

卡托普利和缬沙坦对兔动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 及纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的影响

鹿育萨¹, 雷新宇¹, 黄淑田¹, 白春林¹, 李建民²

(1. 山西医科大学附属第二医院心内科, 2. 山西省肿瘤医院病理科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 卡托普利和缬沙坦对动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 的影响; 免疫组织化学; 血管紧张素 Ang II 纤溶酶原激活物抑制剂 1; 卡托普利; 缬沙坦

[摘要] 目的 观察兔动脉粥样硬化斑块局部血管紧张素 Ang II 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达水平, 并观察卡托普利和缬沙坦对其的影响。方法 雄性健康新西兰兔随机分为高脂饮食组、卡托普利组、缬沙坦组和正常对照组。饲养 10 周后, 取动脉血用发色底物法测定血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性, 放射免疫法测定血浆血管紧张素 Ang II 含量; 取主动脉组织作病理形态学观察, 免疫组织化学方法观察动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 及纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达。结果 与正常对照组相比, 高脂饮食组血浆血管紧张素 Ang II 含量显著增高 ($494.86 \pm 67.98 \text{ ng/L}$ 比 $44.21 \pm 18.34 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$), 血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性显著提高 ($9.38 \pm 1.55 \text{ kAU/L}$ 比 $6.67 \pm 0.47 \text{ kAU/L}$, $P < 0.01$), 动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 及纤溶酶原激活物抑制剂 1 阳性表达显著增高 ($46.97\% \pm 14.32\%$ 比 $4.17\% \pm 1.01\%$ 和 $48.50\% \pm 13.46\%$ 比 $1.33\% \pm 0.52\%$, $P < 0.01$); 与高脂饮食组相比, 卡托普利组和缬沙坦组血浆纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性明显降低 ($7.23 \pm 0.46 \text{ kAU/L}$ 和 $7.42 \pm 0.59 \text{ kAU/L}$ 比 $9.38 \pm 1.55 \text{ kAU/L}$, $P < 0.05$), 斑块中血管紧张素 Ang II 阳性表达显著降低 ($26.30\% \pm 5.00\%$ 和 $27.83\% \pm 7.30\%$ 比 $46.97\% \pm 14.32\%$, $P < 0.05$), 斑块中纤溶酶原激活物抑制剂 1 阳性表达显著降低 ($20.37\% \pm 8.23\%$ 和 $22.50\% \pm 7.06\%$ 比 $48.50\% \pm 13.46\%$, $P < 0.05$)。斑块中纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达与血管紧张素 Ang II 表达呈正相关 ($r = 0.796$, $P < 0.01$)。结论 在高脂饮食所致动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达增加, 且二者呈正相关; 卡托普利和缬沙坦减轻动脉粥样硬化斑块中血管紧张素 Ang II 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Captopril and Valsartan on the Expression of Angiotensin Ang II and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Aortic Plaques of Atherosclerotic Rabbits

LU Yu-Sa, LEI Xin-Yu, HUANG Shu-Tian, BAI Chun-Lin, and LI Jin-Min

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[KEY WORDS] Angiotensin Ang II ; Plasminogen Activator Inhibitor-1; Captopril; Valsartan; Atherosclerosis; Rabbits

[ABSTRACT] Aim To observe the expression of angiotensin Ang II and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in rabbits atherosclerotic plaques, and to study the inhibiting efficiency of captopril and valsartan. Methods Male New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: cholesterol group, captopril group, valsartan group and control group. After feeding 10 weeks, plasma PAI-1 activity was evaluated by spectrophotometric assay, plasma Ang II level was measured with competitive radioimmunoassays. The expression of Ang II and PAI-1 in atherosclerotic plaques were observed by immunohistochemistry measure. Results In cholesterol group, plasma Ang II level and plasma PAI-1 activity were increased significantly compared with control group ($P < 0.01$), and the percent of positive cells of Ang II and PAI-1 in atherosclerotic plaques were higher compared with control group ($46.97\% \pm 14.32\%$ vs $4.17\% \pm 1.01\%$ and $48.5\% \pm 13.46\%$ vs $1.33\% \pm 0.52\%$ respectively, $P < 0.01$). Captopril and valsartan significantly reduced plasma Ang II level and PAI-1 activity compared with cholesterol group ($P < 0.05$). Also captopril and valsartan markedly decreased the percent of Ang II positive and PAI-1 positive cells in atherosclerotic plaques compared with cholesterol group ($26.30\% \pm 5.00\%$ vs $46.97\% \pm 14.32\%$ and $20.37\% \pm 8.23\%$ vs $48.50\% \pm 13.46\%$, $P < 0.05$ in captopril group; $27.83\% \pm 7.30\%$ vs $46.97\% \pm 14.32\%$ and $22.50\% \pm 7.06\%$ vs $48.50\% \pm 13.46\%$, $P < 0.05$ in valsartan group). The expression of PAI-1 were positively correlated with the expression of Ang II in atherosclerotic plaques ($r = 0.796$, $P < 0.01$). Conclusion The expression of Ang II and PAI-1 in

[收稿日期] 2005-06-13 [修回日期] 2006-05-15

[基金项目] 山西省自然科学基金项目(20041114)资助

[作者简介] 鹿育萨, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事高血压、高脂血症和冠心病的临床和基础研究工作, E-mail 为 ly-stysx@126.com。黄淑田, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事高血压、高脂血症和冠心病的临床和基础研究工作。雷新宇, 硕士, 主治医师, 主要从事高血压、高脂血症和冠心病的临床和基础研究工作。

atherosclerotic plaques were increased, there was significant correlation between the expression of PAF-1 and Ang Ⅱ both captopril and valsartan have the efficiency of inhibiting the expression of Ang Ⅱ and PAF-1 in plaques of rabbit atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发展及血栓形成是心血管疾病发生的重要病理改变,在As基础上血栓形成的机制研究已相当深入,而纤溶活性降低在心血管疾病发生中的机制正受到关注。纤溶酶原激活物抑制剂1(plasminogen activator inhibitor-1, PAF-1)是调节纤溶活性的关键因子,通过抑制纤溶酶的激活而抑制纤维蛋白的降解。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)特别是心脏、血管局部血管紧张素 Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)在As形成及发展的诸多环节中起作用。体外细胞培养发现Ang Ⅱ可诱导内皮细胞和血管平滑肌细胞等合成和分泌PAF-1^[1-3]。为探讨As、Ang Ⅱ和PAF-1三者之间的关系及血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)和Ang Ⅱ受体拮抗剂(angiotensin Ⅱreceptor blocker, ARB)的影响,通过建立兔As模型,观察As斑块中Ang Ⅱ和PAF-1的表达及ACEI卡托普利和ARB缬沙坦的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只健康雄性新西兰白兔,体重 2.0 ± 0.2 kg,购自山西省农业科学院畜牧兽医研究所实验兔场(合格证号为200207001)。

1.2 药物及试剂

缬沙坦为北京诺华制药有限公司产品,批号为SC94003。卡托普利(开搏通)为中美上海施贵宝制药有限公司产品,批号为20021020。胆固醇购自北京奥博星生物技术责任公司,批号为20030112。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)试剂盒购自北京中生生化试剂公司。兔抗兔PAF-1免疫亲和纯化抗体(序列号BA1334)和兔抗兔Ang Ⅱ免疫亲和纯化抗体(序列号BA0639)购自武汉博士德生物工程有限公司。Ang Ⅱ放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所。PAF-1活性检测试剂盒购自上海太阳生物技术公司。

1.3 实验分组

30只健康雄性新西兰兔,随机分为四组:高脂饮食组8只,给予含1%胆固醇+4%猪油高脂饲料;卡托普利组8只,在高脂饮食基础上给予卡托普利2 mg/(kg·d);缬沙坦组8只,在高脂饮食基础上给予缬沙坦10 mg/(kg·d);正常对照组6只,饲以标

准兔饲料。各组共喂饲10周。

1.4 血脂检测

于第10周末经兔耳中央动脉取空腹血标本,离心(3 000 r/min, 10 min),留取血清-20℃冻存,在BackmanLX20全自动生化分析仪上成批测定TC、TG、LDLC。

1.5 血管紧张素 Ⅱ检测

于第10周末经兔耳中央动脉取空腹血标本,迅速注入含0.3 mol/L EDTA、0.32 mol/L 二巯基丙醇和0.34 mol/L 8-羟基喹啉硫酸盐的抗凝管中混匀,4℃下2 500 r/min离心7 min,密封后-20℃存放。采用放射免疫法测定,操作过程严格按说明书进行,批内变异系数<10%,批间变异系数<15%。

1.6 血浆纤溶酶原激活物抑制剂1活性测定

于第10周末经兔耳中央动脉取空腹血标本注入含0.109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝液的试管中,3 000 r/min离心10 min,收集上层液,-20℃存放。检测采用发色底物法,操作过程严格按说明书进行。

1.7 免疫组织化学染色

第10周末处死动物,取近主动脉弓到髂总动脉分叉处,生理盐水冲洗后沿正中中线切开。取近主动脉弓处及血管开口处动脉组织置于10%中性福尔马林缓冲液中浸泡固定48 h,常规酒精脱水石蜡包埋,将其横断面制成3 μm厚的连续切片,分别做HE染色及Ang Ⅱ、PAF-1免疫组织化学染色。从HE染色上每组随机选取5个视野,图像分析仪测定内膜和中膜厚度,并计算内膜/中膜厚度比。免疫组织化学染色采用S-P法DAB显色,棕黄色颗粒为阳性,二项均设阴性对照(PBS代替一抗),操作过程严格按说明书进行。Olympus显微摄影系统和Mais-2000图像分析软件进行图像分析,并计算阳性染色百分比。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.0统计软件,组间比较用单因素方差分析,数据经平方根反正弦变换后进行Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂水平

高脂饮食组、卡托普利组和缬沙坦组血清TC、TG及LDLC水平差异无显著性($P > 0.05$),见表1。

表 1. 10 周时各组血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	总胆固醇	甘油三酯	低密度 脂蛋白胆固醇
正常对照组	6	2.01 ± 0.45	1.18 ± 0.48	1.07 ± 0.27
高脂饮食组	8	23.70 ± 1.91 ^a	5.07 ± 3.02 ^a	10.06 ± 0.52 ^a
卡托普利组	8	22.39 ± 0.97 ^a	4.80 ± 2.23 ^a	9.62 ± 0.59 ^a
缬沙坦组	8	22.66 ± 1.52 ^a	4.25 ± 2.58 ^a	9.66 ± 0.52 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

2.2 血浆血管紧张素 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 含量和纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性

高脂饮食组与正常对照组比较血浆 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 含量和血浆 PAF-1 活性显著提高 ($P < 0.01$), 卡托普利组与高脂饮食组比较血浆 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 含量和 PAF-1 活性明显降低 ($P < 0.05$), 缬沙坦组与高脂饮食组比较血浆 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 含量无明显差异 ($P > 0.05$), 但血浆 PAF-1 活性明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2. 10 周末血浆血管紧张素 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 含量、纤溶酶原抑制剂 1 活性 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	$\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ (ng/L)	PAF-1 (kAU/L)
正常对照组	6	44.21 ± 18.34	6.67 ± 0.47
高脂饮食组	8	494.86 ± 67.98 ^a	9.38 ± 1.55 ^a
卡托普利组	8	202.11 ± 57.76 ^{ab}	7.23 ± 0.46 ^b
缬沙坦组	8	418.91 ± 91.51 ^a	7.42 ± 0.59 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂饮食组比较。

2.3 病理学改变

肉眼可见正常对照组内膜光滑, 无斑块形成。高脂饮食组血管表面粗糙, 凹凸不平, 大量黄白色斑块突出于管腔表面, 并连接成片, 尤以近主动脉弓处及血管开口处最为明显。卡托普利组和缬沙坦组可见散在的白色斑块突出于管腔表面, 主要集中在血管开口处, 除近端外较少连接成片。HE 染色可见正常对照组血管分层清晰, 内膜完整, 内皮连续。高脂饮食组血管内皮断裂, 内膜显著增厚变形, 形成明显的粥样斑块, 可见大量圆形及梭形的泡沫细胞, 并可见胆固醇结晶(为针状空隙), 胶原纤维呈玻璃样变性, 平滑肌细胞从中膜迁入内膜。卡托普利组和缬沙坦组与高脂饮食组比较粥样斑块明显减轻, 内膜增厚较轻, 内膜和中膜的分层较清晰, 泡沫细胞较高脂饮食组少, 内膜/中膜厚度比明显减小(图 1)。

2.4 免疫组织化学表现

正常对照组只有血管内皮细胞表达少量的 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$

和 PAF-1, 且主要在血管内皮和中膜中均匀分布。高脂饮食组增厚的内膜及斑块中可见 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 和 PAF-1 阳性染色明显增强, 在无定形物质的周围及斑块的底部尤为明显。高脂饮食组与正常对照组比较 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 和 PAF-1 阳性染色百分比显著提高 ($P < 0.01$)。卡托普利组和缬沙坦组与高脂饮食组比较 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 、PAF-1 阳性染色百分比均显著降低 ($P < 0.01$), 见表 3 及图 2。斑块中 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 与 PAF-1 的表达呈正相关关系 ($r = 0.796, P < 0.01$)。

表 3. 斑块中血管紧张素 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 阳性染色百分比

分 组	n	$\text{Ang} \text{ Ⅱ}$	PAF-1
正常对照组	6	4.17% ± 1.01%	1.33% ± 0.52%
高脂饮食组	8	46.98% ± 14.32% ^a	48.5% ± 13.5% ^a
卡托普利组	8	26.30% ± 5.00% ^{ab}	20.37% ± 8.23% ^{ab}
缬沙坦组	8	27.83% ± 7.30% ^{ab}	22.5% ± 7.06% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高脂饮食组比较。

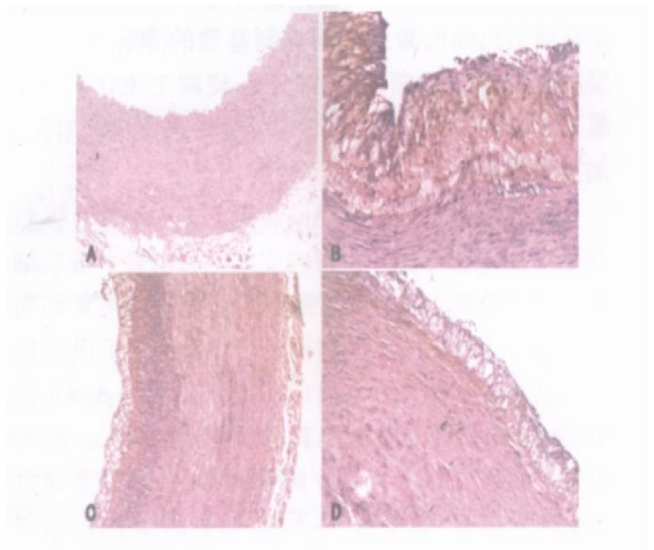


图 1. HE 染色 ($\times 50$) A 为正常对照组, B 为高脂饮食组, C 为卡托普利组, D 为缬沙坦组。

3 讨论

高胆固醇血症是 As 形成的主要机理, 他汀类药物通过降胆固醇及其他一些机制预防 As 已十分明确。临床研究中抗 RAS 的 ACEI 及 ARB 药物对心血管终点事件下降的作用是否存在除降压作用外的心血管保护作用仍在不断研究中。本研究观察了高脂血症造成 As 形成时血浆 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 水平和 PAF-1 活性变化, 同时用免疫组织化学方法观察主动脉 As 斑块局部 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 阳性表达和 PAF-1 阳性表达, 结果发现, 血浆 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$ 水平和 PAF-1 活性、主动脉 As 斑块中 $\text{Ang} \text{ Ⅱ}$

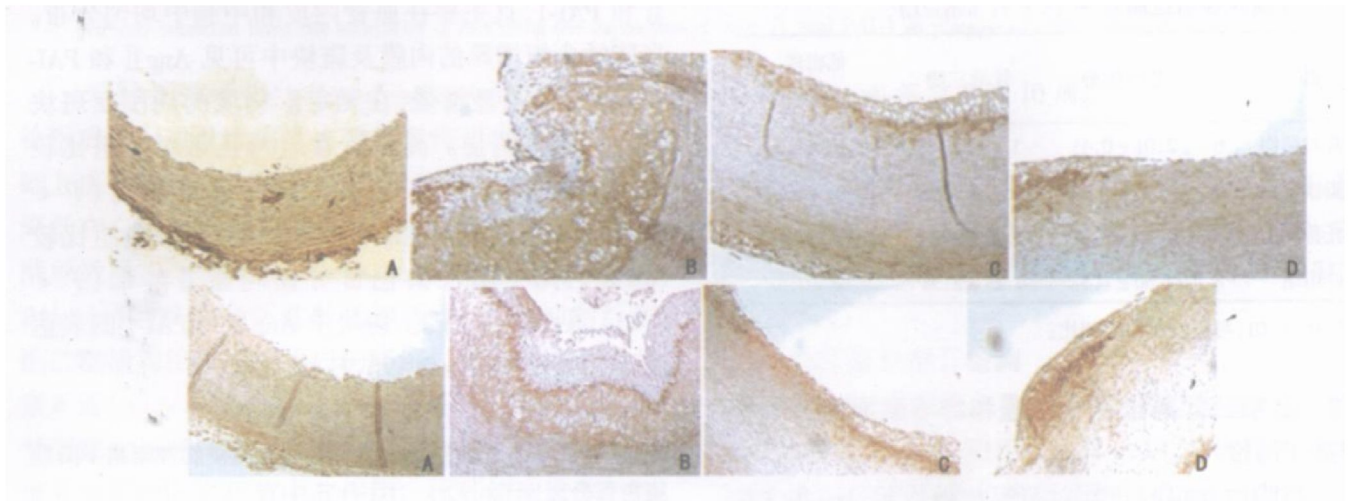


图 2. 纤溶酶原激活物抑制剂 1 免疫组织化学染色 ($\times 50$)
组, B 为高脂饮食组, C 为卡托普利组, D 为缬沙坦组。

上图纤溶酶原激活物抑制剂 1, 下图为血管紧张素 II。A 为正常对照

II 阳性表达和 PAI-1 阳性表达均明显增加, 且 As 斑块中 PAI-1 与 Ang II 阳性表达呈正相关。PAI-1 水平的升高必然抑制纤溶酶原激活剂, 局部纤溶功能的下降则导致斑块局部呈易栓状态和纤维蛋白病理性沉积。有研究发现局部纤溶酶活性下降可以抑制基质金属蛋白酶的激活从而抑制基质的降解, 增加内膜厚度使管腔变窄^[4]。因此, As 斑块上 PAI-1 的浓聚不仅促发血栓形成, 同时也可能促进斑块的增长, 加重血管腔狭窄。

体外细胞培养发现 Ang II 是 PAI-1 表达的强烈刺激物, Ang II 可诱导血管内皮细胞和血管平滑肌细胞合成和分泌 PAI-1^[1-3]。给血压正常的志愿者和高血压患者注射 Ang II 可使循环中 PAI-1 水平迅速提高且呈剂量依赖性^[5]。目前多数研究认为 Ang II 调节 PAI-1 的表达是通过 AT1 受体实现的^[6,7]。然而也有一些研究认为 Ang II 调节 PAI-1 的表达是通过 Ang II 受体实现的^[8]。本研究观察到卡托普利对 Ang II 生成的阻滞和缬沙坦对 AT1 受体的阻滞都减低 As 斑块中 PAI-1 的表达, 间接证实 Ang II 对 PAI-1 的影响与 AT1 受体有关。陈良华等^[9]研究卡托普利对家兔动脉粥样硬化 PAI-1 基因表达的影响, 应用逆转录聚合酶链反应测定 PAI-1 mRNA 的表达, 发现卡托普利能抑制动脉粥样硬化时 PAI-1 基因的过度表达。

本研究结果提示, 卡托普利和缬沙坦虽从不同

机理阻滞 Ang II 的作用, 二者均可抑制 As 斑块 PAI-1 高表达状态, 这种作用可能也是 ACEI 和 ARB 心血管保护治疗效益的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 995-1001
- [2] van Leeuwen RT, Kol A, Andreotti F, Kluff C, Maseri A, Sperti G. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue-type plasminogen activator messenger RNA in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1994, **90**: 362-368
- [3] Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 1353-362
- [4] Padro T, Steins M, Li CX. Comparative analysis of plasminogen activator inhibitor-1 expression in different types of atherosclerotic lesions in coronary arteries from human heart explants [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, **36**: 28-36
- [5] Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II: evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function [J]. *Circulation*, 1993, **87**: 1969-973
- [6] Sironi L, Calvio AM, Amaboldi L. Effect of valsartan on angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 biosynthesis in arterial smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 2001, **37**: 961-996
- [7] Skurk T, Lee YM, Hauner H. Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture [J]. *Hypertension*, 2001, **37**: 1336
- [8] Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin II [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2515-520
- [9] 陈良华, 陆国平, 吴春芳, 龚兰生. 卡托普利对家兔动脉粥样硬化纤溶酶原激活物抑制剂-1 基因表达的影响 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2000, **6** (2): 130-132

(此文编辑 文玉珊)