

## 塞来昔布与小剂量阿司匹林合用对动脉粥样硬化的影响

郭远林<sup>1</sup>, 陈纪林<sup>1</sup>, 李建军<sup>1</sup>, 张伟<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院心血管病研究所 中国协和医科大学阜外心血管病医院 冠心病诊治中心, 北京市 100037;

2. 卫生部北京医院病理科, 北京市 100730)

[关键词] 内科学; 炎症; 动脉粥样硬化; 环氧合酶 2 抑制剂; 塞来昔布; 阿司匹林

[摘要] 目的 观察特异性环氧合酶 2 抑制剂塞来昔布与小剂量阿司匹林合用对小鼠动脉粥样硬化进展的影响。方法 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除的 C57BL/6 小鼠分为阿司匹林组( $n=10$ )、阿司匹林+塞来昔布组( $n=11$ )及安慰剂对照组( $n=8$ ), 均予西方饮食喂养, 分别以阿司匹林、阿司匹林+塞来昔布及安慰剂灌胃; 同龄同遗传背景野生型小鼠为正常对照组( $n=6$ ), 常规饲料喂养。16 周龄处死, 酶法分析测定血脂, 冰冻切片光镜下定位主动脉根部, 油红 O 染色评估粥样硬化病变情况。结果 两用药组及安慰剂组血脂水平均显著高于正常对照组( $P<0.01$ ), 两用药组总胆固醇水平略低于安慰剂组( $30.2\pm5.5$  mmol/L 与  $28.6\pm6.2$  mmol/L 对  $37.8\pm8.1$  mmol/L,  $P<0.05$ ), 而甘油三酯水平高于安慰剂组( $3.4\pm0.5$  mmol/L 与  $3.0\pm0.6$  mmol/L 对  $2.3\pm0.7$  mmol/L,  $P<0.05$ ), 两用药组之间血脂水平无差异。主动脉根部横切面油红 O 染色显示, 各用药组及安慰剂组见明显粥样硬化斑块形成; 用药组的斑块面积及管腔狭窄度均较安慰剂组显著降低( $P<0.01$ ), 而残余管腔显著扩大( $P<0.01$ ), 且阿司匹林+塞来昔布组的斑块面积较阿司匹林组进一步减小( $0.042\pm0.026$  mm<sup>2</sup> 对  $0.068\pm0.022$  mm<sup>2</sup>,  $P<0.05$ )。结论 阿司匹林可一定程度上降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的血清总胆固醇水平; 在阿司匹林的基础上加用特异性环氧合酶 2 抑制剂塞来昔布进行抗炎干预能进一步加强前者对动脉粥样硬化的抑制作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effects of Celecoxib, a Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Together with Low-dose Aspirin on Atherosclerosis Progression in Apolipoprotein-E knockout Mice

GUO Yuan-Lin<sup>1</sup>, CHEN Ji-Lin<sup>1</sup>, LI Jian-Jun<sup>1</sup>, and ZHANG Wei<sup>2</sup>

(1. Center of Coronary Heart Disease, Cardiovascular Institute &amp; Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Science &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100037; 2. Department of Pathology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Inflammation; Atherosclerosis; Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor; Celecoxib; Aspirin

[ABSTRACT] Aim To observe the effects of treatment with celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, together with low-dose aspirin on atherosclerosis progression in an apolipoprotein-E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice model. Methods 8-week-old ApoE<sup>-/-</sup> mice fed on a western diet were divided into group aspirin ( $n=10$ ), group aspirin+celecoxib ( $n=11$ ), and group placebo ( $n=8$ ). Aspirin, aspirin+celecoxib and placebo were given respectively by oral gavage. Wildtype mice fed on a normal diet were as normal control group ( $n=6$ ). At 16 weeks of age, serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were determined, atherosclerotic lesions in aortic root were evaluated by oil red O staining. Results A small difference in serum TC and TG levels was found either in group aspirin or in group aspirin+celecoxib compared with group placebo ( $30.2\pm5.5$  mmol/L and  $28.6\pm6.2$  mmol/L vs  $37.8\pm8.1$  mmol/L,  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ); However, there was no significant difference between the two treatment groups. Oil red O staining showed that mean plaque size in aortic root was significant smaller either in group aspirin+celecoxib or in group aspirin compared with group placebo ( $P<0.01$ ), and it was much smaller in group aspirin+celecoxib ( $0.042\pm0.026$  mm<sup>2</sup> vs  $0.068\pm0.022$  mm<sup>2</sup>,  $P<0.05$ ). Conclusions Aspirin can slightly decrease serum level of TC in ApoE<sup>-/-</sup> mice; Celecoxib, together with low dose aspirin, can reduce the progression of atherosclerosis to a much more extent

近年研究表明, 炎症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生和发展的中心环节<sup>[1,2]</sup>, 而迄今尚无直

接针对这一环节的有效药物。前列腺素是炎症的重要介质, 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是其合成的关键酶, 其中 COX1 主要调节血小板聚集, COX2 主要参与炎症和 As。由此推测, 抑制 COX2 有可能通过干预炎症而遏制 As 进程。此外, 近年来临床上发现有些患者虽服用阿司匹林却不能达到抑制血小板及抗血栓效应, 即“阿司匹林抵抗”现象, 其机制也与 COX2 的作用有关<sup>[3]</sup>。由此可见, 抑制 COX2 还可能

[收稿日期] 2004-12-17

[修回日期] 2005-03-01

[作者简介] 郭远林, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的炎症机制。通讯作者陈纪林, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床, 尤为动脉粥样硬化的血栓与炎症机制, 课题负责人, 联系电话 010-68314466-8044。李建军, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事炎症与动脉粥样硬化的基础与临床。张伟, 硕士, 主要从事心肺疾病的病理研究。

避免阿司匹林抵抗。本研究选用高脂饮食喂养的载脂蛋白 E 基因敲除(载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>)小鼠为 As 模型,在应用小剂量阿司匹林的基础上联合应用特异性 COX2 抑制剂——塞来昔布(Celecoxib),与单用阿司匹林进行比较,观察抑制 COX1 的同时抑制 COX2 对 As 的影响如何,从而推断这一联合用药方案可能具有的临床效应,为指导有益、合理的关于特异性 COX2 抑制剂的临床试验以及开发其可能的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组、处理及取材

8 周龄雄性载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> C57BL/6 小鼠(购于北京大学医学部,引自美国杰克逊实验室)随机分为小剂量阿司匹林组( $n=10$ )、小剂量阿司匹林+塞来昔布组( $n=11$ )和安慰剂对照组( $n=8$ )三组。同龄雄性野生型 C57BL/6 小鼠为正常对照组( $n=6$ )。正常对照组以常规小鼠饲料喂养,其他三组均以高脂饮食(常规小鼠饲料+21%脂肪+0.15%胆固醇)喂养,并分别给予阿司匹林水溶液、阿司匹林水溶液配制的 1.2%羧甲基纤维素溶液溶解的塞来昔布混悬液、蒸馏水配制的 1.2%羧甲基纤维素溶液灌胃,用前 30 s 摇匀,每日一次。阿司匹林剂量为 61.55 mg/m<sup>2</sup> 体表面积(相当于人 100 mg/d),塞来昔布为 246.2 mg/m<sup>2</sup> 体表面积(相当于人 400 mg/d)。每周称重一次并计算体表面积以调整用药剂量。实验 8 周后以 2%戊巴比妥钠 15 mL/kg 腹腔注射麻醉各组小鼠,右心室取血,1 500 r/min 离心 10 min,取血清置-70℃冰箱待测。再于右心耳剪一小口,用小儿头皮针穿刺左心室,以 4℃预冷的磷酸盐缓冲液(pH 7.3)于生理压力下灌注,至灌流液变清亮为止,游离心脏及主动脉至髂总动脉,参照 Paigen 法<sup>[4]</sup>取部分心脏及主动脉根部用 OCT 包埋后置-70℃冰箱速冻留待冰冻切片,余主动脉置液氮中保存备用。

### 1.2 总胆固醇和甘油三酯的测定

采用酶法分析,用分光光度计(UV-1206,日本导津)测定样本的光密度值,根据标准液与待测样本光密度值之比计算出 TC 及 TG。试剂盒购自上海名典生物工程有限公司(Lot No: 031005)。

### 1.3 主动脉根部粥样硬化病变情况分析

将包埋有小鼠主动脉根部的 OCT 组织块置冰冻切片机上固定,自心底部向主动脉方向作厚 10 μm 的横断面切片,未染色状态下于显微镜下观察,当三个主动脉瓣均出现且管腔基本变圆(图 1A)时将该切片贴于多聚赖氨酸处理过的洁净玻片上,然后隔

70 μm 再贴一片,如此重复 4 次,共留取 5 个切片,涵盖 320 μm 的范围,最后一个切片的镜下所见应为:主动脉瓣近于消失,管腔完全变圆<sup>[4]</sup>。玻片用 4%甲醛溶液固定 10 min 后吹干作油红 O(Sigma 公司)染色。在病理组织实时摄像显微镜系统下采图,运用“多功能真彩色病理图像分析系统”软件(北航图像中心,北京麦克奥迪图像技术有限公司)分析各组织切片的斑块面积,以各小鼠 5 个切片的斑块面积均值为该小鼠的主动脉根部粥样斑块大小。

### 1.4 统计学分析

用 SPSS10.0 软件包建立数据库,组间比较用 One-Way ANOVA 进行统计分析,各指标用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血脂情况

同属载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠的阿司匹林组、阿司匹林+塞来昔布组和安慰剂对照组经高脂饮食及药物灌胃 8 周后,无论总胆固醇还是甘油三酯水平均明显高于正常对照组小鼠。阿司匹林组、阿司匹林+塞来昔布组的总胆固醇水平较安慰剂组降低但甘油三酯水平较安慰剂组升高( $P$  均  $< 0.05$ );而阿司匹林组和阿司匹林+塞来昔布组之间,无论总胆固醇或甘油三酯水平,均无显著性差异(表 1, Table 1)。

表 1. 各组小鼠 16 周龄时的血脂水平 (mmol/L)

Table 1. Serum lipid levels of mice at 16 weeks old

| 分 组        | 总胆固醇                       | 甘油三酯                      |
|------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照组      | 2.34 ± 0.63                | 0.48 ± 0.32               |
| 安慰剂对照组     | 37.75 ± 8.14 <sup>b</sup>  | 2.32 ± 0.67 <sup>b</sup>  |
| 阿司匹林组      | 30.16 ± 5.50 <sup>bc</sup> | 3.38 ± 0.52 <sup>bc</sup> |
| 阿司匹林+塞来昔布组 | 28.60 ± 6.16 <sup>bc</sup> | 2.97 ± 0.61 <sup>bc</sup> |

b:  $P < 0.01$ , 与正常对照组相比; c:  $P < 0.05$ , 与安慰剂对照组相比。

### 2.2 主动脉根部粥样斑块大小

主动脉根部横切面的油红 O 染色显示,正常对照组未见动脉粥样硬化斑块形成,其他三组均可见明显斑块形成。经药物灌胃 8 周后,在斑块面积方面,阿司匹林组、阿司匹林+塞来昔布组均较安慰剂对照组显著减小,而阿司匹林+塞来昔布组又较阿司匹林组进一步减小(图 1B~D);在原管腔面积方面,阿司匹林+塞来昔布组较阿司匹林组小而与安慰剂对照组无差异,阿司匹林组则较安慰剂对照组显著扩大;阿司匹林组及阿司匹林+塞来昔布组的残余管腔均较安慰剂对照组显著扩大,以阿司匹林

组残余管腔最大; 两组的狭窄度均较安慰剂对照组 显著降低(  $P$  均 $< 0.01$ , 表 2, Table 2)。

表 2. 各组小鼠主动脉根部动脉粥样硬化相关参数的定量分析( $\text{mm}^2$ )

Table 2. Quantitative analysis of atherosclerotic lesion in aortic root of mice)

| 分 组        | 斑块面积                          | 原管腔面积                         | 残余管腔面积                        | 斑块面积/ 原管腔面积                 |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 正常对照       | 0.00                          | $0.683 \pm 0.129$             | $0.683 \pm 0.129$             | 0.00                        |
| 安慰剂对照      | $0.105 \pm 0.025$             | $0.717 \pm 0.135$             | $0.612 \pm 0.126$             | $15.08 \pm 3.57$            |
| 阿司匹林       | $0.068 \pm 0.022^{\text{d}}$  | $0.101 \pm 0.142^{\text{ad}}$ | $0.945 \pm 0.145^{\text{ad}}$ | $6.94 \pm 2.36^{\text{ad}}$ |
| 阿司匹林+ 塞来昔布 | $0.042 \pm 0.026^{\text{de}}$ | $0.839 \pm 0.159^{\text{ae}}$ | $0.797 \pm 0.151^{\text{de}}$ | $4.86 \pm 2.85^{\text{ad}}$ |

a:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; d:  $P < 0.01$ , 与安慰剂对照组比较; e:  $P < 0.05$ , 与阿司匹林组比较。

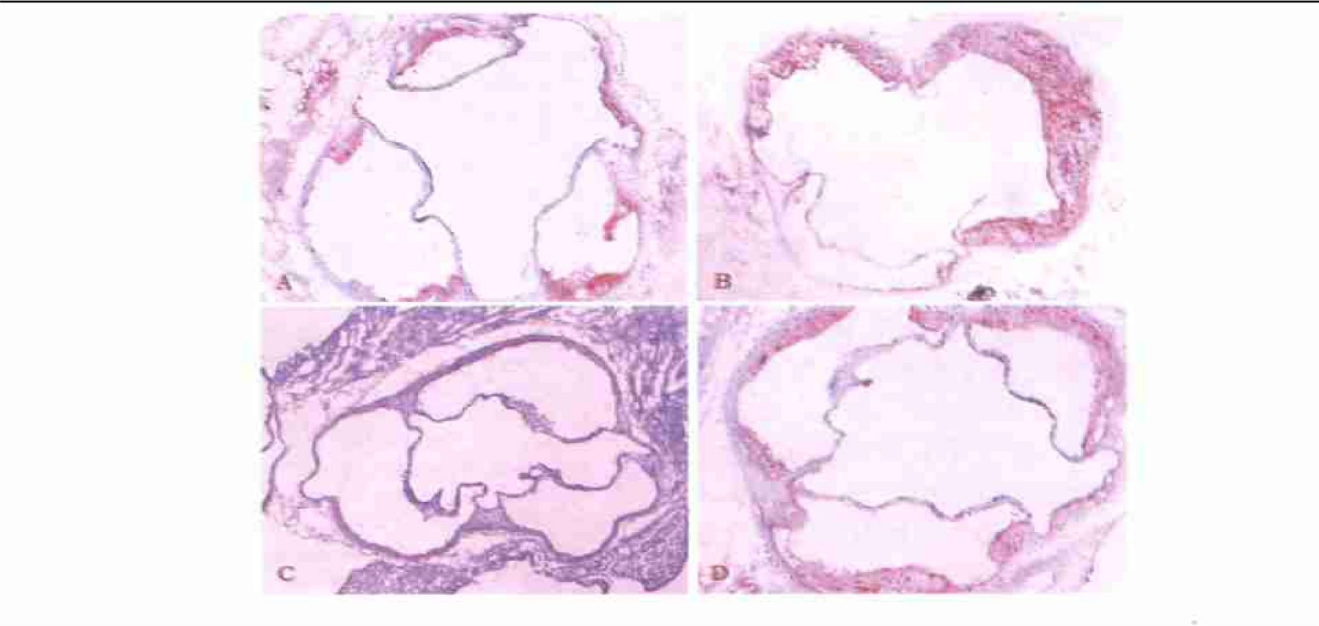


图 1. 主动脉根部动脉粥样硬化病变情况 A 为正常对照组(HE $\times 40$  倍), 显示主动脉根部 As 病变定位取材的起点, 即三个主动脉瓣均出现且管腔基本变圆, 可见该组无 As 病变; B 为安慰剂对照组(油红 O 染色 $\times 40$  倍), 可见明显斑块形成; C 为阿司匹林组(油红 O 染色 $\times 40$  倍), 斑块明显减小; D 为阿司匹林+ 塞来昔布组(油红 O 染色 $\times 40$  倍), 斑块较单用阿司匹林组进一步减小。

Figure 1. Atherosclerotic lesions in aortic root)

3 讨论

动脉粥样硬化的发病机制至今尚未完全阐明, 随着对其分子学机制认识的深入, 学者们发现炎症贯穿于这一多因素疾病的全过程<sup>[1,2]</sup>, 鉴于它是一种涉及多种炎性细胞及炎性细胞因子参与的慢性炎症性疾病, 已有学者提出应将动脉粥样硬化更名为“动脉粥样炎症”(athero-inflammation) 或“动脉粥样硬化炎”(atheroscleritis)<sup>[5,6]</sup>。前列腺素介导局部炎症并调节全身的生理反应, 其合成的限速酶 COX 存在两种形式, 即组成型的 COX1 和诱导型的 COX2, 后者在人粥样硬化斑块中大量表达, 并受多种炎性细胞因子调节, 且其代谢产物也具有促进炎症的作用, 而无粥样硬化的正常血管壁无 COX2 表达<sup>[7,8]</sup>。目前 COX2 已作为 As 防治的新靶点, COX2 表达情况也已

作为评价其他药物有无经炎症机制抗 AS 潜能的一项重要指标<sup>[9,10]</sup>。此外, 由于阿司匹林抵抗现象的存在, 仍有许多患者不能从中获益, 其机制除 COX1 基因单核苷酸多态性所致的个体对药物不敏感之外, 另一重要机制为小剂量阿司匹林未能抑制经 COX2 途径的血栓素 A2 合成<sup>[3,11]</sup>。因此, 从这一角度出发 COX2 也是应积极干预的靶点。

本研究首次报道了小剂量阿司匹林与特异性 COX2 抑制剂塞来昔布联合治疗用于抑制载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠 As 进展的益处。塞来昔布是 COX2 选择性极高的特异性 COX2 抑制剂, 本研究根据塞来昔布能达充分抗炎效应的临床剂量及阿司匹林用于 As 的常规剂量经换算后应用于 8 周龄载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠。主动脉根部是动物实验分析早期 As 病变的经典部位, 本研究根据 Paigen 法<sup>[4]</sup>对主动脉根部病变

进行精确定位和量化分析,将因分析部位欠准确所致的个体差异减至最低,结果更可靠更具可比性。我们的研究结果显示,两治疗组的斑块面积均较安慰剂组明显减小,以阿司匹林+塞来昔布组的斑块面积最小,表明加用塞来昔布较单用小剂量阿司匹林能更大程度上减轻局部As负荷、抑制As病变进展。显然,其机制与加用塞来昔布后对COX2途径产生特异性抑制作用有关,可能包括降低血管渗透性、抑制单核细胞粘附、减轻巨噬细胞的迁移及其化学趋化性、减少促炎因子产生等<sup>[12]</sup>。Burleigh等<sup>[13]</sup>通过将无COX2和有野生型COX2的胎肝细胞移植于低密度脂蛋白受体基因敲除的小鼠,从遗传学上证明巨噬细胞COX2的表达确有促进As的作用,当进一步用特异性COX2抑制剂罗非昔布对10周龄的该小鼠治疗6周后,发现As斑块明显减小,亦支持本研究结果。本研究发现,联合用药组的残余管腔小于单用阿司匹林组,推测其机制可能与局部血管的扩张性重塑作用相对减弱有关,因为抑制COX2可使诱导型一氧化氮合酶生成减少,一氧化氮释放减少<sup>[14]</sup>,有待进一步研究以明确。

在血脂方面,本研究发现,8周的西方饮食使两用药组及安慰剂对照组的血脂水平显著高于正常对照组,两用药组的总胆固醇水平均低于安慰剂对照组,两用药组之间无论总胆固醇、甘油三酯均无显著性差异。这表明载脂蛋白E基因的敲除以及高脂饮食所导致的脂代谢严重紊乱是该As模型的主要机制,而阿司匹林的应用能通过某种机制一定程度上改善其脂代谢紊乱,且加用塞来昔布后这一作用依然存在(我们先前的研究表明塞来昔布不影响高脂饮食载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平,故认为加用塞来昔布组的总胆固醇降低亦归因于阿司匹林)。我们认为,阿司匹林在阻断COX1而抑制血小板激活的同时对脂代谢的有利影响可能是其抑制As进展的又一机制。国内外亦有类似报道<sup>[15,16]</sup>,但关于阿司匹林对脂代谢影响的确切机理目前尚不清楚,推测主要是通过对血小板-前列腺素系统的干预而实现的<sup>[17]</sup>。

可见,特异性COX2抑制剂塞来昔布与小剂量阿司匹林联合应用的治疗方案可同时对As机制的

多个环节进行干预,包括脂质代谢紊乱、血小板活化及血栓形成以及炎症这一中心环节,这样不但有利于阻断As形成及发展的病理基础,而且对稳定斑块、避免阿司匹林抵抗具有重要意义。然而,抗炎干预将不局限于COX2抑制剂,抑制血小板活化也不局限于COX1抑制剂,究竟何为真正适用于临床的理想治疗方案尚需长远探索。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105**(9): 1135-1143
- [3] Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchraht J, Schror K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet*, 1999, **353** (9156): 900
- [4] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, 1987, **68**(3): 231-240
- [5] Altman R. Acute coronary disease Athero-Inflammation: Therapeutic approach. *Thromb J*, 2003, **1**(1): 2
- [6] Li JJ, Fang CH. Atherosclerosis is a more rational term for the pathological entity currently known as atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 2004, **63**(1): 100-102
- [7] Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1999, **155**(4): 1281-291
- [8] MacRae F, Sergio F. Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2002, **13**(5): 497-504
- [9] Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2002, **160**(1): 49-58
- [10] Wu D, Hayek MG, Meydani SN. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J Nutr*, 2001, **131**(2): 382S-388S
- [11] Marc KH, Perry VH. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A2. *Circulation*, 2002, **105**(14): 1620-622
- [12] Jane AM, Timothy DW. Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol*, 1999, **128**(6): 1121-132
- [13] Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*, 2002, **105**(15): 1816-823
- [14] Hori M, Kita M, Torihasi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, **280**(5): G930-G938
- [15] 宋长杰, 张才仁, 周毅. 乙酰水杨酸对实验性动脉粥样硬化形成过程中脂代谢的影响. *湖北医科大学学报*, 1997, **18**(3): 225-229
- [16] Prigge WF, Gebhard RL. Oral acetylsalicylic acid induces biliary cholesterol secretion in the rat. *Lipids*, 1997, **32**(7): 753-758
- [17] Hajjar DP, Marcus AJ, Hajjar KA. Interactions of arterial cells. Studies on the mechanisms of endothelial cell modulation of cholesterol metabolism in co-cultured smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1987, **262**(15): 6976-6981

(此文编辑 胡必利)