

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0401-04

•实验研究•

辛伐他汀、丙丁酚和卡托普利在动脉粥样硬化斑块消退中的作用及与金属蛋白酶 1 和组织抑制物 1 基因表达的关系

张园园, 张 运, 张 梅, 高月花, 李秀昌, 方永奇

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 药理学; 药物对动脉粥样硬化的稳定和消退作用; 病理学检查; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶 1; 基质金属蛋白酶组织抑制物 1; 兔

[摘要] 观察药物消退和稳定动脉粥样硬化的作用并探讨基质金属蛋白酶 1 及基质金属蛋白酶组织抑制物 1 的表达。对实验性动脉粥样硬化兔, 分别给予辛伐他汀、丙丁酚和卡托普利治疗 12 周。结果发现, 3 种药物均可显著降低血脂, 以丙丁酚和辛伐他汀效果较强; 在停止喂胆固醇后, 自然消退组内中膜进一步增厚, 3 种药物均可显著消退动脉粥样硬化; 药物治疗组的胶原 iv、基质金属蛋白酶 1 及基质金属蛋白酶组织抑制物 1 的 mRNA 表达水平均下降, 其中丙丁酚组金属蛋白酶 1 的表达下降有统计学意义。3 种药物均有消退动脉粥样硬化的作用, 以辛伐他汀最佳; 而药物通过减少基质金属蛋白酶 1 表达, 相对减少基质金属蛋白酶 1/基质金属蛋白酶组织抑制物 1 的表达比例, 起到稳定斑块的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Role of Simvastatin, Probucol and Captopril on the Regression of Atherosclerotic Plaque and the Possible Mechanisms Related to Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1

ZHANG Yuan Yuan, ZHANG Yun, ZHANG Mei, GAO Yue Hua, LI Xiur Chang, and FANG Yong Qi

(Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinase-1; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; Rabbit; Pathology Examination; Blood Lipid

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of simvastatin, probucol and captopril on regression and stabilization of atherosclerosis, and to explore the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). **Methods** 50 rabbits were induced to atherosclerosis by feeding cholesterol and then treated with simvastatin, probucol, captopril respectively for 12 weeks. The tissues of abdominal aorta were studied by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), pathology and immunohistochemistry staining. **Results** The lipids were decreased in the drug therapy groups significantly ($P < 0.05$), especially in probucol and simvastatin groups. The atherosclerosis regressed significantly in the drug therapy groups ($P < 0.05$), and simvastatin had the best result. The expression of mRNA level of collagen iv, MMP-1 and TIMP-1 was decreased in drug therapy groups, but was statistically significant only in the probucol group ($P < 0.01$). **Conclusion** Simvastatin, probucol and captopril could regress the atherosclerosis and stabilize the plaque by reducing the expression of MMP-1.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心脑血管疾病的共同病理基础。研究证明,在一定条件下,动脉粥样硬化可以延缓或停止发展甚至逐渐消退。近年的研究证实^[1-3],辛伐他汀、丙丁酚和卡托普利具有延缓动脉粥样硬化进展及再狭窄的作用。本研究采用实验性动脉粥样硬化动物模型的方法,对比观察降脂药及抗氧化药物治疗动脉粥样硬化的作用,

并探讨药物稳定和消退斑块的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 药品

辛伐他汀:商品名舒降之(默沙东公司);卡托普利:商品名开搏通(施贵宝公司);丙丁酚:商品名普罗布考(普宁制药厂);胆固醇(湖南华富制药有限公司)。

1.2 动脉粥样硬化动物模型的建立

雄性新西兰兔 50 只,体重 1.5~2.5 kg,随机分为动脉粥样硬化模型组(As 模型组)45 只和正常对照组 5 只。As 模型组喂以含 1% 胆固醇饲料,正常

[收稿日期] 2002-11-19 [修回日期] 2003-04-15

[基金项目] 山东省卫生厅“九·五”攻关项目(9711)和卫生部临床学科重点项目

[作者简介] 张园园,女,1971 年出生,山东省济南市人,博士,主治医师。张运,男,1952 年出生,博士,博士生导师,心血管病学教授,中国工程院院士,主要从事心血管疾病的基础与临床研究。张梅,女,1962 年出生,博士,博士生导师。

对照组喂以普通饲料, 120~140 g/d。12周末从As模型组随机抽取9只兔作为As验证组, 从正常对照组抽取2只兔作为正常验证组, 处死留标本。

1.3 动脉粥样硬化模型组的消退治疗

剩余动脉粥样硬化模型兔, 停喂胆固醇饲料, 改为普通饲料喂养, 随机分成4组, 每组8只。并予不同处理12周: 自然消退组; ④辛伐他汀组: 每次10 mg, 每日1次; ④丙丁酚组: 每次0.5 g, 每日2次; 卡托普利组: 每次25 mg, 每日2次。

1.4 血脂测定

于实验开始、12周末、24周末, 禁食12 h以上, 经耳缘静脉抽血检测总胆固醇(total cholesterol, TC)及甘油三酯(triglyceride, TG)。

1.5 病理学检查

在腹主动脉后壁最厚处取材, 常规包埋, 5 μ m连续切片, 分别进行HE染色、Masson三色染色及免疫组织化学染色, 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单抗购于Oncogene公司。

1.6 逆转录聚合酶链反应

1.6.1 引物设计及合成 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测相关细胞因子的引物序列如下: γ -肌动蛋白(γ -actin)序列长度253 bp, 上游引物5' ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAA AA3', 下游引物5' GTC AGG ATC TTC ATG AGG TAG TC3'; 基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1), 序列长度649 bp, 上游引物5' TCA GTT CGT CCT CAC TCC AG3', 下游引物5' TTG GTC CAC CTG TCA TCT TC3'; 基质金属蛋白酶组织抑制物1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1)序列长度326 bp, 上游引物5' GCA ACT CCA ACC TTG TCA TC3', 下游引物5' AGC GTA GGT CTT GGT GAA GC3'; 胶原iv序列长度312 bp, 上游引物5' GAT GCG TTC CAG TTC GAG TA3', 下游引物5' GGT CTT CCG GTG GTC TTG TA3'。

1.6.2 RNA的提取 称取血管组织约100 mg, 剪碎, 匀浆, 采用异硫氰酸胍一步法, 提取血管组织

RNA。

1.6.3 逆转录反应 逆转录反应体系总体积20 μ L, 包括总RNA 5~10 μ g, 5 \times 逆转录酶缓冲液4 μ L, 0.1 mmol/L DTT 2 μ L, M-MLV逆转录酶1 μ L(美国GIBICO公司), 4种dNTPs(每种10 mmol/L)共1 μ L, 下游引物1 μ L。反应体系置于37 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 10 min。

1.6.4 聚合酶链反应 于20 μ L逆转录产物中继续加入10 \times PCR缓冲液10 μ L, 15 mmol/L MgCl₂ 8 μ L, 4 \times dNTPs(每种10 mmol/L)1 μ L, 上游引物1 μ L, Taq DNA聚合酶2 μ L(1 000 ku/L), 预变性94 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 变性94 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C延长7 min。取PCR产物10 μ L, 经1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在紫外灯下观察电泳结果并拍照。

1.6.5 电泳条带吸光度分析 利用数字凝胶成像系统(美国柯达公司)对PCR产物电泳条带进行吸光度定量, 并根据各条带与 γ -肌动蛋白吸光度的比值进行半定量统计, 得出该组平均等级分值; - : 0分, 无表达; + : 1分, 吸光度比值 ≤ 0.25 ; ++ : 2分, 0.25 < 吸光度比值 ≤ 0.50 ; +++ : 3分, 0.50 < 吸光度比值 ≤ 0.75 ; ++++ : 4分, 吸光度比值> 0.75。

1.7 统计学处理

采用EXCEL及SAS统计分析软件, 计量资料分析采用方差分析、两两比较的 q 检验或 t 检验, 计数资料分析采用卡方检验, 对吸光度平均等级分值采取Kruskal-Wallis法和Nemenyi法秩和检验。

2 结果

2.1 血脂检测

动脉粥样硬化模型建立前及12周末TC分别为 1.60 ± 0.85 mmol/L及 24.52 ± 7.04 mmol/L, TG分别为 0.68 ± 0.38 mmol/L及 0.98 ± 0.59 mmol/L, 模型建立前后有显著性差异($P < 0.01$)。消退治疗后4组实验兔血脂检测结果见表1(Table 1)。

表1. 实验兔血脂水平的比较

Table 1. The comparison of serum lipid levels of rabbits($\bar{x} \pm s$)

血脂指标	自然消退组 ($n=7$)	辛伐他汀组 ($n=8$)	丙丁酚组 ($n=8$)	卡托普利组 ($n=7$)
胆固醇(mmol/L)	6.60 ± 6.59	1.40 ± 1.17^b	1.08 ± 0.43^b	2.80 ± 1.32^a
甘油三酯(mmol/L)	0.82 ± 0.39	0.41 ± 0.05^b	0.49 ± 0.15^a	0.50 ± 0.19^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与自然消退组比较。

2.2 大体病理学观察

12 周及 24 周正常对照组兔主动脉内膜光滑, 无脂质沉积。12 周 As 模型组, 可见主动脉内膜面有浅黄色斑块样突起, 散在或融合成片, 以主动脉弓部最多。24 周末自然消退组与 12 周末动脉粥样硬化验证组大体病理所见相似, 但斑块隆起更为明显。24 周末各药物治疗组斑块面积及厚度均较 12 周末动脉粥样硬化验证组减小。

2.3 HE 染色、Masson 三色染色及镜下动脉内膜中层厚度测定

正常兔血管内膜薄且结构完整。动脉粥样硬化模型兔可见脂质斑块弥漫或散在, 内膜增厚, 内皮有时不完整, 泡沫细胞大量积聚, 少数胞外有胆固醇结晶和无定形坏死细胞碎片, Masson 染色绿色的胶原纤维组织增生不明显。自然消退组多有粥样物形成。各服药组均有斑块厚度的减小, 泡沫细胞数目减少, 体积变小, 胞内脂肪空泡明显减少, 纤维组织增生以丙丁酚组较明显, 胆固醇结晶周围多有纤维包绕。镜下显微测量主动脉内膜中层厚度(intima medial thickness, IMT) 见表 2(Table 2)。

表 2. 镜下测量各组腹主动脉内膜中层厚度的比较

Table 2. The comparison of intima medial thickness of abdominal artery among groups($\bar{x} \pm s$, mm)

	对照组 (n = 5)	As 模型组 (n = 9)	自然消退组 (n = 7)	辛伐他汀组 (n = 8)	丙丁酚组 (n = 8)	卡托普利组 (n = 7)
内膜中层厚度	0.18 ± 0.03	0.51 ± 0.12 ^{ad}	0.66 ± 0.11	0.40 ± 0.13 ^c	0.43 ± 0.11 ^c	0.49 ± 0.15 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 与自然消退组比较; d: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.4 免疫组织化学检测结果

增殖细胞核抗原染色阳性信号为细胞核上棕黄色颗粒。在动脉粥样硬化模型组和自然消退组可见内膜层 PCNA 阳性核分布广泛增多; 各服药组的 PCNA 阳性核则明显减少, 以辛伐他汀组最为明显。

2.5 逆转录聚合酶链反应检测

胶原 iv、MMP-1 和 TIMP-1 等因子 mRNA 的表达结果见表 3(Table 3)。各组之间均有极显著差异($P < 0.001$)。正常组胶原 iv 和 TIMP-1 有微量表达, MMP-1 阳性检出率为 60% (3/5); 12 周动脉粥样硬

化模型兔的胶原 iv、MMP-1 和 TIMP-1 表达分别增高了 1.86 倍、4.73 倍和 2.67 倍, 可见 MMP-1 的表达水平相对高于 TIMP-1; 自然消退组中胶原 iv 和 TIMP-1 表达量继续增多, MMP-1 无明显变化; 3 种药物均减轻胶原 iv 的表达程度, 又以卡托普利最为明显, 但均未达统计学水平; 3 种药物均降低 MMP-1 的表达水平, 但只有丙丁酚达统计学意义($P < 0.01$); 丙丁酚和卡托普利组的 TIMP-1 表达减少, 但减少程度不及 MMP-1 的改变, 且未达统计学水平, 辛伐他汀组 TIMP-1 表达水平与自然消退组近似。

表 3. 各组胶原 iv、基质金属蛋白酶 1 及其组织抑制物 1 mRNA 表达的平均等级分值

Table 3. The mRNA expression of fibrinogen iv, matrix metalloproteinase 1 and its tissue inhibitor

指 标	对照组 (n = 5)	As 模型组 (n = 9)	自然消退组 (n = 7)	辛伐他汀组 (n = 8)	丙丁酚组 (n = 8)	卡托普利组 (n = 7)
胶原 iv	1.20 ^a	3.43	4.00	3.33	2.88	2.00
基质金属蛋白酶 1	0.60 ^b	3.44	3.43	2.00	1.13 ^b	2.00
TIMP-1	1.00 ^b	3.67	4.00	3.88	2.50	2.14

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 As 模型组比较。TIMP-1: 基质金属蛋白酶组织抑制物 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1)。

3 讨论

动脉粥样硬化的发病机制十分复杂, 近年来较一致的看法是: 血管内皮和平滑肌细胞在血脂异常、病毒感染、免疫功能异常等损害因素的作用下, 出现内皮损伤并导致过度炎症性增殖反应, 从而引发 As。在此理论指导下, 动物实验和临床研究证实, 调脂、抗氧化、抗感染、抗炎症等药物具有抗动脉粥样

硬化的作用, 但这些药物对斑块稳定性的对比研究较少。通过对比研究辛伐他汀、丙丁酚和卡托普利稳定动脉粥样硬化斑块的可能性及其分子生物学机制, 对于防止心脑血管事件的发生具有重要的临床意义。

本研究应用高胆固醇饲料建立了兔主动脉粥样硬化模型, 但短期内终止单纯高胆固醇喂养的斑块

并不迅速减小,反而继续有所增大。血脂测定结果表明,As模型建立后经12周普通饲料喂养,TC虽有显著降低,但尚未降至正常水平,故动脉内膜会持续增厚。研究发现^[4],在停止高胆固醇饮食之后,内源性富含胆固醇的极低密度脂蛋白胆固醇明显增多,并继续运送至血管和其它组织。这种脂质代谢的特点决定了其斑块消退需较长的时间。虽然与24周自然对照组相比,各服药组的IMT测定值显著降低,但与12周末的IMT测定值相比,只有辛伐他汀组有显著减小,其余各服药组无显著差异。说明丙丁酚只是阻止了动脉粥样硬化的继续进展,这是由于丙丁酚虽然降低TC程度最大,但也同时降低了高密度脂蛋白胆固醇;卡托普利消退作用相对较弱。

血管平滑肌细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、细胞外基质和细胞内外的脂质是构成斑块的主要成分,任何一种成分的减少均可导致斑块体积的减小。研究证实,通过降低血清TC水平可造成斑块内外浓度梯度,同时升高高密度脂蛋白胆固醇可加强将胆固醇从肝外组织(包括动脉壁)至肝脏的胆固醇逆行运转,使斑块内脂质减少^[5]。血管平滑肌细胞的增殖和细胞外基质的改变对于动脉粥样硬化的进展具有重要作用。增殖细胞核抗原是DNA复制及细胞分裂过程所必须的,为细胞信号传导途径中的关键一环^[6]。动脉粥样硬化模型组和自然消退组兔PCNA阳性率无明显差别,3个服药组PCNA阳性率则显著降低,反映了血管平滑肌细胞增殖程度的减轻。

尸检和血管造影结果的对照研究发现,70%的急性心肌梗死发生在狭窄程度<50%的冠状动脉^[7],因此提出斑块的稳定性是比大小更为重要的决定预后的因子。不稳定性斑块的病理特征是:有细胞外脂质池、斑块纤维帽薄弱,在斑块与正常内膜的交界处有较多富含脂质的巨噬细胞。在斑块进展过程中始终存在着基质的重建:一方面血管平滑肌细胞增生、迁移,并分泌大量的细胞外基质,另一方面血管平滑肌细胞和巨噬细胞又产生MMP,使基质不断降解^[8]。MMP是一组具有许多共同生物化学性质的可降解细胞外基质的酶,在正常的生命过程中它们参与血管基质的再造和重排,但MMP的异常分泌和激活则可导致病理过程的发生。金属蛋白酶的抑制物,可以和活性金属蛋白酶不可逆性结合,抑制后者对基质蛋白的降解活性。基质金属蛋白酶的分泌增加是斑块不稳定的基础。就临床危险

程度而言,减小斑块的不稳定性比使斑块体积消退更为重要。

本文通过观察兔腹主动脉斑块的形态特点以及胶原、MMP-1和TIMP-1的含量,探讨了药物稳定斑块的可行性。虽然镜下测量结果表明药物只是阻止了斑块的继续进展,然而通过形态学观察我们发现,药物治疗组斑块中细胞内外脂质明显减少,胶原含量相对增加,其中丙丁酚组胶原含量增加明显,提示斑块变得稳定,其中丙丁酚可能具有更强的稳定作用。同时,动脉粥样硬化模型组和自然消退组兔胶原iv和MMP-1均出现高水平表达,但TIMP-1亦代偿性表达增多。3种药物均减少MMP-1表达量,以丙丁酚作用明显;丙丁酚及卡托普利对TIMP-1的抑制程度轻于对MMP-1表达的抑制,而辛伐他汀对TIMP-1的表达几乎无影响。从以上结果可以看到,虽然对MMP-1/TIMP-1体系的影响途径和程度不一,3种药物均可通过改变MMP-1和TIMP-1的表达比例,即减少MMP-1/TIMP-1比例,从而降低细胞外基质面临的降解压力。但胶原iv的表达在各服药组均较高脂模型组或自然消退组减低。

综上所述,辛伐他汀、丙丁酚及卡托普利均可通过减少斑块内脂质,抑制血管平滑肌细胞增殖,消退或延缓动脉粥样硬化,以辛伐他汀效果最佳;同时可减少MMP-1的表达,相对减少MMP-1/TIMP-1的表达比例,相对增加斑块内的胶原含量,提示具有稳定斑块的作用,以丙丁酚作用明显。

[参考文献]

- [1] 覃军,何作云,李爱民. 辛伐他汀的调脂和抗动脉粥样硬化作用. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(6): 418-420
- [2] 董晓雁,张桂清,方向明,郑民安,胡继军,林桂珍,等. 卡托普利对动脉粥样硬化家兔内皮素和血管紧张素Ⅱ的影响及其与原癌基因c-myc和c-fos的相关关系. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 217-220
- [3] 张圆圆,张运,张梅,王振光,高月花,李秀昌,等. 丙丁酚稳定和消退动脉粥样硬化的实验研究. 山东大学学报(医学版), 2002, 40(5): 411-413
- [4] Seddon AM, Woolf N, Laville A. Hereditary hyperlipidemia and atherosclerosis in the rabbit due to overproduction of lipoprotein. Arteriosclerosis, 1977, 7(1): 113-118
- [5] Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE. Lipid lowering and plaque regression: new insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. Circulation, 1993, 87(6): 1781-791
- [6] Speir E, Epstein SE. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferation cell nuclear antigen. Circulation, 1992, 86(2): 538-542
- [7] Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. Atherosclerosis, 2000, 149(2): 251-266
- [8] Libby P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation, 1995, 91(11): 2844-850

(此文编辑 曾学清)