

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0745-04

• 实验研究 •

## 阿托伐他汀对高胆固醇饮食兔动脉粥样硬化病变的影响及其机制

张大庆<sup>1</sup>, 赵水平<sup>2</sup>, 周宏年<sup>2</sup>, 李全忠<sup>2</sup>, 聂赛<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第二医院心内科, 辽宁省沈阳市 110032; 2. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学和病理生理学; 他汀类药物抗动脉粥样硬化机制; 原位杂交; 胆固醇; 炎症反应; 白细胞介素 6; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] 目的 探讨阿托伐他汀对兔早期动脉粥样硬化病变的影响及其机制。方法 利用高胆固醇饮食建立动脉粥样硬化兔模型后, 随机给予阿托伐他汀每天 1.5 mg/kg 或淀粉, 2 周后测定主动脉的内膜、中膜厚度和内膜中膜厚度比。采用原位杂交法检测动脉壁单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达情况。采用酶联免疫吸附法检测血浆中白细胞介素 6 的水平。结果 血浆白细胞介素 6 水平与血浆低密度脂蛋白胆固醇水平呈显著正相关( $r = 0.852, P < 0.01$ )。与淀粉组比较, 阿托伐他汀组外周血白细胞介素 6 水平显著降低 55%, 动脉粥样硬化面积明显减少 ( $52.5\% \pm 4.2\%$  比  $81.9\% \pm 2.8\%, P < 0.01$ ), 内膜厚度显著降低 ( $24.18 \pm 10.21 \mu\text{m}$  比  $77.51 \pm 22.47 \mu\text{m}, P < 0.01$ ), 内膜单核细胞趋化蛋白 1 阳性细胞数显著减少 ( $29 \pm 5$  个/HP 比  $49 \pm 17$  个/HP,  $P < 0.01$ )。动脉内膜厚度与其单核细胞趋化蛋白 1 阳性细胞数显著相关 ( $r = 0.831, P < 0.01$ )。结论 高胆固醇血症可诱发炎症反应, 阿托伐他汀具有抗动脉粥样硬化效应, 该效应不仅与降低血浆胆固醇水平相关, 而且与其降低血浆白细胞介素 6 水平、减少动脉壁单核细胞趋化蛋白 1 表达密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Potential Mechanism and Influence of Atorvastatin on Atherosclerotic Lesion of High Cholesterol Diet Fed Rabbits

ZHANG Da-Qing<sup>1</sup>, ZHAO Shui-Ping<sup>2</sup>, ZHOU Hong-Nian<sup>2</sup>, LI Quan-Zhong<sup>2</sup>, and NIE Sai<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, 2nd Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110032; 2. Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Anti-atherosclerotic Effects; Cholesterol; Inflammation; Interleukin 6; Monocyte Chemotactic Protein 1; In Situ Hybridization

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects and potential mechanisms of atorvastatin on atherosclerotic lesion of hypercholesterolemic rabbits. **Methods** Fourteen male New Zealand rabbits were randomly divided into normal diet group ( $n = 4$ ), high cholesterol diet group ( $n = 10$ ). After 8 weeks, high cholesterol diet rabbits were randomly switched to receive either atorvastatin 1.5 mg/(kg·d) ( $n = 5$ ) or starch ( $n = 5$ ). Two weeks later, the aortas of all rabbits were removed under deep anesthesia. The distal portion of aorta to the iliac bifurcation was exercised for hematoxylin-eosin staining and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) mRNA detection by in situ hybridization. Atherosclerotic area, intima and media thickness were measured by experienced pathologist using BeiHang pathology imaging analysis system. MCP-1 expression was expressed as average positive cell counts per ten HP. Plasma interleukin (IL-6) levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Plasma IL-6 levels positively correlated with plasma low density lipoprotein cholesterol (LDLC) levels ( $r = 0.852, P < 0.01$ ). Compared with starch group, atorvastatin treatment decreased plasma IL-6 levels by 55% and resulted in the decreased atherosclerotic area ( $52.5\% \pm 4.2\%$  vs  $81.9\% \pm 2.8\%, P < 0.01$ ) and reduced intima thickness ( $24.18 \pm 10.21 \mu\text{m}$  vs  $77.51 \pm 22.47 \mu\text{m}, P < 0.01$ ). Additionally, atorvastatin treatment led to MCP-1 positive cell counts decreased in aorta intima ( $29 \pm 5$  /HP vs  $49 \pm 17$  /HP,  $P < 0.01$ ). Intima thickness of aorta was positively correlated with MCP-1 mRNA expression in intima ( $r = 0.831, P < 0.01$ ). **Conclusion** Hypercholesterolemia may induce systemic inflammation. Atorvastatin treatment can take anti-atherosclerotic effects possibly through reducing plasma cholesterol levels and inhibiting plasma IL-6 and MCP-1 expression in intima.

[收稿日期] 2005-01-18 [修回日期] 2005-10-30

[作者简介] 张大庆, 博士, 主治医师, 讲师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 zhangdaqing@vip.163.com。赵水平, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化, E-mail 为 zhaosp@medmail.com.cn。周宏年, 主管技师, 研究方向为血脂代谢。

白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种具有多种功能的促炎症因子, 在动脉粥样硬化发病过程中具有重要作用<sup>[1]</sup>。单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 是由血管壁细胞分泌的重要的趋化因子, 参与单核细胞进入内皮下以及泡

沫细胞形成<sup>[2]</sup>。人群研究提示,他汀类药物不仅可以降低血脂,亦可降低与炎症反应相关的指标如C反应蛋白和粘附分子等<sup>[3]</sup>。但他汀类药物的抗炎作用与降脂作用的关系以及其抗炎作用的意义目前仍不清楚。本研究采用高胆固醇饮食建立兔动脉粥样硬化模型,观察阿托伐他汀对血浆IL-6水平和动脉壁MCP-1表达的影响及其与动脉粥样硬化病变的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 动脉粥样硬化兔模型建立

14只3月龄的健康雄性新西兰兔购自中南大学湘雅二医院实验动物中心,通过高胆固醇饮食来建立动脉粥样硬化模型<sup>[4]</sup>。随机给10只兔喂高胆固醇饮食(1%胆固醇、7.5%蛋黄粉、8%脂肪),正常组兔( $n=4$ )进食普通饲料。第8周再次测血脂和体重,第9周开始随机给高胆固醇饮食兔分别服用阿托伐他汀每天1.5 mg/kg ( $n=5$ )或淀粉每天1.5 mg/kg ( $n=5$ ) (每天均在下午4时灌胃),2周后复测血脂及体重,结束动物实验。采用酶法在日立7170A型全自动生物化学分析仪上检测血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的水平。

### 1.2 酶联免疫吸附法检测白细胞介素6

采用酶联免疫吸附试剂盒(Genzyme, USA)测定血浆IL-6的水平,其检测IL-6的灵敏度达10 ng/L,该检测试剂盒与其他细胞分子无交叉反应。严格按试剂盒和酶标仪说明书步骤进行操作。

### 1.3 组织形态学定量分析

将主动脉从根部分离至腹主动脉分叉处离断并纵行剖开,进行苏丹Ⅳ染色以了解动脉粥样硬化面积,取远端1.5 cm进行常规石蜡包埋、切片,进行苏木素-伊红(HE)染色。由有经验的病理科医生利用北航病理图像分析系统进行动脉粥样硬化面积测定,对HE染色标本在高倍镜下随机选取5个视野,测定动脉壁内膜、中膜厚度。

### 1.4 原位杂交检测单核细胞趋化蛋白1 mRNA的表达

检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。MCP-1寡核苷酸探针序列为5'-CTC AGC CAG ATG CAA TCA ACG CCC ACT CA-3'和5'-ATC ACC AGC AGC AAG TGT CCA AAG AAG CT-3',将其用地高辛标记,采用DAB显色系统显色。胞浆呈棕黄色为阳性,在高倍显微镜下计数动脉内膜10个视野的

阳性细胞数,取平均值来对MCP-1的原位杂交结果进行半定量分析。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件包进行统计分析,主要指标均进行正态性检验,正态分布的统计指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。非正态分布数据采用Mann-Whitney  $U$ 检验进行2组间比较。相关分析采用Pearson或Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血脂和体重的比较

在试验开始时各组兔的血脂和体重差异均无显著性。高胆固醇饮食8周后与之前比较,兔血浆总胆固醇( $18.45 \pm 2.58$ 比 $1.60 \pm 0.25$  mmol/L)和低密度脂蛋白胆固醇( $8.09 \pm 0.93$ 比 $0.69 \pm 0.12$  mmol/L)显著升高( $P < 0.01$ ),而正常饮食组血浆总胆固醇( $1.46 \pm 0.35$ 比 $1.10 \pm 0.26$  mmol/L)和低密度脂蛋白胆固醇( $0.58 \pm 0.23$ 比 $0.38 \pm 0.19$  mmol/L)均无显著变化( $P > 0.05$ )。阿托伐他汀干预2周后,总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇分别下降56.6%和45.6% ( $P < 0.05$ ),而淀粉组的血浆总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平无显著变化。甘油三酯在整个实验过程中无显著变化。各组兔的体重在实验过程中增长,3组间差异无显著性。

### 2.2 各组兔主动脉病理形态学改变

正常饮食组、淀粉组和阿托伐他汀组动脉粥样硬化面积分别为0%、 $81.9\% \pm 2.8\%$ 和 $52.5\% \pm 4.2\%$ ,3组之间差异存在显著性( $P < 0.01$ )。与淀粉组相比,阿托伐他汀组动脉粥样硬化面积减少36%(图1, Figure 1)。

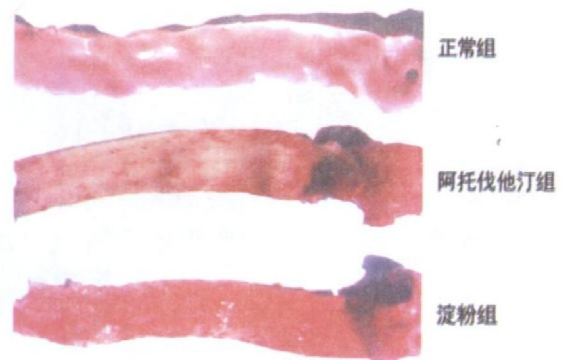


图1. 实验结束时各组兔主动脉粥样硬化病变情况(苏丹Ⅳ染色) 红色为动脉粥样硬化病变。

Figure 1. Aortic atherosclerotic lesions from all rabbits at the end of experiment



各组动脉 HE 染色显示淀粉组主动脉内膜明显增厚, 内含较多的泡沫细胞, 而阿托伐他汀组动脉病变明显减轻。与淀粉组相比, 阿托伐他汀治疗可以

使高胆固醇兔的动脉内膜厚度、内膜中膜比值分别下降达 31.2% 和 30.5% ( $P < 0.01$ ), 而各组主动脉中膜厚度差异无显著性(表 1, Table 1)。

表 1. 各组兔主动脉病理形态改变 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Histological morphometric quantitative analysis of aorta from all rabbits

分 组	n	As 面积 <sup>a</sup>	内膜厚度 ( $\mu\text{m}$ ) <sup>a</sup>	中膜厚度 ( $\mu\text{m}$ )	内膜中膜厚度比 <sup>a</sup>	MCP-1 阳性细胞(个) <sup>a</sup>
正常组	4	0	4.66 $\pm$ 0.78	147.36 $\pm$ 51.76	0.033 $\pm$ 0.010	0
淀粉组	5	81.9% $\pm$ 2.8%	77.51 $\pm$ 22.47	168.44 $\pm$ 21.97	0.475 $\pm$ 0.192	49 $\pm$ 17
阿托伐他汀组	5	52.5% $\pm$ 4.2%	24.18 $\pm$ 10.21	174.87 $\pm$ 29.49	0.145 $\pm$ 0.076	29 $\pm$ 5

a:  $P < 0.01$ , 3 组间差异存在显著性。

### 2.3 动脉壁单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达

正常组兔主动脉内膜和中膜未见 MCP-1 mRNA 表达, 而在阿托伐他汀组和淀粉组的主动脉内膜、中膜和外膜都可见到 MCP-1 mRNA 表达, 但均以内膜为主(图 2, Figure 2)。而且高倍镜下 MCP-1 mRNA 的阳性细胞数在阿托伐他汀组和淀粉组分别为 29  $\pm$  5 个/HP 和 49  $\pm$  17 个/HP ( $P < 0.01$ ) (表 1, Table 1), MCP-1 阳性细胞数与动脉内膜厚度呈正相关关系( $r = 0.831$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.4 各组兔外周血白细胞介素 6 水平的变化

实验开始时各组血浆 IL-6 水平差异无显著性。第 8 周时, 正常组血浆 IL-6 水平较前无明显变化, 高胆固醇饮食兔血浆 IL-6 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。阿托伐他汀干预 2 周后, 血浆 IL-6 水平下降 55%, 淀粉组血浆 IL-6 水平较前无明显变化(表 2, Table 2)。兔血浆 IL-6 水平与其血浆低密度脂蛋白胆固醇水平密切相关( $r = 0.852$ ,  $P < 0.01$ )。同时, 兔血浆 IL-6 水平与动脉壁 MCP-1 阳性细胞数呈显著正相关( $r = 0.846$ ,  $P < 0.01$ )。

表 2. 各组兔血浆白细胞介素 6 (ng/L) 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Plasma IL-6 levels of all rabbits at all stages of experiment

分 组	n	0 周	8 周	干预 2 周
正常组	4	4.02 $\pm$ 1.72	6.65 $\pm$ 5.60	10.82 $\pm$ 5.55 <sup>b</sup>
淀粉组	5	6.36 $\pm$ 4.85	83.87 $\pm$ 6.00 <sup>a</sup>	85.17 $\pm$ 7.95 <sup>b</sup>
阿托伐他汀组	5	4.12 $\pm$ 2.62	80.66 $\pm$ 6.78 <sup>a</sup>	38.31 $\pm$ 9.45 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与正常比较, b:  $P < 0.01$ , 三组间比较。

## 3 讨论

他汀类药物在动脉粥样硬化疾病的防治过程中具有重要作用。但临床研究表明他汀类药物的临床效益并不能完全由其降脂作用来解释, 提示他汀类

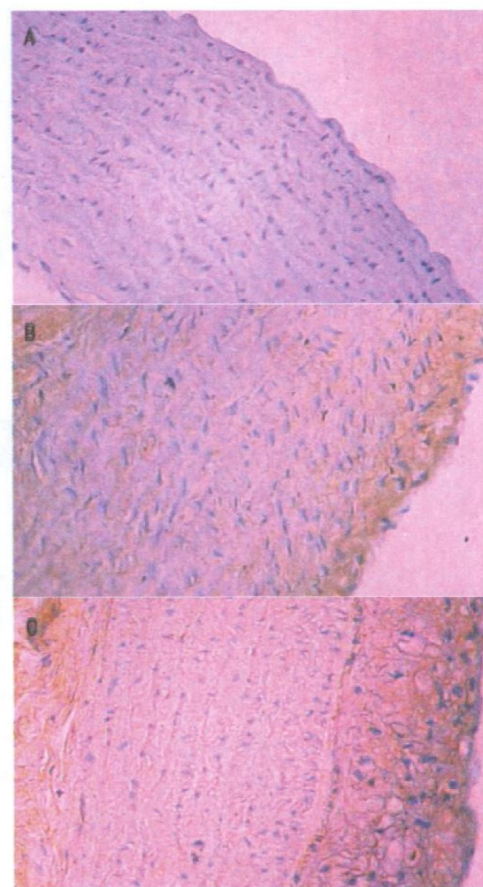


图 2. 各组兔主动脉单核细胞趋化蛋白 1 原位杂交结果

DAB 染色棕黄色为阳性结果, 并经苏木素复染。A 为正常组, B 为阿托伐他汀组, C 为淀粉组。

Figure 2. In situ hybridization for MCP-1 mRNA expressions of aorta from all rabbits

药物具有降脂外效应<sup>[5,6]</sup>。本研究显示高胆固醇血症可以诱发机体炎症反应, 阿托伐他汀治疗可使动脉粥样硬化病变明显减轻, 该效应不仅与其降低血胆固醇水平有关, 而且与其降低血浆促炎因子 IL-6 的水平及动脉内膜 MCP-1 的表达相关。

动脉粥样硬化疾病是一种慢性炎症性疾病,血脂异常是其重要的危险因素。最近, Han 等<sup>[7]</sup>研究表明高脂肪和高胆固醇饮食可明显增加动脉粥样硬化相关炎症因子的释放。Namik 等<sup>[8]</sup>利用转基因动物研究发现,当 MCP-1 在血管壁过度表达与高胆固醇血症同时存在时,才能促进动脉粥样硬化的发生和发展。在本研究中,我们观察到兔外周血中促炎因子 IL-6 水平和动脉壁 MCP-1 的表达均与血浆胆固醇水平的变化密切相关,进一步证明高胆固醇血症可以直接诱发机体炎症反应,增加炎症介质的释放和表达。另外,我们亦观察到 IL-6 水平和动脉壁 MCP-1 mRNA 的表达与动脉内膜厚度和动脉粥样硬化面积亦呈显著正相关,直接证明了高胆固醇血症与其所诱发的炎症反应共同作用在动脉粥样硬化病变成过程中具有重要作用。同时,本研究结果显示阿托伐他汀干预组的动脉粥样硬化面积较对照组明显减少,动脉内膜厚度、内膜中膜比值均显著降低,内膜巨噬细胞、泡沫细胞明显减少,说明阿托伐他汀治疗确具有抗动脉粥样硬化病变的作用。

动脉粥样硬化病变的减轻与其血浆促炎症因子 IL-6 的水平、动脉壁 MCP-1 mRNA 表达的下降密切相关,说明阿托伐他汀的抗炎作用在其抗动脉粥样硬化病变成过程中具有重要作用。而血浆 IL-6 水平的降低和 MCP-1 表达的减少与血胆固醇水平的降低有一定关系。最近研究表明氧化型低密度脂蛋白可促进动脉壁 MCP-1 的表达,而且低密度脂蛋白胆固醇水平的降低会导致循环中氧化型低密度脂蛋白生成减少,从而降低了氧化型低密度脂蛋白所诱发的巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞释放的促炎症因子<sup>[9,10]</sup>,支持他汀类的抗炎作用部分依赖于其降脂作用;但最近 Plenge 等<sup>[11]</sup>在对血脂正常的冠心病患者的研究中发现,辛伐他汀的抗炎作用与其降脂效应无关。两个研究结果的不同可能是由于研究对象的血浆胆固醇水平存在显著差异。已有研究表明,不同的血浆胆固醇水平对细胞功能以及机体的炎症反应的影响亦不同,我们既往研究显示高浓度的血浆胆固醇水平会损伤脂肪细胞、激发脂肪细胞炎症反应,增加促炎症因子 IL-6<sup>[12]</sup>。因此,本研究结果进一步提示在血胆固醇水平显著升高的情况下,他汀类药物的抗炎作用至少部分依赖于其降脂效应。

另外,在单核细胞、平滑肌细胞以及内皮细胞的离体研究表明,他汀类药物具有直接的抗炎作用。我们亦观察到他汀类药物在在血总胆固醇水平仍然高于正常水平的情况下,阿托伐他汀干预组的血浆 IL-6 水平和动脉壁 MCP-1 的表达有明显下降,动脉粥样硬化病变有明显的改善,提示阿托伐他汀的抗动脉粥样硬化作用不仅局限于其对血浆胆固醇水平的影响,而且可能与其直接抗炎作用密切相关。

总之,高胆固醇血症可诱发机体的炎症反应,导致血浆 IL-6 水平升高和动脉壁 MCP-1 表达增加,促进动脉粥样硬化的发生、发展。阿托伐他汀治疗可降低血浆 IL-6 的水平和动脉壁 MCP-1 的表达,这在其抗动脉粥样硬化病变的形成中具有重要作用。同时,在血胆固醇水平显著升高的情况下,他汀类药物的抗炎作用与其降胆固醇效应密切相关。

#### [参考文献]

- [1] Bemudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM. Interrelationship among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1 668-673
- [2] Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein 1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 1 121-127
- [3] Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med*, 2001, **344**: 1 959-965
- [4] 余艳辉, 瞿湘萍, 李智, 郭兆贵. 兔高脂蛋白血症模型建立及动脉粥样硬化斑块形成的方法学. *中国药理学通报*, 1998, **14** (5): 473-474
- [5] Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol*, 2001, **77**: 247-253
- [6] 秦晋梅, 李建军. 他汀类药物的抗炎作用. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 363-366
- [7] Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, 2002, **43** (3): 445-452
- [8] Namik M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, et al. Local over-expression of monocyte chemoattractant protein 1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 115-120
- [9] Jovinge S, Ares MPS, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF- $\alpha$  in response to ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 1 573-579
- [10] Fumkranz A, Schober A, Bochkov VN, Bashtrykov P, Kronke G, Kadl A, et al. Oxidized Phospholipids Trigger Atherogenic Inflammation in Murine Arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (3): 633-638
- [11] Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM, Poirier P, Grunwald GK, Marcovina SM, et al. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation*, 2002, **106**: 1 447-452
- [12] Zhao SP, Zhang DQ. Atorvastatin reduces interleukin-6 plasma concentration and adipocytes secretion of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta*, 2003, **336** (1-2): 103-108

(此文编辑 朱雯霞)