

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0401-04

• 实验研究 •

Irbesartan 对动脉粥样硬化血管细胞粘附分子 1 mRNA 表达的影响

孙艺红, 黄永麟, 张瑞英, 荆 珊

(哈尔滨医科大学附属第一医院心内科, 哈尔滨 150001)

[主题词] 动脉粥样硬化; 血管紧张素 E_1 血管细胞粘附分子 1; 拮抗剂, 受体

[摘要] 利用高脂饮食诱发兔动脉粥样硬化模型, 观察血管紧张素 E_1 型受体拮抗剂 Irbesartan 对早期动脉粥样硬化的影响。将纯种雄性日本大耳白兔 25 只随机分为三组: 对照组 8 只, 高胆固醇组 8 只和 Irbesartan 组 9 只。给予 1% 胆固醇饮食建立动脉粥样硬化模型并检测如下指标: ①测定血脂、血浆脂蛋白及血管紧张素 E_1 水平; ②测量动脉内膜最大厚度及内膜/中膜厚度比; ③RT-PCR、Northern Blot 检测组织中血管细胞粘附分子-1 表达水平。结果发现, 与对照组相比, Irbesartan 组和高胆固醇组总胆固醇和甘油三酯水平明显升高; Irbesartan 组主动脉内膜最大厚度及内膜/中膜厚度比较高胆固醇组明显降低 ($P < 0.05$); Irbesartan 明显降低主动脉组织中血管细胞粘附分子-1 在转录水平的表达 ($P < 0.05$)。结果提示, 血管紧张素 E_1 型受体拮抗剂 Irbesartan 通过抑制血管细胞粘附分子-1 的表达而延缓早期动脉粥样硬化病变进展。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Effects of Irbesartan on the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in a Rabbit model of Early Atherosclerosis

SUN Yi-Hong, HUANG Yong-Lin, ZHANG Rui-Ying, and JING Shan

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

MeSH Atherosclerosis; Angiotensin E_1 Vascular Cell Adhesion Molecule 1; Antagonist, Receptor

ABSTRACT **Aim** To evaluate the effect of angiotensin E_1 type 1 receptor antagonist Irbesartan on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in a rabbit model of high cholesterol diet induced atherosclerosis. **Methods** Twenty-five rabbits were divided into three groups: control group, high cholesterol group, Irbesartan group [50 mg/(kg·d)]. The later two groups received 1% cholesterol diet for 12 weeks to establish the early atherosclerosis model. Blood samples were collected for cholesterol assessment and angiotensin E_1 concentrations. The levels of expression of VCAM-1 mRNA were evaluated by RT-PCR and Northern Blot. **Results** There is no difference between the two high cholesterol groups, although the cholesterol level of these groups are much higher than control group. Rabbits received Irbesartan showed reduced intimal thickness and the ratio of aortic intimal thickness to medial thickness compared with high cholesterol group ($P < 0.05$). Irbesartan administration for 12 weeks caused a down-regulation in arterial expression of VCAM-1 normalized to GAPDH ($P < 0.05$). **Conclusion** Chronic Irbesartan treatment ameliorated the severity of the early atherosclerosis lesions, possibly because of the suppression of VCAM-1 mRNA expression.

单核细胞在血管内皮下聚集, 吞噬脂质形成泡沫细胞是早期动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的主要特征, 这一过程部分由内皮细胞和平滑肌细胞表达的血管细胞粘附分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 通过与其配体极晚期相关抗原相互作用而介导, VCAM-1 的表达受多种细胞因子和

炎症介质的影响^[1]。在 As 的发生过程中, 血管紧张素 E_1 (angiotensin E_1 , Ang E_1) 参与内皮细胞功能、单核细胞的激活及粘附、平滑肌细胞的增殖和迁移及低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的氧化等多个环节。在人的动脉粥样斑块及单核细胞中可以检测到血管紧张素转换酶和 Ang E_1 并且 Ang E_1 型受体 (angiotensin E_1 type 1 receptor, AT-1) 表达上调^[2], 提示 Ang E_1 与早期 As 血管炎症反应相关。此外, 以往的大量动物实验表明血管紧张素转换酶抑制剂能抑制 As 病变的发展, 甚至使病变消退^[3,4]。为进一步

[作者简介] 孙艺红, 女, 1972 年 7 月出生, 主治医师, 医学博士, 现从事心血管内科专业, 研究冠心病的发生机制及防治。黄永麟, 男, 1920 年 4 月出生, 教授, 博士研究生导师, 哈尔滨医科大学心血管病研究所所长, 主要研究方向为冠心病和心律失常的发生机制及治疗。

步探讨肾素-血管紧张素系统在 As 发生发展中的作用,应用新型 AT-1 受体拮抗剂 Irbesartan, 观察其对脂纹病变的形成及 VCAM-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

雄性日本大耳白兔 25 只, 体重 2~2.5 kg, 随机分为三组: 对照组 ($n=8$), 喂以普通饲料; ④高胆固醇组, 喂以含 1% 胆固醇的饲料; ④Irbesartan 组 ($n=9$), 喂以含 1% 胆固醇的饲料和 Irbesartan 50 mg/(kg·d)。12 周后处死动物。

1.2 标本处理

麻醉状态下, 剖开动物胸腔及腹腔, 剥离主动脉全长, 去除外膜的脂肪组织, 纵行剖开, 一半置于液氮中保存, 另一半置于 4% 中性甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色。经 CAMIAS007 真彩色图像分析系统(北京航空航天大学)测量内膜的最大厚度及内膜/中膜厚度比。

1.3 血脂及血浆脂蛋白测定

用酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 浓度, 并计算血浆低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 浓度。

1.4 血管紧张素 ①水平测定

血浆 Ang ①测定采用放射免疫法, 操作按试剂盒说明书(北京北方生物技术研究所)进行。

1.5 逆转录聚合酶链反应

总 RNA 提取按 TRIzol 试剂盒 (Gibco) 说明, 经 1% 琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性后, 260 nm 测定总 RNA 浓度。取 2 μ g 总 RNA 以 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 为引物, M-MLV (Superscript ① GIBCO-BRL) 为逆转录酶 (总体系 50 μ L, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 94 $^{\circ}$ C 10 min) 合成 cDNA, -80 $^{\circ}$ C 保存。取逆转录产物采用 PCR 合成目的基因, VCAM-1 引物序列为: 正链 5' GAACACTCT-TACCTGTGCACAGC 3', 负链 5' GCCATCCTCATAG-CAATTAAGGTGAG 3', GAPDH 引物序列为: 正链 5' GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT 3', 负链 5' TGC-CGAAGTGGTCGTGGATGACCT 3', 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 7 min, VCAM-1 为 32 个循环, GAPDH 为 28 个循环。取 PCR 产物 8 μ L 经 1.5% 琼脂糖电泳后经凝胶成像系统分析处理, 计算 VCAM-1/GAPDH 灰度比。

1.6 Northern Blot 分析

将总 RNA 经甲醛变性胶电泳后, 转移至尼龙膜上; 用随机引物法标记探针, 按试剂盒说明书操作, 将 [α^{32} P] dCTP 分别标记于 25 ng VCAM-1 探针和 GAPDH 探针, 纯化后将标记的探针煮沸变性 10 min, 加入预杂交液 (AMBION) 中, 65 $^{\circ}$ C 杂交 18 h。用 X 光片进行放射自显影, 附加增感屏, -70 $^{\circ}$ C 曝光 3 天。用光密度扫描仪扫描 X 光片, 以 OD_{VCAM-1}/OD_{GAPDH} 评价 VCAM-1 mRNA 的表达。

1.7 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料采用方差分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 各组间血脂水平比较

各组动物入选时各项血脂水平无显著性差异; 12 周后高胆固醇组和 Irbesartan 组 TC、TG 及 LDLC 水平较对照组明显升高 ($P < 0.001$), HDLC 略有降低, 但无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 1 (Table 1)。

表 1. 各组血脂水平 (mg/L) 比较

Table 1. The comparison of serum level of lipids in three groups

Groups	n	TC	TG	HDLC	LDLC
Control	8	0.57 \pm 0.05	0.78 \pm 0.04	0.38 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05
HC	8	12.73 \pm 1.16 ^a	1.37 \pm 0.67 ^a	0.22 \pm 0.02	9.68 \pm 0.47 ^a
Irbesartan	9	14.48 \pm 1.85 ^a	1.74 \pm 0.42 ^a	0.26 \pm 0.02	10.39 \pm 1.22 ^a

a: $P < 0.001$, compared with control group.

2.2 各组血浆血管紧张素 ①水平比较

12 周末, 高胆固醇组血浆 Ang ①水平与对照组比较无显著差异; Irbesartan 组血浆 Ang ①水平极度升高 ($P < 0.01$), 达正常的 2~3 倍 (表 2, Table 2)。

表 2. 各组血浆血管紧张素 ①水平比较

Table 2. The comparison of serum level of Ang ①

Groups	n	Level (μ g/L)
Control	8	3.21 \pm 0.24
HC	8	3.55 \pm 0.78
Irbesartan	9	7.10 \pm 0.99 ^a

a: $P < 0.01$, compared with HC group.

2.3 主动脉内膜厚度及内膜/中膜厚度比

光镜下, 对照组动脉壁完好, 内皮完整, 内弹力膜连续; 高胆固醇组动脉管壁弥漫性隆起, 内膜明显

增厚,有许多圆形或梭形核的泡沫细胞,细胞内和细胞间隙均有大量的脂质沉积;Irbesartan 组动脉内膜可见局限的粥样病变,斑块厚度较薄,内膜增厚不明显,泡沫细胞数较少,与高胆固醇组比较病变较轻(图 1, Figure 1)。高胆固醇组内膜/中膜厚度比较对照组明显增高;而 Irbesartan 组内膜厚度较高胆固醇组明显降低($P < 0.05$),内膜/中膜厚度比明显低于高胆固醇组($P < 0.05$),见表 3 (Table 3)。

表 3. 各组内膜厚度及内膜/中膜厚度比

Table 3. The comparison of the intimal thickness and the ratio of intima to media

Groups	n	Intimal thickness (μm)	Medial thickness (μm)	Ratio of intima to media
Control	8	15.1 \pm 4.2	324.5 \pm 66.3	0.05 \pm 0.008
HC	8	512.5 \pm 68.8	395.8 \pm 71.5	1.25 \pm 0.27
Irbesartan	9	310.0 \pm 64.5 ^{ab}	383.9 \pm 81.2 ^b	0.84 \pm 0.2 ^{ab}

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with HC group.

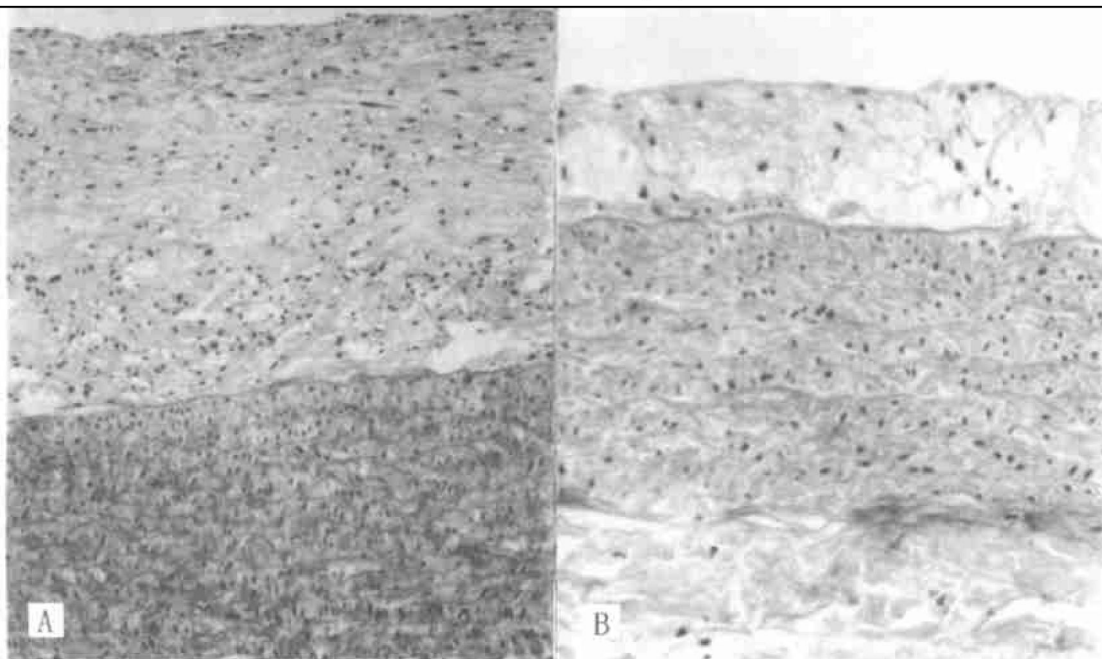


图 1. 高胆固醇组与 Irbesartan 组主动脉组织 HE 染色显微照片

Figure 1. Photomicrographs of the aorta section of rabbits with HE staining ($\times 200$). A: HC group; B: Irbesartan group.

2.4 Irbesartan 对血管细胞粘附分子 1 mRNA 表达的影响

经 1% 琼脂糖电泳可见清晰的 28 s、18 s rRNA, 证实 RNA 的完整性。各组间 GAPDH mRNA 的表达基本一致说明逆转录效果一致。Irbesartan 组灰度比值为 0.9 ± 0.35 ; 高胆固醇组灰度比值为 1.4 ± 0.51 , 两组间差异显著 ($P < 0.05$), 见图 2 (Figure 2)。Northern Blot 结果与 RT-PCR 结果一致 (图 3, Figure 3), Irbesartan 明显在转录水平抑制主动脉组织中 VCAM-1 的表达。

3 讨论

本研究结果显示, Irbesartan 不影响血浆 TC 和 TG 水平, 其抑制斑块形成的机制可能与阻断 Ang II 的作用及 VCAM-1 表达下调相关。

除循环中 Ang II 外, As 斑块处的内皮细胞、巨噬细胞及血管平滑肌细胞均可分泌 Ang II 并参与 As

病变的进展, 其机制包括: 激活 NADH/NADPH 氧化酶系统, 增加氧自由基的生成, 损伤内皮细胞; 增强巨噬细胞的趋化性, 使内膜中巨噬细胞源性泡沫细胞聚集; 促进巨噬细胞的脂质过氧化反应, 使体外培养的动脉内皮细胞氧化-LDL 受体 (LOX-1) 密度增加而促进巨噬细胞主动摄取 LDL, 增加泡沫细胞的体积^[6]。这些作用均通过 AT-1 受体及其相关的信号传导系统实现。因此, 无论 Ang II 的产生途径如何, Irbesartan 不可逆地与 AT-1 受体结合, 阻断了绝大多数 Ang II 的作用, 减少单核巨噬细胞的浸润和泡沫细胞的形成, 减少对 LDL 的摄取而抑制 As 进展。本研究中血浆 Ang II 水平较正常升高了 2~3 倍, 是 AT-1 受体被结合后负反馈引起血浆 Ang II 增多所致; 另一方面, 反馈性增高的 Ang II 与 AT-2 受体作用, 但 AT-2 受体的分布及功能还不十分清楚, 它在这一过程中的作用有待于进一步研究。此外, 过多的 Ang II 还可转化为血管紧张素-[1~7], 具有部分

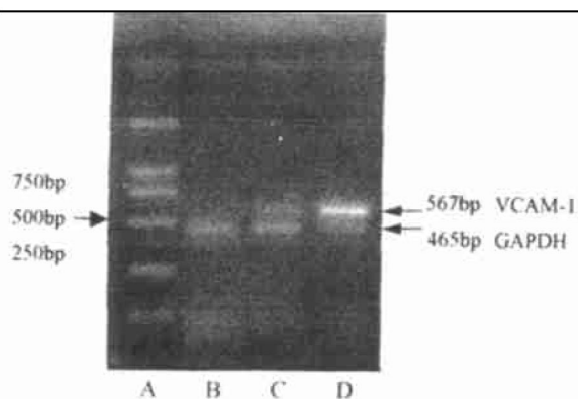


图2. RT-PCR 检测血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

Figure 2. Expression of VCAM-1 mRNA determined by RT-PCR. A: Marker; B: Control group; C: Irbesartan group; D: HC group.

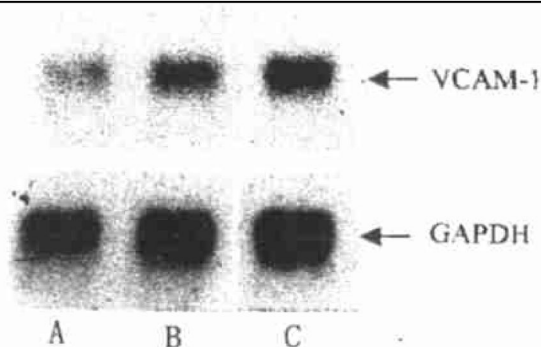


图3. Northern Blot 检测血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

Figure 3. Expression of VCAM-1 mRNA determined by Northern Blot. A: Control group; B: Irbesartan group; C: HC group.

拮抗 AT-1 受体的作用^[7]。

AT-1 拮抗剂 Irbesartan 能明显减轻主动脉内膜下泡沫细胞的聚集与 VCAM-1 表达的下调。Ang Ⅱ通过 AT-1 受体激活核转录因子(NF- κ B), 进而促进多种细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α 、IFN- γ)、趋化因子(MCP-1)和粘附分子的产生。VCAM-1 在 As 早期的表达与上述细胞因子和炎症介质均有关系。Tummala 等^[8]给大鼠静脉注射 Ang Ⅱ 6 天后主动脉组织 VCAM-1 mRNA 及蛋白质的表达明显增加, 而应用 Losartan 或 NF- κ B 抑制剂则阻断了 Ang Ⅱ诱导 VCAM-1 的表达, 说明 Ang Ⅱ通过激活 NF- κ B 在 VCAM-1 转录调节中发挥重要作用。本实验结果表明, Irbesartan 抑制了 Ang Ⅱ刺激的主动脉组织中 VCAM-1 表达, 减少单核细胞浸润和泡沫细胞的形成。此外, Strawn 等^[9]在对灵长类动物的高脂模型研究中发现, Losartan 在不影响血压、心率和血脂的情况下, 减少主动脉斑块面积及 LDL 氧化。与本研究结果相符, 虽然该研究中可溶性 VCAM-1 并未因 Losartan 下降, 但中止 Losartan 后可溶性 VCMA-1 和

E-sel 水平极度上升, 说明 AT-1 受体拮抗剂抑制了粘附分子的产生。

许多临床研究也证实了 RAS 系统在 As 中的作用。Navalkar 等^[10]应用 ELISA 测定 33 例正常血压的稳定型心绞痛患者血浆可溶性 VCAM-1 水平发现, 服用 Irbesartan 28 周使其下降 36%, 说明 Irbesartan 能降低血浆炎症标志物的水平从而延缓 As 进程。由于 VCAM-1 在单核细胞与内皮细胞粘附中的重要作用, 本研究结果表明 RAS 系统的致 As 作用与 Ang Ⅱ介导的血管炎症基因的表达相关, 而 AT-1 受体拮抗剂 Irbesartan 通过抑制 VCAM-1 在转录水平的表达, 而具有防治早期 As 病变的作用。

参考文献

- [1] Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherosclerosis [J]. *Am J Med*, 1999, **107**: 85-97
- [2] Yang BC, Ian Phillips M, Mhuczy D, et al. Increased angiotensin Ⅱ type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1433-439
- [3] Song Keifu, Naotaka Shiota, Sinji Takai, et al. Induction of angiotensin converting enzyme and angiotensin receptors in the atherosclerotic aorta of high cholesterol fed Cynomolgus Monkeys [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **138**: 171-182
- [4] Kowala MC, Recce R, Beyer S, et al. Regression of early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters induced by fosinopril and captopril [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1995, **25**: 179-186
- [5] Joachim Fruebis, Virginia Gonzalez, Mercedes Silvestre, et al. Effect of Probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (7): 1289-301
- [6] Rosario Scalia, James ZA, Allan ML. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit Role of P-Selectin, ICAM-1, and VCAM-1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1093-100
- [7] Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA, et al. Angiotensin(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury [J]. *Hypertension*, 1999, **33**: 207-211
- [8] Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, et al. Angiotensin induces vascular cell adhesion molecule 1 expression in rat vasculature a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1999, **100**: 1223-229
- [9] Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, et al. Inhibition of early atherosclerosis by Losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2000, **101**: 1586-593
- [10] Navalkar S, Parthasarathy S, Santanam N, et al. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37** (2): 440-444

(此文 2001-05-31 收到, 2001-11-02 修回)

(此文编辑 文玉珊)