

氯沙坦对球囊成形术后兔血管内膜增生及核因子 κB 活性的影响

刘颖, 李建军, 李庚山, 张玉平, 王晶, 夏冷, 徐红新

(武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 分子生物学; 氯沙坦防制再狭窄的机制; 免疫组织化学法; 球囊成形术; 内膜增生; 核因子 κB ; 兔

[摘要] 为研究氯沙坦对球囊成形术后血管内膜增生及核因子 κB 活性的影响, 采用内皮剥脱后高脂饮食(含 1.5% 胆固醇)喂养制作兔腹主动脉粥样硬化模型, 然后对狭窄部位行球囊成形术。术后氯沙坦组给予氯沙坦 10 mg/(kg·d) 口服, 对照组只喂生理盐水, 4 周后取腹主动脉行组织形态学观察及用免疫组织化学方法分析核因子 κB 、 α -平滑肌肌动蛋白、巨噬细胞、细胞间粘附分子 1 的表达。结果发现, 与对照组相比, 氯沙坦组内膜厚度/中膜厚度比值、内膜面积/中膜面积比值均显著减少($P < 0.01$)。氯沙坦组新生内膜中巨噬细胞、平滑肌细胞数均较对照组显著减少($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。核因子 κB 及其靶基因产物细胞间粘附分子 1 水平亦因氯沙坦的干预而明显减少($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。结果提示, 氯沙坦明显抑制球囊成形术后内膜增生, 其机制可能为阻断血管紧张素 I 受体, 进而抑制核因子 κB , 从而抑制平滑肌细胞迁移、增殖和新生内膜形成。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Effect of Losartan on Neointimal Proliferation and Activation of Nuclear Factor- κB After Balloon Angioplasty in Rabbits

LIU Ying, LI Jiann Jun, LI Geng-Shan, ZHANG Yu-Ping, WANG Jing, XIA Ling, and XU Hong-Xin

(Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University, School of Medicine, Wuhan, 430060 China)

[KEY WORDS] Balloon Angioplasty; Neointimal Proliferation; Nuclear Factor- κB ; Rabbits; Restenosis; Losartan

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of losartan on neointimal proliferation and expression of nuclear factor- κB (NF- κB). **Methods** Japanese White rabbits underwent abdominal aorta balloon de-endothelialization and then were treated with a 1.5% cholesterol diet for 8 weeks. Then balloon angioplasty was performed on the injured arteries. Immediately after balloon angioplasty, the rabbits of the losartan group was orally administered with losartan [10 mg/(kg·d)], while the rabbits of the control group were given normal saline. Animals were killed four weeks after angioplasty, and excised artery segments were prepared for histomorphological observation and α -smooth muscle actin, macrophage, NF- κB and intracellular adhesive molecule-1 (ICAM-1) were investigated by immunohistochemistry analysis. **Results** Losartan treatment significantly inhibited neointimal proliferation. Compared with the control group, the intimal thickness (IT), intimal area (IA), the ratio of IT/MT and IA/MA of the losartan group were significantly reduced ($P < 0.01$). Also, macrophages and smooth muscle cells (SMC) in the neointima were significantly diminished ($P < 0.01$ and $P < 0.05$) and the expression of NF- κB and ICAM-1 were respectively decreased in the losartan group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). **Conclusions** These findings suggest that losartan could significantly relieve neointimal proliferation after balloon angioplasty, possibly through inhibiting angiotensin I and NF- κB , thus inhibits inflammatory reaction, migration and proliferation of SMC as well as formation of neointima which contributes to restenosis after balloon angioplasty.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 是治疗冠状动脉狭窄的有效方法, 但术后 6 个月内 30% ~ 60% 的再狭

窄发生率严重影响其远期疗效。研究表明, 血管紧张素 I (angiotensin I , Ang I) 通过其受体的介导参与再狭窄的形成, 而核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 可调节多种参与再狭窄形成的基因, 包括 Ang I 基因。本研究通过 Ang I 受体拮抗剂氯沙坦对球囊成形术后血管内膜增生、NF- κB 及细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达的影响, 以探讨 PTCA 术后再狭窄发生的某些机制及氯沙坦对防治再狭窄的作用。

[收稿日期] 2002-07-13 [修回日期] 2003-03-06

[基金项目] 湖北省教委青年基金(99B010) 部分资助

[作者简介] 刘颖, 女, 1974 年出生, 心血管内科硕士研究生, 主要研究方向为冠心病。E-mail: liuying_28@sohu.com。李建军, 男, 1957 年出生, 博士后, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯者, 主要研究方向为冠心病。李庚山, 男, 1932 年出生, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病。

1 材料和方法

1.1 动脉粥样硬化模型的制作

选用日本雄性大耳白兔(湖北省医学实验动物中心,合格证号:医动字第 19-009 号)24 只,体重 2.15 ± 0.16 kg。随机选取其中 8 只作为正常组,始终饲以普通饮食,余 16 只以 1.5% 高胆固醇饲料适应性喂养 1 周后,在严格无菌条件下,肌肉注射氯胺酮(50 mg/kg)和安定(5 mg/只)全身麻醉。仰卧位固定。X 线透视下,经右侧股动脉切开,插入 4F Forgarty 导管(美国 Baxter Healthcare Corporation)至膈肌下,注入 20% 泛影葡胺 0.8~1 mL 充盈球囊,回拖导管至髂总动脉,反复 3 次,造成腹主动脉内皮损伤^[1]。随后结扎股动脉,缝合切口。术后继续饲以高脂饮食^[2]。

1.2 腹主动脉球囊成形术的实施

高脂饲养 8 周后(实验第 9 周后),取 16 只动物实施腹主动脉球囊成形术。具体方法为:X 线透视下,经左侧股动脉插入 4F Forgarty 导管至膈肌下 5~8 cm,以 4~6 个大气压充盈球囊,每次 30 s^[3],扩张 4 次。术后,将 16 只动物随机均分为两组,氯沙坦组口服氯沙坦(美国默沙东公司馈赠)10 mg/(kg·d),对照组饮用生理盐水^[4],用高脂饲料继续喂养 4 周(实验第 13 周末)后处死。

1.3 组织形态学观察

麻醉状态下,分离腹主动脉,用生理盐水置换出主动脉血后,以 10% 中性福尔马林在 100 mmHg 恒压下灌注 15 min,取膈肌下 5~8 cm 处经成形术的腹主动脉,在 10% 中性福尔马林中固定 24 h^[5]。常规酒精脱水,石蜡包埋、制成 5 μm 厚连续切片,苏木素伊红染色,利用同济千屏影像工程公司 HPIAS2000 型图像分析软件,测定新生内膜厚度(intimal thickness, IT)、中膜厚度(media thickness, MT)、内膜面积(intimal area, IA)及中膜面积(media area, MA),计算新生内膜厚度与中膜厚度比(IT/MT)及内膜面积与中膜面积比(IA/MA)。

1.4 免疫组织化学染色

抗体为巨噬细胞单克隆抗体 RAM-11(丹麦 Dako 公司)、α-平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(丹麦 Dako 公司);NF-κB p65 单克隆抗体 sc-8008(美国 Santa Cruz 公司);ICAM-1 多克隆抗体(武汉博士德生物公司),SP 试剂盒(美国 Zymed 公司)。阳性着色均表现为胞质染成浅黄色、棕黄色或棕褐色。采用 S-P 法, DAB 显色。以磷酸缓冲液代替一抗作为阴性对照。具体步骤参照试剂盒说明书进行。以每一高倍镜视野下阳性表达的细胞占总细胞的百分比为衡量标准,分

别计算巨噬细胞、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、NF-κB、ICAM-1 阳性染色百分比。

1.5 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 差表示。多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 病理形态学改变

肉眼可见正常组内膜光滑,无斑块形成;对照组主动脉管壁有大量黄白色脂样物向管腔凸出,并连成片状;而氯沙坦组斑块明显减少。HE 染色可见,对照组内膜增厚显著,内含大量泡沫细胞及不定形坏死物质,并可见中膜 SMC 向内膜下迁移。对照组 IT、IT/MT、IA 及 IA/MA 较正常组显著增高,而氯沙坦组 IT、IT/MT、IA、IA/MA 较对照组显著降低,其中 IT 减少 65%, IA 减少 34%, IT/MT 减少 32%, IA/MA 减少 28%(表 1, Table 1)。

2.2 免疫组织化学分析

NF-κB 与 ICAM-1 在正常组中基本无表达,而在对照组及氯沙坦组均有表达。经氯沙坦干预后, NF-κB(图 1, Figure 1)、ICAM-1(图 2, Figure 2)的表达以及 SMC、巨噬细胞(图 3, Figure 3)较对照组均显著减少(表 2, Table 2)。

表 1. 氯沙坦对兔血管球囊成形术后内膜增生的影响

Table 1. The effects of losartan on neointimal proliferation after balloon angioplasty in rabbits ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

指 标	正常组	对照组	氯沙坦组
内膜厚度 (mm)	0.37 ± 0.07	1.35 ± 0.35 ^a	0.42 ± 0.08 ^b
内膜厚度/中膜厚度	0.28 ± 0.11	0.67 ± 0.15 ^a	0.45 ± 0.10 ^b
内膜面积 (mm ²)	2.62 ± 0.53	5.30 ± 1.71 ^a	3.18 ± 0.83 ^b
内膜面积/中膜面积	0.35 ± 0.07	0.77 ± 0.14 ^a	0.54 ± 0.11 ^b

a: *P* < 0.01, 与正常组比较; b: *P* < 0.01, 与对照组比较。

表 2. 氯沙坦对核因子 κB、细胞间粘附分子 1 的表达以及平滑肌细胞、巨噬细胞数量的影响

Table 2. The effects of losartan on expression of NF-κB, ICAM-1 and count of SMC and macrophages in the vascular walls ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

指 标	对照组	氯沙坦组
核因子 κB	24.06% ± 3.09%	19.50% ± 2.73% ^b
细胞间粘附分子 1	21.43% ± 3.91%	17.71% ± 3.59% ^a
平滑肌细胞	20.19% ± 4.11%	15.93% ± 3.15% ^a
巨噬细胞	55.20% ± 9.28%	42.79% ± 6.65% ^b

a: *P* < 0.05, b: *P* < 0.01, 与对照组比较。

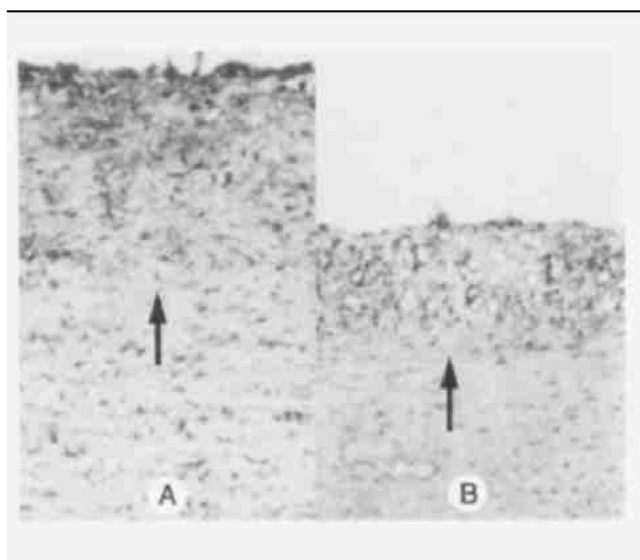


图 1. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管核因子 κB 的影响 ($\times 100$) A: 对照组; B: 氯沙坦组。

Figure 1. Effect of Losartan on NF- κB after balloon angioplasty in rabbits ($\times 100$) A: control group; B: Losartan group.

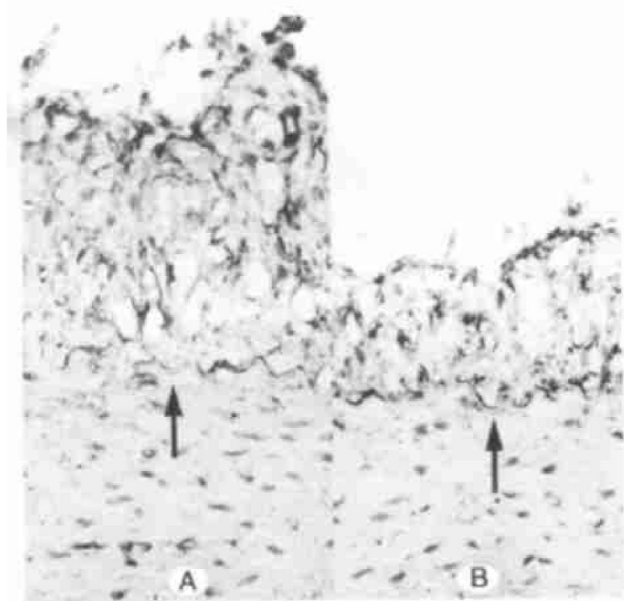


图 2. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管细胞间粘附分子 1 的影响 ($\times 200$) A: 对照组; B: 氯沙坦组。

Figure 2. Effect of Losartan on ICAM-1 after balloon angioplasty in rabbits ($\times 200$) A: control group; B: Losartan group.

3 讨论

经腔内冠状动脉成形术(PTCA)术后再狭窄的确切机制尚不清楚,内膜增生、SMC 增殖在再狭窄发生机制中占重要地位^[6,7]。Viswanathan 等^[8]发现大鼠颈动脉内皮损伤后,增殖的血管 SMC 中 AT_1 受体表达增多,提示 Ang II 通过与 AT_1 受体结合参与

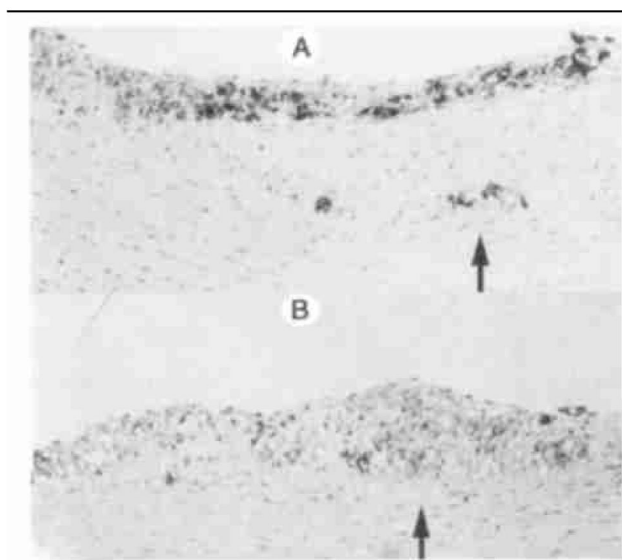


图 3. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管巨噬细胞的影响 ($\times 100$)

A: 对照组; B: 氯沙坦组。

Figure 3. Effect of Losartan on macrophages after balloon angioplasty in rabbits ($\times 100$) A: control group; B: Losartan group.

血管内皮损伤后内膜增生这一过程。Ang II 与 AT_1 受体结合,能促进血管 SMC 移行、增殖,使血管新生内膜增厚、管腔狭窄^[9]。本实验结果表明,氯沙坦在不影响血脂的情况下^[10],作为血管内膜增生的指标 IT/MT 、 IA/MA 较对照组明显减少,说明氯沙坦能明显抑制球囊损伤后血管内膜增生,也证实 Ang II 是引起再狭窄之关键因素之一。与对照组相比,氯沙坦组血管内膜 α 平滑肌肌动蛋白 (α actin) 表达明显减少,表明氯沙坦可抑制血管内膜 SMC 的迁移与增殖,而 SMC 的迁移、增殖是再狭窄发生中的主要病理基础。SMC 增殖均伴随着表型的转变^[11],巨噬细胞在 SMC 的表型转化中起重要作用。SMC 增殖受各种生长因子的调控,这些因子由巨噬细胞、SMC 和内皮细胞所产生,互相形成网络效应。本实验结果证实氯沙坦在抑制 SMC 增殖的同时抑制了巨噬细胞的聚集,与 Poon 等^[12] 和 Igarashi 等^[13] 的研究结果一致。

核因子 κB (NF- κB) 是重要的核转录调节因子,在心血管疾病发病中起重要作用^[14],它可调节许多参与 As、炎症反应、细胞增殖和免疫反应的基因,如 Ang II 基因。活化的 NF- κB 可表达于人 As 损伤区域或血管成形术后的血管,Ang II 受体 (AT_1 和 AT_2 受体) 阻断剂可抑制 NF- κB 的激活^[15]。李建军等^[16] 的研究表明,小鼠 SMC 中存在 NF- κB 通路,肿瘤坏死因子 ($\text{TNF-}\alpha$) 可使 NF- κB 活性明显升高。Morishita 等^[17] 发现, $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白或变异型 NF- κB 可明显抑制培养的 SMC 增殖,提示 NF- κB 的激活是血管 SMC 增殖的必经和始动环节。而对于 NF- κB 与再狭窄之间的

关系,国内外报道尚少。Breuss 等^[18]研究发现,球囊成形术可在损伤局部诱导 NF- κ B 激活,使得管腔缩小,其机制可能为诱导炎症反应和减少细胞凋亡。Ialenti 等^[19]用球囊损伤大鼠颈动脉内皮后,用抗氧化剂四氢吡咯二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidinedithiocarbamate, PDTC) 治疗 14 天,内膜增生明显减轻,NF- κ B 的 DNA 结合活性明显降低,提示阻止 NF- κ B 激活可抑制新生内膜形成。本实验结果表明,与对照组相比,氯沙坦组血管壁 NF- κ B 及其 NF- κ B 靶基因产物 ICAM-1 表达明显减少,提示炎症反应参与再狭窄过程,且再狭窄与 NF- κ B 存在紧密联系,氯沙坦通过抑制 NF- κ B 的激活,从而抑制其靶基因(众多炎症相关因子)表达,进而对再狭窄产生抑制作用。

综上所述,PTCA 术后血管内皮损伤区巨噬细胞、SMC、内皮细胞、成纤维细胞能产生 Ang II 后者可通过激活 NF- κ B,触发一系列炎症反应,诱导 SMC 迁移、增殖,新生内膜形成,造成再狭窄。氯沙坦通过抑制 Ang II、NF- κ B 的作用进而抑制炎症反应,抑制 SMC 迁移、增殖和新生内膜形成,减轻再狭窄。因此应用 Ang II 受体阻断剂阻断 NF- κ B 激活可能成为将来防治再狭窄的新途径之一。

[参考文献]

- [1] 李建军,李庚山,黄从新,江洪,许家俐,唐其柱,等. 球囊损伤兔主动脉后核因子 κ B 活性的动态变化. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (1): 34-36
- [2] Nobuyoshi M, Tanaka M, Fujii M, Asanuma A, Takimoto M. Thrombus formation on the aorta injured by angioplasty and its prevention with dilaazep in atherosclerotic rabbits. *Thromb Res*, 1989, 54 (6): 561-572
- [3] Miller DD, Bach RG, Tio FO, Bailey SR, Waters CA, Woodworth TG, et al. Interleukin-2 receptor-specific fusion toxin inhibits barotrauma-induced arterial atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1996, 126 (1): 1-14
- [4] Faxon DP, Sanborn TA, Haudenschild CC, Ryan TJ. Effect of antiplatelet therapy on restenosis after experimental angioplasty. *Am J Cardiol*, 1984, 53 (12): 72C-76C
- [5] 贾新末,霍勇,朱国英. 血管成形术后血管重塑动态变化的实验研究. 中华心血管病杂志, 1997, 25 (2): 132-134
- [6] Casscells W. Migration of smooth muscle cells and endothelial cell: critical events in restenosis. *Circulation*, 1992, 86 (3): 723-729
- [7] 李爱民,何作云,周小波,覃军,耿建萌. 氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化因子 1 表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (2): 108-111
- [8] Viswanathan M, Seltezer A, Savedra JM. Heterogenous expression of angiotensin II-AT₁ receptors in neointima of rat carotid artery and aorta after balloon catheter injury. *Peptides*, 1994, 15 (7): 1 205-212
- [9] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts, critical role of the AT₁ receptor subtype. *Circ Res*, 1993, 73 (3): 413-423
- [10] 张玉平,李建军,刘颖,王晶. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管内膜增生和基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (1): 36-40
- [11] 韦立新. 经皮冠状动脉成形后再狭窄的病理学机制. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (1): 1-3
- [12] Poon M, Cohen J, Siddiqui Z, Taubman MB. Trapidil inhibits monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage accumulation after balloon arterial injury in rabbits. *Lab Invest*, 1999, 79 (11): 1 369-375
- [13] Igarashi M, Takeda Y, Mori S, Ishibashi N, Komatsu E, Takahashi K, et al. Suppression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYw6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*, 1997, 120 (6): 1 172-178
- [14] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear factor-kappa B through AT₁ and AT₂ in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*, 2000, 86 (12): 1 266-272
- [15] Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappa B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20 (3): 645-651
- [16] 李建军,李庚山,黄从新,江洪,许家俐,唐其柱,等. 肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞 NF- κ B 活性的影响. 中华心血管病杂志, 2001, 29 (4): 243-245
- [17] Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, et al. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappa B binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med*, 1997, 3 (8): 894-899
- [18] Breuss JM, Cejna M, Bergmeister H, Kadl A, Baumgartl G, Steurer S, et al. Activation of nuclear factor-kappa B significantly contributes to lumen loss in a rabbit iliac artery balloon angioplasty model. *Circulation*, 2002, 105 (5): 633-638
- [19] Ialenti A, Ianaro A, Maffia P, Camuccio R, D'Acquisto F, Maiello FM, et al. Role of nuclear factor-kappaB in a rat model of vascular injury. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2001, 364 (4): 343-350

(此文编辑 文玉珊)