (IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及相关炎症信号分子的表达,探讨辛伐他汀在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 VSMC 炎症反应中的作用和机制。**方法** 体外培养大鼠 VSMC,经 Toll 样受体 4(TLR4)阻断剂抗 TLR4 抗体及辛伐他汀预处理,使用 ox-LDL 进行干预,用逆转录聚合酶链反应检测 TLR4 mRNA 的表达,通过酶联免疫吸附法检测细胞培养上清液中炎症因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的水平。**结果** ox-LDL 可以增加 VSMC 对 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达,预先经 TLR4 阻断剂干预后,IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达明显下调,与未阻断剂组相比,差异皆有统计学意义( $P < 0.01$ );不同浓度的辛伐他汀可以剂量依赖性的抑制 TLR4 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),同时也可以剂量依赖性的抑制 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达( $P < 0.05$ );预先经 TLR4 阻断剂干预后,辛伐他汀可以显著地抑制 TLR4 mRNA、IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达,与辛伐他汀组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论** 辛伐他汀对 ox-LDL 诱导的 VSMC 炎症因子的表达具有抑制作用,可以通过抑制 TLR4 的表达,进而抑制 ox-LDL-TLR4 信号通路而发挥作用。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

## Simvastatin Regulate the Expressions of Inflammatory Factors by Inhibiting the Activation of TLR4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells

XU Xu-Guang<sup>1</sup>, ZHANG Yan-Bin<sup>1</sup>, KONG Liu-Sha<sup>2</sup>, and WANG Cheng<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

[KEY WORDS] Simvastatin; Oxidized Low Density Lipoprotein; Toll Like Receptor 4; Vascular Smooth Muscle Cells; Interleukin-6; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of simvastatin on the expressions of inflammatory factors in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

**Methods** The rat VSMC were cultured in vitro. Through pretreatment with anti-TLR4 antibody and simvastatin prior to ox-LDL exposure, the expression of TLR4 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in supernatant medium were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results** Incubation of VSMC with ox-LDL could enhance the expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$ . The expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  were attenuated by pretreatment with anti-TLR4 antibody prior to ox-LDL exposure in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Different concentrations of simvastatin dramatically reduce the expression of TLR4 mRNA ( $P < 0.01$ ), the effect was concentration-dependent, at the same time, the expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  were attenuated by simvastatin in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Simvastatin dramatically reduced the expressions of TLR4 mRNA, IL-6 and TNF- $\alpha$  by pretreatment with anti-TLR4 antibody prior to ox-LDL exposure compared to the Simvastatin group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions** Simvastatin could reduce the expressions of inflammatory factors in VSMC induced by ox-LDL, the mechanism may be by inhibiting the activation of TLR4 signaling.

[收稿日期] 2014-02-14

[作者简介] 许旭光, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail 为 xxg216@163.com。通讯作者张延斌, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的基础与临床, E-mail 为 zhangyanbin99@sina.com。

他汀类药物作为一类三羟基三甲基戊二酰辅酶 A 抑制剂,除了调脂作用以外,可以通过多条途径发挥抗炎、抗氧化等作用,但确切机制还不十分清楚<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在这一炎症过程中起着十分重要的作用<sup>[2]</sup>。Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 是重要的模式识别受体,是免疫反应、慢性炎症和脂代谢紊乱间的桥梁,激活 TLR4 可引起慢性炎症反应,参与 As 的形成<sup>[3]</sup>。我们前期的实验已经证实 ox-LDL 可以通过启动血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)表面的 TLR4 信号通路,调节炎症因子的表达<sup>[4]</sup>。本研究通过观察辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的影响,并使用 TLR4 阻断剂抗 TLR4 抗体中和 TLR4 的表达,探讨 TLR4 信号通路在辛伐他汀抗炎过程中的作用,为辛伐他汀防治 As 提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与试剂

SD 大鼠,雄性,体重 150~200 g,由徐州医学院实验动物中心提供;RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司)、Trizol(美国 Invitrogen 公司);PCR 引物(上海生工生物工程公司);ox-LDL(协和医科大学生物化学教研室,以 DMEM 培养基配成 500 mg/L 母液);TLR4 阻断剂抗 TLR4 抗体 (HTA125, 英国 Abcam);辛伐他汀(纯度 98.9%,南京德宝生化器材有限公司);IL-6 及 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

### 1.2 血管平滑肌细胞原代培养

腹腔麻醉大鼠,在无菌操作下迅速取出主动脉,去除外膜及内膜,采用组织贴块法,以含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 孵育箱内培养。VSMC 鉴定采用相差显微镜和  $\alpha$ -actin 相关抗原免疫组化法。取 3~5 代细胞用于实验。

### 1.3 辛伐他汀的配制

辛伐他汀原料药 4.1857 mg 溶于 100  $\mu$ L 无水乙醇,再加入 150  $\mu$ L 氢氧化钠(0.1 mol/L),50℃ 温育 2 h 后,用盐酸调 pH 值至 7.0,加双蒸水至 1 mL,即得终浓度为 10 mmol/L 的储存液,0.22  $\mu$ m 滤器过滤后分装,-20℃ 保存备用,使用前取该溶液分别调整浓度至 0.1、1、10  $\mu$ mol/L。

### 1.4 实验分组与处理

VSMC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养至接近融合时,换用无血清培养基继续培养 24 h,然后将细胞按照下列要求分组干预:①空白对照组:不加干预措施原培养液继续培养 4 h 与 12 h;② ox-LDL 组:以 50 mg/L 的 ox-LDL 作用细胞 4 h 与 12 h;③不同浓度 TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组:提前 30 min 加入不同浓度的 TLR4 阻断剂(1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L),然后以 50 mg/L 的 ox-LDL 作用细胞 12 h;④辛伐他汀组:以 1  $\mu$ mol/L 的辛伐他汀作用细胞 4 h 与 12 h;⑤不同浓度辛伐他汀 + ox-LDL 组:提前 2 h 加入不同浓度的辛伐他汀(0.1、1、10  $\mu$ mol/L),然后以 50 mg/L 的 ox-LDL 作用细胞 4 h 与 12 h;⑥TLR4 阻断剂 + 辛伐他汀 + ox-LDL 组:提前 30 min 加入 TLR4 阻断剂,然后加入 1  $\mu$ mol/L 的辛伐他汀,2 h 后以 ox-LDL 作用细胞 12 h。以上各组于 4 h 后用 RT-PCR 检测 TLR4 mRNA 的表达,于 12 h 后收集细胞培养上清液用 ELISA 检测 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达。

### 1.5 总 RNA 提取与逆转录聚合酶链反应

将 ox-LDL 处理后的 VSMC,按 Trizol 试剂盒说明书的步骤依次加入 Trizol、氯仿、异丙醇,提取总 RNA。每组取 4  $\mu$ g 总 RNA 采用 Promega 公司一步法 Access RT-PCR 系统进行反应。TLR4 引物序列:正义链为 5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG TGG T-3';反义链为 5'-ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTT T-3';预计扩增长度为 356 bp。内参 GAPDH 引物序列:正义链为 5'-TCC GC C CCT TCC GCT GAT G-3';反义链为 5'-CAC GGA AGG CCA TGC CAG TGA-3';预计扩增长度为 340 bp。逆转录条件:48℃ 反转录反应 45 min;94℃ 预变性 2 min。扩增条件:95℃ 变性 45 s;54℃ 退火 45 s;72℃ 延伸 1 min;循环 35 次,然后 72℃ 延伸 2 min。取 2  $\mu$ L 产物在 2% 琼脂糖凝胶中,90 V 电泳 30 min,最后用凝胶成像系统记录,Image J 软件分析灰度值。

### 1.6 酶联免疫吸附法检测 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 的表达

按分组要求干预细胞至指定时间后,收集细胞培养上清液,参照 ELISA 检测试剂盒说明进行操作。准备好一抗包被的酶标板,将各浓度的标准品 100  $\mu$ L 依次加入孔内,同时一孔只加样品稀释液作为调零孔。每孔先加入样品稀释液 50  $\mu$ L,再加入待检样品 50  $\mu$ L,酶标板加上盖,于 37℃ 反应 2 h。反应后将酶标板内液体甩去,对着吸水纸拍几下。然后将二抗工作液按每孔 100  $\mu$ L 依次加入,于 37℃ 反应 2 h。洗涤 3 次后将准备好的 ABC 工作液

按每孔 100  $\mu\text{L}$  依次加入,于 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h。最后洗涤 3 次,每孔加 TMB 显色液 100  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应 20 min,每孔依次加入 TMB 终止液终止反应。以波长 450 nm 处测定吸光度(A)值,求出标准曲线,计算出样品含量。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验结果进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 TLR4 阻断剂对 ox-LDL 诱导 VSMCs 表达 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 的影响

提前 30 min 加入不同浓度的 TLR4 阻断剂(1 mg/L,5 mg/L,10 mg/L),然后用 50 mg/L 的 ox-LDL 培养 12 h,与单纯 ox-LDL(50 mg/L)组比较,IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达明显下降( $P < 0.05$ ),并且 TLR4 阻断剂的这种作用呈浓度依赖性( $P < 0.01$ )。表明 ox-LDL 可以通过 TLR4 信号途径诱导 VSMC 表达 IL-6 及 TNF- $\alpha$ (表 1)。

表 1. 不同浓度的 TLR4 阻断剂对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1. Effect of different concentration of inhibitor of TLR4 on the expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  induced by ox-LDL in VSMC( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分 组	IL-6 (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
空白对照组	102.5 $\pm$ 17.1	27.3 $\pm$ 6.3
ox-LDL 组	831.8 $\pm$ 127.6 <sup>a</sup>	196.2 $\pm$ 26.7 <sup>a</sup>
1 mg/L TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组	687.1 $\pm$ 85.8 <sup>b</sup>	166.7 $\pm$ 15.9 <sup>c</sup>
5 mg/L TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组	381.8 $\pm$ 97.0 <sup>d</sup>	90.7 $\pm$ 11.0 <sup>d</sup>
10 mg/L TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组	195.9 $\pm$ 19.8 <sup>f</sup>	74.4 $\pm$ 13.1 <sup>e</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 ox-LDL 组比较;d 为  $P < 0.01$ ,与 1 mg/L TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组比较;e 为  $P < 0.05$ ,f 为  $P < 0.01$ ,与 5 mg/L TLR4 阻断剂 + ox-LDL 组比较。

### 2.2 辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 TLR4 mRNA 的影响

随着给药浓度的增加,辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 TLR4 mRNA 的抑制作用逐渐增强,与 ox-LDL 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),并且辛伐他汀在 0.1 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,呈浓度依赖性的抑制作用( $P < 0.05$ );预先经 TLR4 阻断剂干

预后,辛伐他汀可以显著地抑制 TLR4 mRNA 的表达,与辛伐他汀组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );图 1 及表 2)。

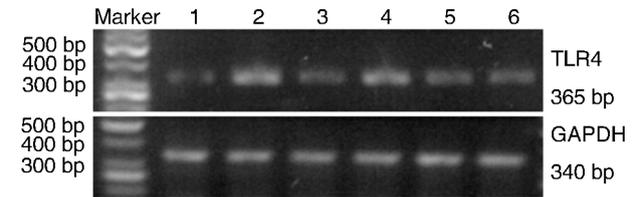


图 1. 不同浓度辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 TLR4 mRNA 的影响 1 为空白对照组;2 为 ox-LDL 组;3 为 5 mg/L TLR4 阻断剂 + 1  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组;4 为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组;5 为 1  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组;6 为 10  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组。

Figure 1. Effect of different concentration of simvastatin on expression of TLR4 mRNA induced by ox-LDL in VSMC

表 2. 不同浓度辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 TLR4 mRNA 相对值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2. Effect of different concentration of simvastatin on expression of TLR4 mRNA induced by ox-LDL in VSMC( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分 组	TLR4 mRNA
空白对照组	0.183 $\pm$ 0.012
ox-LDL 组	0.773 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>
5 mg/L TLR4 阻断剂 + 1 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀 + ox-LDL 组	0.292 $\pm$ 0.016 <sup>f</sup>
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀 + ox-LDL 组	0.691 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>
1 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀 + ox-LDL 组	0.510 $\pm$ 0.032 <sup>cd</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$ 辛伐他汀 + ox-LDL 组	0.426 $\pm$ 0.017 <sup>e</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 ox-LDL 组比较;d 为  $P < 0.01$ ,与 0.1  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组比较;e 为  $P < 0.05$ ,f 为  $P < 0.01$ ,与 1  $\mu\text{mol/L}$  辛伐他汀 + ox-LDL 组比较。

### 2.3 辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 的影响

不同浓度的辛伐他汀均可以明显地抑制 ox-LDL 诱导的 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达,分别与 ox-LDL 组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),并且辛伐他汀在 0.1 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,可以浓度依赖性的抑制 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达( $P < 0.05$ );预先经 TLR4 阻断剂干预后,辛伐他汀可以显著地抑制 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达,与辛伐他汀组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );表 3)。

表 3. 不同浓度的辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3. Effect of different concentration of simvastatin on the expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  induced by ox-LDL in VSMC( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分 组	IL-6(ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
空白对照组	104.7 $\pm$ 16.9	27.3 $\pm$ 6.3
ox-LDL 组	856.8 $\pm$ 103.7 <sup>a</sup>	196.2 $\pm$ 26.7 <sup>a</sup>
5 mg/L TLR4 阻断剂 + 1 $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组	170.4 $\pm$ 16.5 <sup>f</sup>	53.6 $\pm$ 7.9 <sup>f</sup>
0.1 $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组	671.1 $\pm$ 84.7 <sup>b</sup>	167.9 $\pm$ 8.1 <sup>b</sup>
1 $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组	330.2 $\pm$ 45.6 <sup>c</sup>	87.1 $\pm$ 11.6 <sup>c</sup>
10 $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组	220.0 $\pm$ 34.1 <sup>e</sup>	71.8 $\pm$ 9.6 <sup>d</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 ox-LDL 组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与 0.1  $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组比较; d 为  $P < 0.05$ , e 为  $P < 0.01$ , 与 1  $\mu$ mol/L 辛伐他汀 + ox-LDL 组比较。

### 3 讨 论

在 As 的发生和发展过程中, 物理损伤、炎症因子、缺血缺氧等因素导致细胞损伤是关键的始动环节, 在 As 的发病中发挥重要的作用。炎症参与了 As 的形成、斑块破裂、血栓形成等病理进程。IL-6 作为一种多功能的促炎细胞因子在这一进程中发挥着重要的作用, 研究表明 IL-6 是 As 发展的一个重要危险因素, 与传统危险因素相比, IL-6 能更有效的评价冠心病人的远期预后<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  是促炎反应的重要细胞因子, 可以由血管平滑肌细胞产生<sup>[6]</sup>, 能直接作用于血管内皮细胞, 最终导致血管内皮细胞损伤, 这可能是 TNF- $\alpha$  促进 As 发生、发展的一个途径<sup>[7]</sup>。

TLR4 是细胞表面识别病原相关分子模式的一个重要识别受体, 其在 As 免疫反应和慢性炎症的相互作用方面起着重要的作用, 逐渐成为研究 As 发病机制的热点领域<sup>[6]</sup>。TLR4 通过配体识别后介导的信号途径包括髓样分化蛋白 88 (MyD88) 依赖性和非依赖性 2 个途径, 最终引起促炎因子激活, 放大炎症效应, 导致多种炎症因子的瀑链式释放, 从而产生生物学损伤效应<sup>[8]</sup>。TLR4 在炎症反应中的表达变化对机体的炎症反应具有重要的调控作用, 因此可以作为抗炎药物治疗新的靶点。ox-LDL 由低密度脂蛋白在体内氧化形成, 可以诱导多种细胞产生炎症反应, 主要通过受体识别模式在 As 的发生和发展中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。我们的前期实验已经证实 ox-LDL 是 TLR4 的内源性配体, 可以通过启动

VSMC 表面的 ox-LDL-TLR4 信号通路, 从而调节炎症因子和细胞因子的表达<sup>[4]</sup>

他汀类药物作为一类调脂药物目前已被广泛应用于心血管事件的预防中, 如今他汀类药物的非降脂效应尤其是抗炎作用越来越受到心血管及其相关领域专家的关注, 其抗炎效应被认为在降低心血管事件发生率上扮演着极为重要的角色<sup>[10]</sup>。目前他汀类药物抑制炎症因子分泌的具体机制尚不完全清楚, 可能与他汀类药物直接下调血凝素样氧化型 LDL 受体 1<sup>[11]</sup>、抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)<sup>[12]</sup> 与核转录因子 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[13]</sup> 等有关。有研究表明他汀类药物可以在体内抑制高迁移率组蛋白 B1 上调的 TLR4 的表达, 从而抑制下游炎症信号的启动<sup>[14]</sup>。前期研究已经证实了 ox-LDL 能够提高 VSMC 表达 TLR4 mRNA<sup>[4]</sup>, 本实验中, 首先使用 TLR4 阻断剂抗 TLR4 抗体进行干预, 结果显示 TLR4 阻断剂可以浓度依赖性地抑制炎症因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达, 因为 TLR4 是通过配体识别受体模式发挥作用, 而 TLR4 阻断剂抗 TLR4 抗体正是通过这种形式起到阻断作用, 呈浓度依赖性地抑制 TLR4 发挥作用。我们用不同浓度的辛伐他汀预先干预细胞, 然后经 ox-LDL 处理后检测 TLR4 mRNA 的表达, 结果显示, 随着给药浓度的增加, 辛伐他汀对 ox-LDL 诱导 VSMC 表达 TLR4 mRNA 的抑制作用逐渐增强, 并且辛伐他汀在 0.1 ~ 10  $\mu$ mol/L 浓度范围内, 可以浓度依赖性的发挥作用; 同时经 TLR4 阻断剂干预后, 可以增强辛伐他汀对 TLR4 mRNA 的抑制作用。在同样辛伐他汀干预条件下, 结果发现, 辛伐他汀可以浓度依赖性的抑制 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达, 而经 TLR4 阻断剂干预后, 辛伐他汀抑制炎症因子的作用较前增强。由此表明, 辛伐他汀可能是通过抑制 TLR4 的表达来抑制 ox-LDL 诱导的 VSMC 炎症因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达。由于本实验是建立在细胞水平上的, 对于更为复杂的整体水平生理功能的研究还需要进一步完善。

总之, 本实验发现, 辛伐他汀可能是通过抑制 TLR4 的表达, 进而抑制 ox-LDL-TLR4 信号通路而发挥调节 ox-LDL 诱导的 VSMC 炎症因子 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的表达, 这可能是他汀类药物起到抗炎和稳定斑块作用的机制之一, 从而发挥抗 As 的作用。

#### [参考文献]

- [1] Margaritis M, Lee R, Channon K, et al. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms

- and lessons from the recent clinical trials[J]. *Antonopoulos As*, 2012, 18(11): 1 519-530.
- [2] 田庆印,潘其兴. 氧化修饰脂蛋白与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1996, 4(2): 149-153.
- [3] Geng H, Wang A, Rong G, et al. The effects of ox-LDL in human atherosclerosis may be mediated in part via the toll-like receptor 4 pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 201-206.
- [4] 许旭光,徐斌,张延斌,等. TLR4/MAPK 信号途径在氧化型低密度脂蛋白诱导血管平滑肌细胞表达白细胞介素6中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(12): 997-1 001.
- [5] Rodondi N, Marques-Vidal P, Butler J, et al. Markers of atherosclerosis and inflammation for prediction of coronary heart disease in older adults[J]. *Am J Epidemiol*, 2010, 171(5): 540-549.
- [6] Liu N, Liu J, Ji Y, et al. C-reactive protein induces TNF-alpha secretion by p38 MAPK-TLR4 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Inflammation*, 2011, 34(4): 283-290.
- [7] 沈涛,朱玉萍,阮杨,等. 阿魏酸通过抑制核因子κB 信号途径降低肿瘤坏死因子α 诱导的人血管内皮细胞氧化应激及黏附分子表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(5): 385-390.
- [8] 尹卫国,肖建华. IRAK 家族在 TLR 介导的信号通路中的功能和意义[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(2): 109-115.
- [9] 张弛,黄靓,余美华,等. 褪黑素对 ox-LDL 所致巨噬细胞 TNF-α 释放及核因子κB 活性的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(1): 14-17.
- [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] Prochnau D, Rodel J, Prager K, et al. Induced expression of lectin-like oxidized ldl receptor-1 in vascular smooth muscle cells following Chlamydia pneumoniae infection and its down-regulation by fluvastatin[J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2010, 57(2): 147-55.
- [12] Chen W, Sammani S, Mitra S, et al. Critical role for integrin-beta4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(4): L279-285.
- [13] Li J, Li JJ, He JG, et al. Atorvastatin decreases C-reactive protein-induced inflammatory response in pulmonary artery smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB pathway[J]. *Cardiovasc Ther*, 2010, 28(1): 8-14.
- [14] Yang J, Huang C, Yang J, et al. Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation: a key role for TLR4/NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 345(1-2): 189-195.

(此文编辑 李小玲)