

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0132-05

阿托伐他汀对高胆固醇血症兔主动脉环氧合酶 2 的影响

邓平^{1,2}, 赵水平¹, 戴海鹰¹, 黄红光¹, 洪绍彩¹, 吴智鸿¹

(1. 中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 2. 长沙市中心医院心内科, 湖南省长沙市 410014)

[关键词] 药理学; 阿托伐他汀对动脉粥样硬化炎症的影响; 逆转录聚合酶链反应; 环氧合酶 2; 阿托伐他汀; 高胆固醇血症; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 检测环氧合酶 2 在高胆固醇血症兔主动脉粥样硬化中的表达, 探讨阿托伐他汀对环氧合酶 2 表达的影响及其意义。方法 选取健康雄性新西兰兔 24 只, 随机分为正常饮食组 ($n=8$) 和高胆固醇饮食组 ($n=16$), 喂养 8 周后, 将后者随机分为高胆固醇血症组 ($n=8$) 和阿托伐他汀组 [$2.5 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, $n=8$], 继续喂养 6 周后, 取各组兔主动脉, 行动脉粥样硬化病变面积测定, 采用逆转录聚合酶链反应检测主动脉环氧合酶 2 mRNA 的表达, 酶联免疫吸附法测定血清白细胞介素 6 水平, 免疫组织化学法测定主动脉粥样硬化斑块中环氧合酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达。结果 高胆固醇饮食兔经阿托伐他汀干预 6 周后, 动脉粥样硬化斑块面积较高胆固醇血症组显著缩小 ($43.0\% \pm 12.5\%$ 比 $83.0\% \pm 11.6\%$, $P < 0.05$)。高胆固醇饮食兔主动脉环氧合酶 2 mRNA 表达较正常饮食兔明显增强 (1.03 ± 0.09 比 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$), 阿托伐他汀干预后明显下降 (0.57 ± 0.10 , $P < 0.05$), 且主动脉环氧合酶 2 mRNA 表达与斑块面积和血清白细胞介素 6 水平均呈正相关 (r 分别为 0.803 和 0.795, P 均 < 0.05)。高胆固醇血症组 14 周时主动脉粥样硬化斑块中环氧合酶 2 蛋白表达明显增强, 而阿托伐他汀组显著性降低 ($62.4\% \pm 8.5\%$ 比 $34.3\% \pm 8.8\%$, $P < 0.05$), 且环氧合酶 2 蛋白表达与基质金属蛋白酶 9 的蛋白表达呈正相关 ($r = 0.887$, $P < 0.05$)。结论 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化的发生和发展中可能起重要的促进作用, 阿托伐他汀可能通过降低高胆固醇血症兔主动脉及其粥样斑块中环氧合酶 2 的表达, 抑制基质金属蛋白酶 9 和白细胞介素 6 的分泌, 从而发挥降脂以外的抗炎症作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Influence and Significance of Atorvastatin on Cyclooxygenase-2 in Aortas From Hypercholesterolemic Rabbits

DENG Ping^{1,2}, ZHAO Shu-Ping¹, DAI Hai-Ying¹, HUANG Hong-Guang¹, HONG Shao-Cai¹, and WU Zhi-Hong¹

(1. Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Cardiology, Changsha Central Hospital, Changsha 410014; China)

[KEY WORDS] Cyclooxygenase-2; Atorvastatin; Hypercholesterolemia; Atherosclerosis; Interleukin 6; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of atorvastatin on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and other proinflammatory molecules in a rabbit model of atherosclerosis and to further explore the potential mechanism of atorvastatin in anti-atherosclerotic inflammation beyond the lowering lipid. **Methods** Twenty-four male New Zealand rabbits (3 months old) were fed with normal diet ($n=8$) and high cholesterol diet ($n=16$) respectively for 8 weeks, and then the high cholesterol diet rabbits were assigned to receive either atorvastatin $2.5 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ($n=8$) or starch ($n=8$). 6 weeks later, aortas were removed under deep anesthetization. The femoral arteries were removed to determine COX-2 mRNA by reverse transcription polymerase chain reaction and the level of COX-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) protein by immunohistochemistry. Atherosclerotic lesions were measured by experienced pathologist under Beihang Pathology Imaging Analysis System in aortas from hypercholesterolemic rabbits. Plasma interleukin 6 (IL-6) levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with placebo-treated group, atherosclerotic area was reduced in atorvastatin-treated group ($43.0\% \pm 12.5\%$ vs $83.0\% \pm 11.6\%$, $P < 0.05$). COX-2 mRNA expression in aortas from hypercholesterolemic rabbits were significantly increased compared with those from normal rabbits, and significantly reduced by the treatment of atorvastatin (1.03 ± 0.09 vs 0.57 ± 0.10 , $P < 0.05$), and the levels of COX-2 mRNA expression were related to both atherosclerotic area and plasma IL-6 levels ($r = 0.803$ and 0.795 , both $P < 0.05$). Expression of COX-2 protein in atherosclerotic plaques were significantly increased and reduced by the treatment of atorvastatin ($62.4\% \pm 8.5\%$ vs $34.3\% \pm 8.8\%$, $P < 0.05$), and the levels of COX-2 were related to the levels of MMP-9 in atherosclerotic plaques ($r = 0.815$, $P < 0.05$). **Conclusion** In hypercholesterolemic

[收稿日期] 2005-01-03

[修回日期] 2006-01-19

[作者简介] 邓平, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病、动脉粥样硬化与炎症的研究。E-mail 为 dengping2115@yahoo.com.cn。赵水平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血脂、冠心病、动脉粥样硬化与炎症的研究, E-mail 为 zhaosp@medmail.com.cn。戴海鹰, 主任医师, 主要从事冠心病、动脉粥样硬化与炎症的研究。

rabbits, atorvastatin can decrease circulating IL-6 level and MMP-9 level in plaque, and the potential mechanism of atorvastatin in anti-atherosclerotic inflammation may be through the COX-2 signal pathway.

动脉粥样硬化实质是一种慢性炎症性疾病, 炎症参与了动脉粥样硬化斑块的形成和进展。环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是前列腺素这一重要组织源性炎症介质合成的限速酶, 其表达受多种促炎因子的诱导, 主要存在于炎症细胞中, 如组织损伤后的内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和成纤维细胞中。研究表明, 在人类动脉粥样硬化血管中的单核/巨噬细胞、中层平滑肌细胞和内皮细胞中 COX-2 广泛表达^[1,2], COX-2 能促进动脉粥样硬化^[3]。他汀类药物为 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 目前认为他汀类药物具有降脂以外的抗炎作用^[4,5], 但其机制尚不清楚。本研究通过建立高胆固醇血症兔的模型来观察阿托伐他汀对动脉粥样斑块中 COX-2 表达的影响, 并检测斑块中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 和血清中白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 水平, 以进一步探讨他汀类药物的抗炎作用及其机制。

末复测体重和采血, 并在深麻醉状态下 (苯巴比妥钠 25 mg/kg, Sigma 公司) 采用 PBS (含 1% DEPC) 从左心室充分灌洗, 切开右心室。将主动脉从根部分离至腹主动脉分叉处离断, 主动脉根部至主动脉弓部迅速冻存于液氮中, 纵行剖开主动脉, 取主动脉远端 1.5 cm 置于 4% 多聚甲醛液中固定 3 h, 石蜡包埋。

1.2 组织形态学观察

石蜡包埋标本进行切片, 按常规方法进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 高倍显微镜下观察内膜的病理变化; 将离断的主动脉纵行剖开, 苏丹 III 染色, 由病理科医生采用北航病理图像分析系统进行动脉粥样硬化斑块面积测定。

1.3 血脂检测

采用酶法测定血清总胆固醇 (total cholesterol,

TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 浓度, 化学遮蔽法测定血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 浓度。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测主动脉环氧合酶 mRNA 的表达

将主动脉冻存块在液氮中碾磨成粉状, 加入 1 mL Trizol (Invitrogen 公司) 中, 处理成组织匀浆, 严格按试剂盒说明书要求提取总 RNA。按逆转录试剂盒 (Promega 公司) 要求, 将 6 μ L 总 RNA 逆转录成 cDNA。特异性引物序列来自 Genebank, 由上海生物工程技术有限公司合成。COX-2 上下游引物序列分别为 5'-TACTACATACGGTGTTAGAG-3' 和 5'-TTCCAGTAGTATAGAG-3', 产物大小为 354 bp, 内参 Cyclophin 的上下游引物序列分别为 5'-ATGGTCAACCCACCCGTGTTCTTCG-3' 和 5'-CGTGTGAAGT-CACCACCCCTGACACA-3', 产物大小为 206 bp。PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

单克隆抗兔 COX-2 和 MMP-9 抗体 (一抗) 以及生物素化山羊抗兔 IgG (二抗) 均由博士德公司提供。将石蜡包埋的标本切片 (每片厚度为 4 μ m), 52 $^{\circ}$ C 烘烤 2 h, 松节油和梯度酒精脱蜡, 于 5% 双氧水中灭活内源性过氧化物酶, 于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中煮 15 min 进行热抗原修复, 5% 白蛋白封闭抗原 20 min, 一抗结合 60 min, 二抗结合 20 min, SABC 结合 20 min 后, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 中性树胶封片。DAB 显色阳性结果为细胞浆呈棕黄色, 在高倍显微镜下计数动脉内膜 5 个视野的阳性细胞数的百分比, 取平均值, 并分别对 COX-2 和 MMP-9 的免疫组织化学结果进行半定量分析。

1.7 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进

行统计分析,主要统计指标均进行正态性检验,正态分布数据组间比较采用方差分析。相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组兔基本情况比较

各组兔 0 周时血脂和体重无显著性差异。高胆固醇饮食 8 周后,血清 TC 和 LDLC 显著升高 ($P < 0.05$),而正常饮食组血清 TC 和 LDLC 无显著变化。阿托伐他汀干预 6 周后,血清 TC 和 LDLC 分别下降 54% 和 56%,而高胆固醇血症组血清 TC 和 LDLC 水平无显著变化。TG 在整个实验过程中无显著变化。各组兔体重在实验过程中正常增长,三组间无显著性差异(表 1)。

表 1. 各组兔血脂和体重水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

指 标	正常饮食组	高胆固醇血症组	阿托伐他汀组
TC (mmol/L)			
0 周	1.72 ± 0.27	1.85 ± 0.24	1.83 ± 0.26
8 周	1.76 ± 0.72	27.76 ± 0.97 ^a	26.5 ± 2.47 ^a
14 周	1.74 ± 0.81	26.74 ± 1.33	12.08 ± 4.11 ^b
LDLC (mmol/L)			
0 周	0.58 ± 0.19	0.77 ± 0.11	0.83 ± 0.20
8 周	0.62 ± 0.15	14.52 ± 3.33 ^a	13.67 ± 4.08 ^a
14 周	0.68 ± 0.18	15.08 ± 2.31	5.96 ± 2.25 ^b
体重 (g)			
0 周	2387 ± 201	2392 ± 192	2401 ± 214
8 周	2917 ± 89	2876 ± 102	2905 ± 95
14 周	3210 ± 77	3299 ± 97	3122 ± 62

a 为 $P < 0.05$, 与正常饮食兔比较; b 为 $P < 0.05$, 与正常饮食组和高胆固醇血症组比较。

2.2 各组兔主动脉病理形态学变化

正常饮食组兔主动脉壁内膜光滑完整、无脂质条纹;高胆固醇血症组兔主动脉内膜粗糙、布满脂质条纹,以主动脉近端为主;阿托伐他汀组兔主动脉内膜脂质条纹较高胆固醇血症组明显减轻(图 1)。三组的主动脉粥样硬化斑块面积百分数分别为 0、83.0% ± 11.6% 和 43.0% ± 12.5%,三组之间差异显著(P 均 < 0.05)。HE 染色显示,正常饮食组主动脉内膜光滑、连续、内皮细胞完整;高胆固醇血症组主动脉内膜明显增厚,含较多泡沫细胞,内皮细胞过度增殖;阿托伐他汀组主动脉内膜改变较高胆固醇血症组明显减轻(图 2)。



图 1. 各组兔主动脉粥样硬化病变比较 ($n=8$) A 为正常饮食组, B 为高胆固醇血症组, C 为阿托伐他汀组。

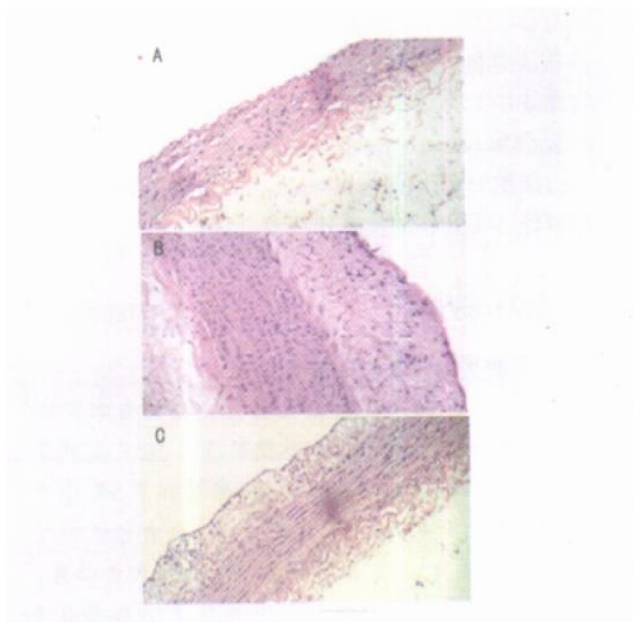


图 2. 各组兔主动脉内膜比较 ($n=8$) A 为正常饮食组, B 为高胆固醇血症组, C 为阿托伐他汀组。

2.3 主动脉环氧合酶 2mRNA 表达水平

正常饮食组、高胆固醇血症组和阿托伐他汀组 COX-2 mRNA 的表达量分别为 0.09 ± 0.01 、 1.03 ± 0.09 和 0.57 ± 0.10 ,三组间比较差异显著(P 均 < 0.05),见图 3。且 COX-2 mRNA 的表达水平与动脉粥样硬化面积显著正相关($r = 0.803$, $P < 0.05$)。

2.4 血清白细胞介素 6 水平

三组 0 周时血清 IL-6 水平无显著性差异;高胆固醇饮食 8 周后血清 IL-6 水平显著升高;阿托伐他汀干预 6 周后,IL-6 水平明显下降($P < 0.05$),见表 2。血清 IL-6 水平与主动脉 COX-2 mRNA 表达水平显著正相关($r = 0.795$, $P < 0.05$)。

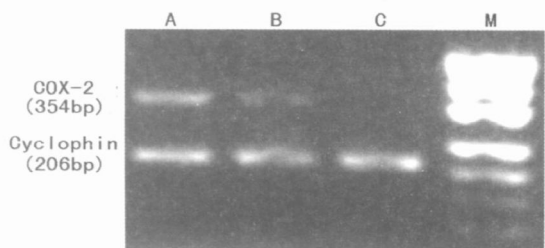


图 3. 各组兔主动脉环氧合酶 2 mRNA 的表达水平 (n = 8)

A 为高胆固醇血症组, B 为阿托伐他汀组, C 为正常饮食组, M 为标准分子量 DNA。

2.5 主动脉粥样硬化斑块中环氧合酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达

正常饮食兔主动脉 COX-2 仅极低水平表达, 而高胆固醇饮食兔主动脉粥样斑块中 COX-2 表达显

著增强。高胆固醇血症组主动脉粥样硬化斑块中 COX-2 和 MMP-9 的表达分别为 62.4% ± 8.5% 和 43.5% ± 4.9%, 阿托伐他汀组主动脉粥样硬化斑块中 COX-2 和 MMP-9 的表达分别为 34.3% ± 8.8% 和 19.5% ± 5.9%, 与高胆固醇血症组比较, 均显著降低 (P 均 < 0.05)。主动脉粥样硬化斑块中 COX-2 的表达与 MMP-9 的表达呈正相关 (r = 0.815, P < 0.05)。见图 4、图 5 和图 6。

表 2. 各组兔血清白细胞介素 6 水平 (n = 8, ng/L)

分 组	0 周	8 周	14 周
正常饮食组	3.85 ± 1.64	4.14 ± 1.12	4.09 ± 1.97
高胆固醇血症组	4.08 ± 1.07	95.47 ± 7.18 ^a	99.12 ± 6.52
阿托伐他汀组	3.94 ± 2.08	102.42 ± 8.21 ^a	32.11 ± 6.11 ^b

a 为 P < 0.05, 与 0 周比较; b 为 P < 0.05, 与 8 周比较。

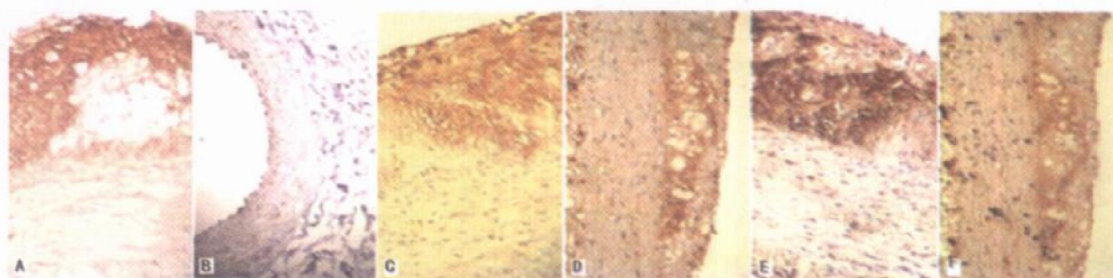


图 4. 环氧合酶 2 和基质金属蛋白酶 9 在主动脉粥样硬化斑块中的表达 A 和 B 分别为高胆固醇饮食和正常饮食兔主动脉环氧合酶 2 的免疫组织化学染色 (400×), C 和 D 分别为高胆固醇血症组和阿托伐他汀组兔主动脉环氧合酶 2 的免疫组织化学染色 (400×), E 和 F 分别为高胆固醇血症组和阿托伐他汀组兔主动脉基质金属蛋白酶 9 的免疫组织化学染色 (400×)。

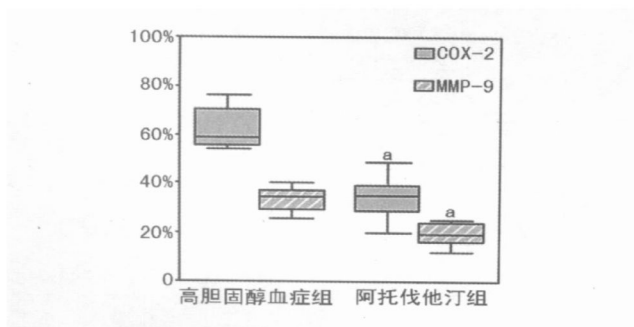


图 5. 环氧合酶 2 和基质金属蛋白酶 9 在主动脉粥样硬化斑块中的表达 (n = 8) a 为 P < 0.05, 与高胆固醇血症组比较。

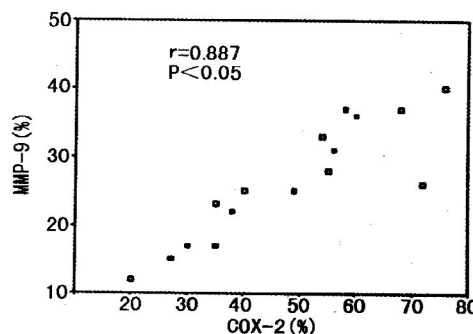


图 6. 主动脉粥样硬化斑块中环氧合酶 2 与基质金属蛋白酶 9 的相关性

3 讨论

近来的研究已证实, 炎症参与了动脉粥样硬化斑块的形成和进展。本研究发现, COX-2 在粥样硬

化的主动脉及主动脉斑块中表达(基因和蛋白水平)增强。因此, COX-2 可能与动脉粥样硬化的病理生理过程密切相关。COX-2 正常情况下人体内表达极

少,当纤维母细胞、血管平滑肌、内皮细胞或单核/巨噬细胞等暴露于内毒素、脂多糖或炎症因子时,即诱导产生大量 COX-2。COX-2 介导产生的前列腺素可能通过很多途径促进动脉粥样硬化的发生和发展,包括增加血管通透性、促进单核细胞粘附、诱导巨噬细胞化学趋化性和迁移、刺激炎症因子产生等^[2,6-10]。本研究证实,高胆固醇血症兔主动脉及其动脉粥样斑块中 COX-2 表达与斑块面积、IL-6 和 MMP-9 水平密切相关,说明 COX-2 能刺激 IL-6 和 MMP-9 的分泌。IL-6 是一种具有多功能的促炎因子,可下调脂蛋白脂酶活性、干扰血脂代谢和调节细胞免疫^[11],而 MMP-9 是基质金属蛋白酶家族中的重要成员,由炎症细胞释放,能促进巨噬细胞迁移,降解细胞外基质(包括胶原和弹性蛋白),从而削弱动脉粥样斑块纤维帽的结构,促进斑块破裂和血栓形成。可见,COX-2 在动脉粥样硬化的发生和发展中起重要作用。同样,为证实 COX-2 在动脉粥样硬化损害中的作用,Burleigh 等^[3]采用选择性 COX-2 抑制剂治疗西方饮食后的低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)缺陷雄性鼠,动脉粥样硬化程度降低 25%~50%,该研究还将 LDLR 缺陷鼠进行有野生型巨噬细胞 COX-2 或无巨噬细胞 COX-2 的胎肝细胞移植,结果发现,后者动脉粥样硬化明显减轻,为巨噬细胞 COX-2 表达有促进动脉粥样硬化的作用提供了遗传学证据。

他汀类药物为 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂,高胆固醇血症兔经他汀类药物,阿托伐他汀治疗后,血 TC、LDLC 水平明显下降,动脉粥样硬化斑块面积明显缩小,进一步证实了他汀类药物的有效降脂作用。本研究结果发现,阿托伐他汀在发挥强有力的降脂作用同时,明显降低主动脉粥样硬化中 COX-2 的表达水平(基因和蛋白),同时伴随 MMP-9 和 IL-6 表达水平的下调。因而提示,阿托伐他汀可能通过 COX-2 这一炎症信号通路改善动脉粥样硬化性炎症。

阿托伐他汀降低 COX-2 表达的机制尚不明确,可能与核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活性有关,因为 NF- κ B 是细胞间信号传导的重要转录因子,在炎症中起主导作用,控制其它影响单核细胞增殖的细胞因子的表达,其中包括对 COX-2 的调控^[12]。有关阿托伐他汀对 COX-2 调控的机制有待进一步的研究明确。

[参考文献]

- [1] 邓平,赵水平,白衡初,周宏年,聂赛. 急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶 2 mRNA 表达及阿托伐他汀的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (11): 695-697
- [2] Zhao SP, Deng P, Huang HG, Xu ZM, Dai HY, Hong SC, et al. Expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and its significance[J]. *Clin Chem*, 2005, 51 (11): 2 170-173
- [3] 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[J]. *Circulation*, 2002, 105 (15): 1 816-823
- [4] Ito T, Ikeda U, Shimpo M, Ohki R, Takahashi M, Yamamoto K, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2002, 16 (2): 121-126
- [5] 李江,赵水平,彭道泉,李全忠,聂赛. 西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (6): 533-536
- [6] Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (10): 4 885-890
- [7] Kreuzer J, Denger S, Jahn L, Bader J, Ritter K, von Hodenberg E, et al. LDL stimulates chemotaxis of human monocytes through a cyclooxygenase-dependent pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16 (12): 1 481-487
- [8] Cao HJ, Wang HS, Zhang Y, Lin HY, Phipps RP, Smith TJ. Activation of human orbital fibroblasts through CD40 engagement results in a dramatic induction of hyaluronan synthesis and prostaglandin indoperoxide H synthase-2 expression. Insights into potential pathogenic mechanisms of thyroid-associated ophthalmopathy[J]. *Biol Chem*, 1998, 273 (45): 29 615-625
- [9] Rupp J, Berger M, Reiling N, Gieffers J, Lindschau C, Haller H, et al. Cox-2 inhibition abrogates Chlamydia pneumoniae-induced PGE(2) and MMP-1 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320 (3): 738-744
- [10] Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and-9 in fetal rat hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2001, 33 (4): 860-867
- [11] Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh I, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia[J]. *Cancer Res*, 1992, 52 (15): 4 113-116
- [12] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336 (15): 1 066-071

(此文编辑 文玉珊)