

阿托伐他汀对大鼠再狭窄血管醛糖还原酶表达及内膜增生的抑制作用

郑春华¹, 周胜华², 刘启明², 李旭平², 沈向前², 曹德良³, 万腊香³

(1. 南昌市第一医院心内科, 江西省南昌市 330008; 2. 中南大学湘雅二医院心导管室, 湖南省长沙市 410011;

3. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 阿托伐他汀对醛糖还原酶表达及内膜增生的抑制作用; FISH 原位杂交; 阿托伐他汀; 醛糖还原酶; 内膜增生; 再狭窄

[摘要] 目的 研究醛糖还原酶在大鼠再狭窄血管中的表达, 探讨醛糖还原酶表达与内膜增生之间的关系, 以及阿托伐他汀对醛糖还原酶表达及内膜增生的抑制作用。方法 24 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分成手术未干预组、假手术组及阿托伐他汀组, 每组 8 只。用通气—干燥法损伤手术未干预组及阿托伐他汀组中的右侧颈总动脉, 左侧颈总动脉作为对照。分别于第 7 天及 14 天处死动物, HE 染色以观察内膜及中膜增生情况, 并计算内膜和中膜面积及其比值, FISH 原位杂交及免疫组织化学检测醛糖还原酶及核因子 KB 的表达。结果 术后第 7 天损伤侧血管内膜增生明显, 第 14 天内膜增生进一步加重, 对照血管无明显增生。阿托伐他汀组血管内膜面积、内膜与中膜面积比值明显低于手术未干预组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。醛糖还原酶及核因子 KB 在损伤侧血管中的表达明显强于对照侧。阿托伐他汀组醛糖还原酶及核因子 KB 的表达明显低于手术未干预组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 醛糖还原酶可能参与了大鼠颈动脉损伤后内膜增生及再狭窄的形成。阿托伐他汀可抑制血管内膜增生及再狭窄的形成。阿托伐他汀可能是通过抑制醛糖还原酶及核因子 KB 而抑制再狭窄的形成。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Inhibition of Atorvastatin on Aldose Reductase Expression and Intimal Hyperplasia in the Intervention Rats with Restenosis

ZHENG Chun-Hua¹, ZHOU Sheng-Hua², LIU Qi-Min², LI Xu-Ping², SHEN Xiang-Qian², CAO De-Liang³, and WAN La-Xiang³

(1. Department of Cardiology, the First Hospital of Nanchang, Nanchang 330008; 2. the Catheter Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 3. the Angiocardiopathy Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001; China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Aldose Reductase; Intimal Hyperplasia; Restenosis; Nuclear Factor- κ B; Vascular Smooth Muscle Cell

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of aldose reductase (AR) in the carotids of the rats with restenosis in order to probe into the relationship between AR expression and intimal hyperplasia, and further explore the inhibition of atorvastatin on AR expression and intimal hyperplasia in the carotids with restenosis. **Methods** 24 healthy male SD rats were divided into the injured group without treatment, the fake operation group and the atorvastatin group by chance. Each group had 8 rats. The right carotids were injured by air-drying operation in the treatment group and the group with operation but without treatment. The left carotids were acted as the controls. The rats were killed after 7 days and 14 days respectively. Dying with HE to examine the intimal and the medial layers' proliferation. And the acreage of the intimal and the medial layers and their ratio were calculated as well. Then the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and AR were examined by immunohistochemical methods and FISH in situ hybridization. **Results** Seven days after the injury, the intimal hyperplasia could be seen obviously in the injured sides of the carotids, by the end of 14 days, the intimal hyperplasia aggravated. While the carotids in the control sides were not. The acreage of the intimal layers, the ratio of the intimal and the medial layers in the atorvastatin group was obviously lower than that of the operation group without treatment. The difference was obvious when compared with each other ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of AR and NF- κ B in the injured sides was obviously higher than that of the control sides. The expression of AR and NF- κ B in the atorvastatin group was obviously lower than that of the untreated group. Compared with each other, the difference was obvious ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** AR may be concerned with the neointima and the form of restenosis in the injured carotids of the rats. Atorvastatin could obviously inhibit the neointima and the form of the

[收稿日期] 2005-08-29

[修回日期] 2006-05-15

[作者简介] 郑春华, 博士, 副主任医师, 主要从事心血管疾病的研究, E-mail 为 chzhzheng@yahoo.com.cn。周胜华, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病再狭窄的研究。刘启明, 博士, 副主任医师, 主要从事再狭窄的研究。

restenosis. Atorvastatin might inhibit vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation through inhibiting AR and NF- κ B expression.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的异常增殖是再狭窄的主要特征,抑制 VSMC 增殖已成为治疗再狭窄的中心环节。醛糖还原酶(aldehyde reductase, AR)是一种具有广泛底物范围和组织分配的酶,在氧化应激方面起着非常重要的作用,与细胞增殖密切相关^[1]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调控细胞基因转录的关键因子之一,参与调控一系列炎症介质的基因表达。本研究拟观察通气—干燥法损伤大鼠颈总动脉后损伤血管局部 AR 和核因子 κ B 的表达及其与内膜增生之间的关系,并进一步探索阿托伐他汀对在体血管内膜增生的抑制作用,为再狭窄的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

醛糖还原酶 FISH 原位杂交试剂盒(天津灏洋公司)。核因子 κ B /p65 一抗(深圳晶美公司)。DAB 显色剂、链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶免疫组织化学试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。阿托伐他汀(浙江东亚医药化工有限公司)。

1.2 实验动物及分组

健康雄性 SD 系大白鼠 24 只,体重 190~240 g,由中南大学湘雅二医院动物实验中心提供,适应性喂养 14 天后纳入实验。随机分成手术未干预组、假手术组及阿托伐他汀组,每组 8 只。用通气—干燥法^[2]损伤手术未干预组及阿托伐他汀组右颈总动脉,左侧作为对照。假手术组钝性分离至右颈总动脉但不损伤此动脉。除安慰剂(喂饲 PBS)或阿托伐他汀灌胃外,喂饲普通饮食。分别于第 7 天及 14 天处死动物,然后行石蜡包埋切片及 HE 染色。

1.3 形态学观察

光镜下观察血管形态学变化,应用 MPIAS-500 计算机病理图像分析系统进行图像分析,操作过程中光强度与放大倍数($\times 200$ 倍)不变,测量管腔面积以及内、外弹力板包绕面积,以内弹力板包绕面积减去管腔面积为内膜面积,以外弹力板包绕面积减去内弹力板包绕面积为中膜面积,内膜面积与中膜面积之比表示增生程度。

1.4 醛糖还原酶 FISH 原位杂交

醛糖还原酶探针模板序列为 5'-CTGGA CTACC TGGAC CTCTA CCTTA TTCAC TGG-3', 探针合成序列为 BIO 5'-CCAGT GAATA AGGTA GAGGT CCAGG

TAGTC CAG-3' FAM, 探针的 5' 端标记为生物素(BIO), 3' 端标记为荧光素(FAM)。切片先用 0.01% 曲拉通 X-100 溶液浸泡 5~15 min,再用试剂盒中推荐的复合消化工作液覆盖组织,室温孵育 10~30 s。然后滴加预杂交液,37℃湿盒孵育 1 h。随之滴加含探针杂交液,37℃湿盒孵育 4~8 h。 $2\times$ SSC(标准生理盐水、柠檬酸盐混合物)、 $0.2\times$ SSC 洗涤后以甘油滴片,封片,四周用透明指甲油封边,荧光显微镜(450~540 nm)镜检。位于细胞质中黄绿色荧光为阳性。

1.5 核因子 κ B p65 免疫组织化学染色

切片先用 4% 多聚甲醛固定,免疫组织化学染色按试剂盒说明书执行。

1.6 统计学方法

使用 SPSS12.0 统计软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间、组内比较分别采用方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 血管形态学改变

对照血管可见内皮细胞、内弹力板完整。损伤后 7 天即可见增生内膜排列混乱, VSMC 核大而呈椭圆形,胞质丰富。损伤后 14 天内膜增生更为明显,近管腔面有 VSMC 呈环状排列,近中膜处细胞排列紊乱, VSMC 穿过内弹力板,管腔变窄(图 1)。

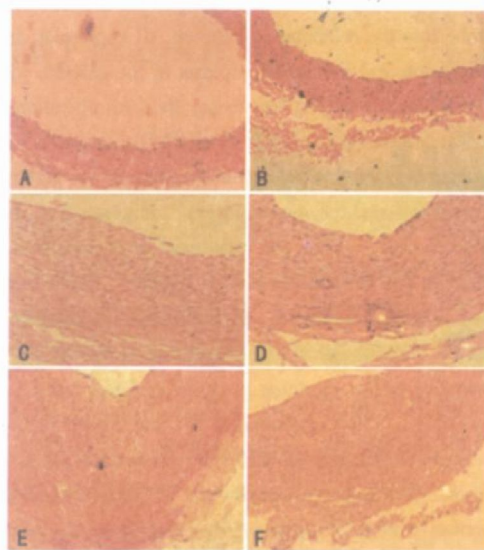


图 1. 血管 HE 染色 ($\times 100$) A 为损伤后 7 天左侧对照, B 为损伤后 7 天假手术组, C 为损伤后 7 天手术未干预组, D 为损伤后 7 天阿托伐他汀组, E 为损伤后 14 天手术未干预组, F 为损伤后 14 天阿托伐他汀组。

2.2 血管内膜、中膜面积及其比值比较

损伤后 7 天, 损伤血管内膜面积与对照血管比较差异具有显著性($P < 0.05$)。阿托伐他汀组内膜面积与手术未干预组比较差异具有显著性($P < 0.01$)。损伤后 14 天, 手术未干预组内膜面积较损伤 7 天时增加 1 倍以上; 阿托伐他汀组内膜面积与手术未干预组相比差异具有显著性($P < 0.01$); 干

预组和未干预组损伤血管中膜面积与对照血管比较均无显著性差异。与对照血管比较, 干预组和未干预组损伤血管内膜/中膜面积比值在损伤后 7 天差异具有显著性($P < 0.01$), 损伤后 14 天比值进一步增大。干预组与未干预组比较损伤侧血管内膜/中膜面积比值具有显著性差异($P < 0.01$)。见表 1。

表 1. 血管内膜面积、中膜面积及其比值比较 ($n = 8$)

分 组		内膜面积 ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)		中膜面积 ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)		内膜与中膜面积比	
		7 天	14 天	7 天	14 天	7 天	14 天
阿托伐他汀组	对照血管	17.16 \pm 4.41	14.76 \pm 1.01	50.00 \pm 0.64	47.32 \pm 1.82	0.34 \pm 0.09	0.27 \pm 0.01
	损伤血管	66.85 \pm 1.00	128.75 \pm 3.72 ^c	53.19 \pm 1.70	58.81 \pm 6.13 ^a	1.27 \pm 0.01 ^b	2.45 \pm 0.08 ^{bc}
手术未干预组	对照血管	13.34 \pm 4.69	12.84 \pm 2.39	48.43 \pm 1.74	49.37 \pm 1.05	0.33 \pm 0.09	0.27 \pm 0.05
	损伤血管	72.61 \pm 1.19 ^a	184.21 \pm 4.39 ^a	57.97 \pm 3.64 ^a	63.22 \pm 3.69	1.25 \pm 0.08 ^b	3.13 \pm 0.05 ^a
假手术组	对照血管	15.24 \pm 0.37	15.69 \pm 0.40	43.29 \pm 2.43	42.31 \pm 1.16	0.32 \pm 0.03	0.39 \pm 0.02
	损伤侧血管	16.84 \pm 0.79 ^c	15.69 \pm 0.74	41.68 \pm 1.73 ^c	43.74 \pm 3.08 ^c	0.34 \pm 0.04 ^c	0.36 \pm 0.02 ^c

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照血管比较; c 为 $P < 0.01$, 与手术未干预组损伤血管比较。

2.3 FISH 原位杂交

左侧对照及假手术组中膜和外膜清楚, 内膜增生不明显, AR 表达量较低。损伤后 7 天手术未干预组内膜增生明显, AR 表达较左侧对照及假手术组显著增高, 尤以内膜为甚; 损伤后 14 天, 内膜增生更加明显, AR 表达更为增高。损伤后 7 天阿托伐他汀组 AR 表达降低, 损伤后 14 天 AR 表达降低更加明显 (图 2)。

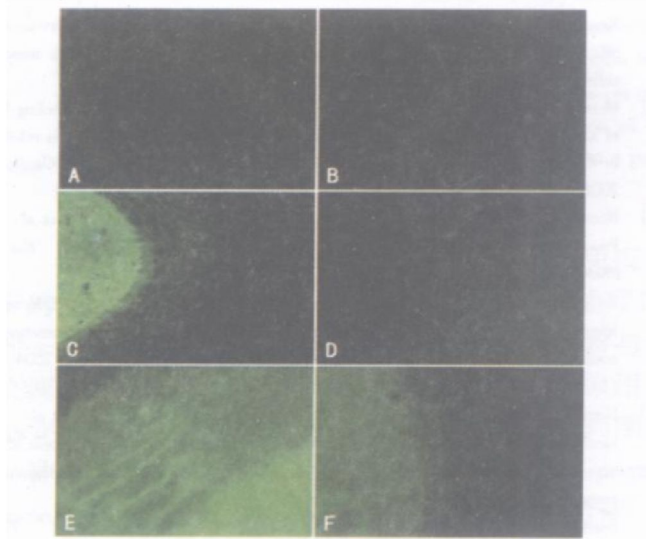


图 2. FISH 原位杂交 ($\times 50$) A 为左侧对照, B 为假手术组, C 为损伤后 7 天手术未干预组, D 为损伤后 7 天阿托伐他汀组, E 为损伤后 14 天手术未干预组, F 为损伤后 14 天阿托伐他汀组。

2.4 阿托伐他汀对核因子 κB p65 表达的影响

左侧对照和假手术组几乎未见核因子 κB p65

表达; 损伤侧血管在损伤后 7 天核因子 κB p65 表达强阳性。阿托伐他汀干预 7 天后其表达明显降低。损伤后 7 天, 阿托伐他汀组对照血管平均吸光度及阳性面积百分比与损伤血管比较差异具有显著性($P < 0.01$), 手术未干预组对照血管平均吸光度和阳性面积百分比与同期损伤血管比较差异具有显著性($P < 0.01$)。干预组损伤血管平均吸光度和阳性面积百分比与未干预组比较差异具有显著性($P < 0.05$)。见表 2 和图 3。

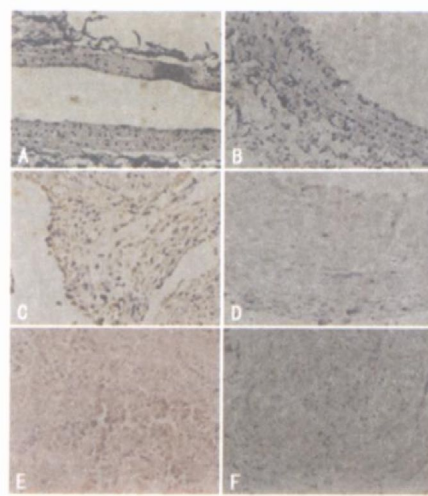


图 3. 免疫组织化学分析 ($\times 100$) A 为损伤后 7 天左侧对照, B 为损伤后 7 天右侧假手术组, C 为损伤后 7 天手术未干预组, D 为损伤后 7 天阿托伐他汀组, E 为损伤后 14 天手术未干预组, F 为损伤后 14 天阿托伐他汀组。

表 2. 免疫组织化学图像分析 ($n=8$)

分 组		平均吸光度		阳性面积百分比	
		7 天	14 天	7 天	14 天
阿托伐他汀组	对照血管	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	损伤血管	0.28 ± 0.04 ^{ab}	0.71 ± 0.03 ^{ab}	0.92 ± 0.02 ^{ab}	1.73 ± 0.02 ^{ab}
手术未干预组	对照血管	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	损伤血管	0.34 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.07 ^a	0.98 ± 0.01 ^a	2.44 ± 0.03 ^a
假手术组	对照血管	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02
	损伤血管	0.07 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照血管比较; b 为 $P < 0.05$, 与手术未干预组损伤血管比较。

3 讨论

醛糖还原酶(AR)是一种与肿瘤有关的抗原^[2], 由于 AR 具有广泛的底物范围, 能还原各种醛及醛类衍生物, 故在膜脂质过氧化以及氧化应激方面起着非常重要的作用。在多种与氧化或亲电子应激有关的病理情况下如再狭窄等, AR 基因表达是增高的。AR 通过将亲电子醛和它们的谷胱甘肽化合物还原为毒性较低或代谢为无毒性的物质, 从而促进细胞的生长及增殖。近来的研究进一步证实, 氧化应激与 VSMC 增殖及再狭窄形成有关^[3]。由于再狭窄的病理过程与氧化或亲电子应激有关^[4], 因此 AR 很可能参与了再狭窄的形成。

他汀类药物能抑制 VSMC 的迁移与增殖^[5], 部分与它能抑制炎症、减轻氧化应激有关。他汀类药物还能通过诱导细胞凋亡而抑制 VSMC 增殖^[6]。但他汀类药物能否防止 PTCA 术后再狭窄的发生, 目前仍存在着争议。如 Bae 等^[7]发现他汀类药物可降低 PTCA 支架植入术后再狭窄的发生率, 但另有研究却证实他汀类药物不能防止血管成形术后再狭窄的发生^[8,9]。阿托伐他汀是新一代降脂药, 除有明显的降脂作用外, 还能抑制炎症细胞在血管壁的沉积及减轻粥样斑块炎症, 其抑制炎症的作用可能是其消退斑快、稳定斑快及降低临床心血管事件发生率的原因之一。阿托伐他汀减轻炎症可能与其抑制转录因子及趋化因子活性有关^[10,11]。体外实验发现, 阿托伐他汀具有明显的抑制 VSMC 增殖的作用。Bustos 等在兔动脉粥样硬化模型中也发现阿托伐他汀可抑制血管内膜炎症, 从而减少血管内膜增生及再狭窄的形成。但阿托伐他汀通过何种途径抑制血管内膜增生及再狭窄形成, 目前尚不十分清楚。

本研究结果发现, 通气—干燥法造成大鼠颈总动脉损伤后, 在损伤血管局部出现新生血管内膜形成、VSMC 增殖, 内膜及中膜增厚, 尤以内膜增厚为

主。同时, 核因子 κB 和 AR 表达相应增加。而阿托伐他汀能抑制 AR 及核因子 κB 的表达, 且呈剂量依赖性, 并能明显抑制血管内膜增生。从而证实损伤血管内膜增生与 AR 表达存在一定的联系, 阿托伐他汀对损伤血管内膜增生具有抑制作用。因此推测, 阿托伐他汀可能是通过抑制 AR 及核因子 κB , 继而抑制血管内膜增生及再狭窄的形成。

[参考文献]

- [1] Zeindl-Eberhart E, Jungblut PR, Otto A, Rabes HM. Identification of tumor-associated protein variants during rat hepatocarcinogenesis: aldose reductase[J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 14 589-594
- [2] Ruef J, Liu SQ, Bode C, Tocchi M, Srivastava S, Runge MS, et al. Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (7): 1 745-752
- [3] Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase mediates the mitogenic signals of cytokines[J]. *Chem Biol Interact*, 2003, **143-144**: 587-596
- [4] Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Aggarwal BB, Srivastava SK. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (35): 32 063-070
- [5] Meuwissen M, Piek JJ, van der Wal AC, Chamuleau SA, Koch KT, Teeling P, et al. Recurrent unstable angina after directional coronary atherectomy is related to the extent of initial coronary plaque inflammation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37**: 1 271-276
- [6] Buemi M, Allegra A, Senatore M, Marino D, Medici MA, Aloisi C, et al. Proapoptotic effect of fluvastatin on human smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, **370**: 201-203
- [7] Bae JH, Bassenge E, Kim KY, Synn YC, Park KR, Schwenmer M. Effects of low-dose atorvastatin on vascular responses in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2004, **9** (3): 185-192
- [8] Serruys PW, Foley DP, Jackson G, Bonnier H, Macaya C, Vrolix M, et al. A randomized placebo-controlled trial of fluvastatin for prevention of restenosis after successful coronary balloon angioplasty: final results of the fluvastatin angiographic restenosis (FLARE) trial[J]. *Eur Heart J*, 1999, **20**: 58-69
- [9] Serruys PW, de Feyter P, Macaya C, Kokott N, Puel J, Vrolix M, et al. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous intervention[J]. *JAMA*, 2002, **287**: 3 215-222
- [10] Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, et al. Atorvastatin reduces NF- κB activation and chemokine expression in vascular smooth cells and mononuclear cells[J]. *Atherosclerosis*, 1999, **147**: 253-261
- [11] Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **32** (7): 2 057-064 (此文编辑 文玉珊)