

## 阿司匹林和氯吡格雷抑制兔粥样硬化主动脉基质金属蛋白酶 1 的表达

顾 晴<sup>1</sup>, 陈纪林<sup>1</sup>, 陈 曦<sup>2</sup>

(中国医学科学院 中国协和医科大学阜外心血管病医院 1. 冠心病诊疗中心; 2. 临床及生化检验中心, 北京市 100037)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶; 阿司匹林; 氯吡格雷; 主动脉; 兔

[摘要] 目的 研究抗血小板药物阿司匹林、氯吡格雷及两药合用对兔粥样硬化主动脉基质金属蛋白酶 1 表达和斑块稳定性的影响。方法 49 只雄性日本大白兔随机分为正常对照组、模型组、阿司匹林组、氯吡格雷组及合用组。后四组建立高胆固醇饲料和免疫损伤诱发的主动脉粥样硬化模型。免疫组织化学法测定斑块部位的巨噬细胞和平滑肌细胞阳性百分率并确定基质金属蛋白酶 1 在动脉壁的分布, Western 印迹法测定主动脉基质金属蛋白酶 1 的表达水平。结果 阿司匹林和氯吡格雷均明显减少巨噬细胞阳性百分率、增加平滑肌细胞阳性百分率 ( $P < 0.01$ ), 斑块中巨噬细胞部位与基质金属蛋白酶 1 阳性区域存在定位上的对应关系。模型组、阿司匹林组、氯吡格雷组、合用组主动脉基质金属蛋白酶 1 的表达分别是正常对照组的 562%、217%、211% 和 178%, 与模型组相比, 阿司匹林组、氯吡格雷组及合用组基质金属蛋白酶 1 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 氯吡格雷和阿司匹林能抑制动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞表达基质金属蛋白酶 1, 并通过改变斑块组成对稳定斑块起作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Aspirin and Clopidogrel Reducing Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Aortic Artery of Atherosclerotic Rabbits

GU Qing<sup>1</sup>, CHEN Ji-Lin<sup>1</sup>, and CHEN Xi<sup>2</sup>

(1. Center of Coronary Heart Disease, 2. Center of Clinical and Biochemical Analysis, Fuwai Cardiovascular Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinases; Aspirin; Clopidogrel; Aortic Artery; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of aspirin and clopidogrel on expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and stability of plaque in aortic artery of atherosclerotic rabbits. **Methods** Forty-nine rabbits were divided into normal control group, model group, aspirin group, clopidogrel group and combination (aspirin+ clopidogrel) group. Atherosclerotic model in aortic artery induced by high lipid diet chow and immunity injury were built in the last four groups. The positive percentage of macrophage cells and smooth muscle cells in the plaque were analyzed by immunohistochemistry. Expression of MMP-1 in aortic artery was measured by Western blot. **Results** Aspirin and clopidogrel significantly decreased the positive percentage of macrophage cells, and increased the positive percentage of smooth muscle cells in aortic vascular lesions ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). The localization of the expression of MMP-1 was in concordance with macrophage cells region. Compared with normal controls, the amounts of MMP-1 increased by 562%, 217%, 211% and 178% in model group, aspirin group, clopidogrel group and their combination, respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Aspirin and clopidogrel can reduce expression of MMP-1 and change the compounds of plaques. These effects may increase the stability of plaques.

动脉粥样硬化斑块合成的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 可降解细胞外基质, 加速斑块破裂。MMP-1 是 MMP 家族中的重要成员之一, 主要分解细胞外基质的 IV 型和 III 型胶原, 在形成不稳定斑块中起重要作用<sup>[1]</sup>。目前有研究发现, 抗血小板药物阿司匹林具有稳定斑块的作用<sup>[2]</sup>。本

研究观察作用于不同抗血小板途径的抗血小板药物阿司匹林、氯吡格雷及两药合用对动脉粥样硬化兔血管组织 MMP-1 表达及斑块稳定性的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 药品和试剂

阿司匹林由无锡阿斯特拉公司生产, 氯吡格雷由杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司生产。血脂试剂盒购自上海名典生物工程公司。小鼠抗兔巨噬细胞单克隆抗体 RAM11 购自丹麦 DAKO 公司, 小鼠平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 1A4 购自美国 Sigma

[收稿日期] 2005-07-11 [修回日期] 2006-06-30

[基金项目] 国家教委高校博士点基金(20030023031)资助

[作者简介] 顾晴, 博士, 主治医师, 主要从事心血管临床和基础研究。联系电话 010-68314466-8064, E-mail 为 gubright831@sohu.com。陈纪林, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事心血管临床和基础研究。陈曦, 博士, 研究员, 主要从事心血管基础研究。

公司,小鼠抗人 MMP-1 单克隆抗体购自美国 Oncogene 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中山生物技术有限公司。免疫组织化学 PowerVision™-PV6002 试剂盒为美国 PowerVision 公司生产。化学发光底物显色试剂盒为 Santa Cruz 公司生产。

## 1.2 动物分组和模型的建立

49 只约 2 个月龄雄性日本大耳白兔(购自北京科宇动物养殖中心),体重 1.6~2.2 kg,观察 1 周后随机分为 5 组:正常对照组( $n=9$ ),模型组( $n=10$ ),阿司匹林组[12 mg/(kg·d), $n=10$ ],氯吡格雷组[4 mg/(kg·d), $n=10$ ],合用组[阿司匹林 12 mg/(kg·d)和氯吡格雷 4 mg/(kg·d), $n=10$ ]。正常对照组喂养正常饲料。后四组均以 2% 高胆固醇饲料每只每日 100 g 喂养,两周后予以 10% 牛血清白蛋白 250 mg/kg 静脉注射,每周 1 次,共 3 次。阿司匹林和氯吡格雷予灌胃法给药,正常对照组和模型组灌等量蒸馏水。每周测量体重,共 12 周。去除实验过程中死亡和患病者,每组各剩 9 只。

## 1.3 血清血脂检测

于实验前(0 周)、处死动物前(12 周)经兔耳缘静脉空腹抽血,用酶学法测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)浓度,采用 Friedewald 公式“低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)(mmol/L)=TC-HDLC-TG/2.2”计算 LDLC。

## 1.4 病理形态学观察和免疫组织化学检查

12 周时处死动物于胸主动脉上段(第四肋间动脉处)取材,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚横截面切片,行苏木素—伊红(HE)染色,并分别用小鼠抗兔巨噬细胞单克隆抗体 RAM11(工作浓度为 1:25)、小鼠平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 1A4(工作浓度为 1:400)和 MMP-1 单克隆抗体(2.5 mg/L)行 EnVision 法免疫组织化学染色。设替代对照(PBS 代替一抗),棕黄色颗粒状产物为阳性标记。在 200 倍镜下随机取 3 至 5 个视野(均包含整个内膜),采用天地病理、细胞图像分析系统 TD2000(version 1.0)计算巨噬细胞和平滑肌细胞阳性细胞百分率。所有指标操作两次,取平均值。并观察动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞部位、平滑肌细胞部位与 MMP-1 阳性区域在定位上的关系。

## 1.5 蛋白印迹法检测主动脉组织基质金属蛋白酶 1 的表达

取主动脉弓起始 1/3 处组织置液氮中保存,提

取蛋白并定量,经聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白(上样量为 30 μg 总蛋白),电转膜法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,封闭、加 MMP-1 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000 稀释),化学发光试剂增强反应,X 线片压片曝光,以 Gel-Pro3.1 分子生物学专用图像软件对其进行灰度对比分析。以正常对照组的蛋白表达水平为基准,计算模型组和各抗血小板药物组 MMP-1 蛋白表达的相对量。

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS8.0 统计软件进行数据分析,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用方差分析,两组间比较用  $t$  检验。

# 2 结果

## 2.1 血脂和体重变化

喂养 12 周后,各组动物的体重均较喂养前显著增加( $P<0.05$ ),但各组之间无统计学差异( $P<0.05$ );四个高胆固醇饲料组动物血清 TC、LDLC、TG 水平也均较喂养前明显升高( $P<0.05$ 或 $0.01$ ),且显著高于同时时间点的正常对照组( $P<0.01$ ),但四组之间无统计学差异( $P>0.05$ )(表 1)。

## 2.2 病理形态学观察和免疫组织化学分析

光镜下,正常对照组主动脉内膜无脂纹、斑块和泡沫细胞,管腔未见异常改变;模型组内膜增厚最显著,脂质增加,含大量泡沫细胞;阿司匹林组和氯吡格雷组有所减轻;合用组最轻,脂质和泡沫细胞数量明显减少。免疫组织化学分析发现,巨噬细胞和平滑肌细胞源性泡沫细胞是动脉粥样硬化斑块中的主要组成细胞。正常对照组的内膜未见巨噬细胞和平滑肌细胞源性泡沫细胞;与模型组相比,阿司匹林组、氯吡格雷组和合用组动脉粥样硬化斑块巨噬细胞含量分别减少 28.7%、28.8% 和 57.7%,而平滑肌细胞含量分别增加 39.9%、42.6% 和 100.7%,合用组与阿司匹林组、氯吡格雷组相比差异有显著性( $P<0.01$ ),阿司匹林组和氯吡格雷组之间差异无显著性( $P>0.05$ )(表 2)。动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞部位与 MMP-1 阳性区域存在定位上的对应关系(图 1)。

## 2.3 主动脉组织基质金属蛋白酶 1 蛋白的表达

正常对照组、模型组、阿司匹林组、氯吡格雷组和合用组主动脉组织 MMP-1 蛋白表达的光密度值分别为:1.08±0.33、6.07±2.53、2.34±0.96、2.28±1.00 和 1.92±0.96。模型组、阿司匹林组、氯吡格雷组、合用组主动脉组织 MMP-1 蛋白的表达分别

是正常对照组的 562%、217%、211% 和 178%。与模型组相比,阿司匹林组、氯吡格雷组和合用组 MMP-1 蛋白表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ );阿司匹林组和

氯吡格雷组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ );与阿司匹林组、氯吡格雷组相比,合用组有使 MMP-1 蛋白表达量进一步降低的趋势(图 2)。

表 1. 各组体重和血清血脂水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ )

指 标	时 间	对照组	模型组	阿司匹林组	氯吡格雷组	合用组
体重 (kg)	0 周	1.73 $\pm$ 0.16	1.76 $\pm$ 0.15	1.83 $\pm$ 0.19	1.76 $\pm$ 0.15	1.86 $\pm$ 0.18
	12 周	3.12 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	3.12 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	3.20 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	3.18 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
TG (mmol/L)	0 周	0.80 $\pm$ 0.31	1.02 $\pm$ 0.60	0.76 $\pm$ 0.55	0.81 $\pm$ 0.42	1.03 $\pm$ 0.60
	12 周	0.88 $\pm$ 0.30	2.16 $\pm$ 0.87 <sup>ac</sup>	2.23 $\pm$ 0.80 <sup>bc</sup>	1.67 $\pm$ 0.74 <sup>bc</sup>	2.21 $\pm$ 0.98 <sup>ac</sup>
TC (mmol/L)	0 周	1.83 $\pm$ 0.65	2.29 $\pm$ 0.56	1.88 $\pm$ 0.47	1.88 $\pm$ 0.57	2.23 $\pm$ 0.64
	12 周	1.93 $\pm$ 0.84	48.44 $\pm$ 8.56 <sup>bc</sup>	51.79 $\pm$ 5.54 <sup>bc</sup>	48.80 $\pm$ 12.12 <sup>bc</sup>	54.62 $\pm$ 8.89 <sup>bc</sup>
HDLc (mmol/L)	0 周	0.49 $\pm$ 0.15	0.60 $\pm$ 0.15	0.59 $\pm$ 0.17	0.55 $\pm$ 0.12	0.57 $\pm$ 0.16
	12 周	0.69 $\pm$ 0.36	0.63 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.15	0.64 $\pm$ 0.22	0.51 $\pm$ 0.15
LDLC (mmol/L)	0 周	0.98 $\pm$ 0.64	1.23 $\pm$ 0.29	0.95 $\pm$ 0.51	0.97 $\pm$ 0.48	1.20 $\pm$ 0.47
	12 周	0.85 $\pm$ 0.82	46.83 $\pm$ 8.32 <sup>bc</sup>	50.09 $\pm$ 5.27 <sup>bc</sup>	47.40 $\pm$ 11.95 <sup>bc</sup>	53.15 $\pm$ 8.60 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与 0 周时相比; c 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组同时点相比。

表 2. 各组主动脉斑块部位免疫组织化学染色结果( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	巨噬细胞阳性率	平滑肌细胞阳性率
模型组	8	57.5% $\pm$ 8.4%	37.3% $\pm$ 3.4%
阿司匹林组	9	41.0% $\pm$ 5.9% <sup>a</sup>	52.1% $\pm$ 4.0% <sup>a</sup>
氯吡格雷组	7	40.9% $\pm$ 7.1% <sup>a</sup>	53.2% $\pm$ 7.0% <sup>a</sup>
合用组	7	24.3% $\pm$ 13.2% <sup>ab</sup>	74.8% $\pm$ 13.5% <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与模型组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与阿司匹林组和氯吡格雷组相比。

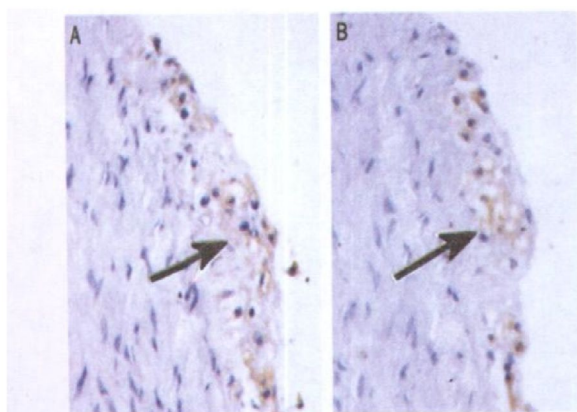


图 1. 合用组动脉粥样硬化病变的免疫组织化学分析 (EnVision  $\times 200$ ) A 为巨噬细胞, B 为基质金属蛋白酶 1。

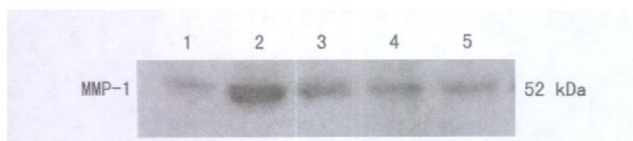


图 2. 蛋白印迹法检测各组主动脉组织基质金属蛋白酶 1 的表达 1 为正常对照组, 2 为模型组, 3 为阿司匹林组, 4 为氯吡格雷组, 5 为合用组。

### 3 讨论

冠状动脉粥样硬化斑块破裂并血栓形成是导致急性冠状动脉综合征的重要机制, 斑块的结构和自身组成成分对其稳定与否起重要作用<sup>[3]</sup>。斑块中脂质含量增加及巨噬细胞增加, 斑块容易发生破裂。细胞外基质含有的胶原具有弹性和韧性, 赋予斑块的完整性, 而 MMP 对细胞外基质具有极强的降解作用, 能够加速不稳定斑块的形成。MMP-1 是间质胶原的起始酶和限速酶, 可特异性地分解细胞外基质, 主要分解 IV 型和  $\alpha$  型胶原。病理研究显示, 斑块处 MMP-1 表达与斑块破裂之间存在正相关关系, 即 MMP-1 含量越高之处, 斑块越易破裂<sup>[4]</sup>。临床研究发现, 不稳定性斑块组的冠状静脉窦血和外周血 MMP-1 浓度明显大于稳定性斑块组, 且血 MMP-1 浓度与纤维帽厚度呈负相关<sup>[5]</sup>, 复杂冠状动脉病变患者的血 MMP-1 水平高于病变轻的患者<sup>[6]</sup>。

本文发现, 阿司匹林和氯吡格雷使 MMP-1 蛋白表达量显著降低, 两药合用后有使 MMP-1 表达进一步减少的趋势。并且阿司匹林和氯吡格雷减少斑块中巨噬细胞含量, 增加平滑肌细胞含量, 两药合用作用叠加。动脉粥样硬化斑块内 MMP-1 阳性细胞大部分为 RAM11 阳性的巨噬细胞, 即 MMP-1 大部分由巨噬细胞产生。动脉粥样硬化作为一种炎症性疾病, 在其形成和演化过程中, 产生多种炎症介质和细胞因子, 在它们的作用下巨噬细胞成为表达 MMP 的主要细胞<sup>[7]</sup>。体外培养证实直接接触脂质的单核细

胞源性巨噬细胞具有产生 MMP 和降解胶原的作用<sup>[8]</sup>。斑块内聚集的大量巨噬细胞在 ox-LDL 的刺激下,过度分泌 MMP,导致斑块破裂<sup>[9]</sup>。研究表明阿司匹林和氯吡格雷可抑制斑块中巨噬细胞的迁移和增殖,减轻动脉局部的炎症反应,联合使用可能通过阻断血小板活化的多种途径,抑制释放和表达的炎症介质(如 CD40/CD40L 系统)参与动脉粥样硬化病变的进展<sup>[10,11]</sup>。本研究结果提示抗血小板药物阿司匹林和氯吡格雷不仅使动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞含量明显减少,同时能够抑制斑块内巨噬细胞表达 MMP-1,从而起到稳定斑块的作用。此外,阿司匹林和氯吡格雷还能改变动脉粥样硬化斑块的组成成分,使脂质含量减少、巨噬细胞含量明显减少、平滑肌细胞含量明显增加,增加斑块的稳定性。

尽管降脂药和血管紧张素转化酶抑制剂是目前公认的能改变斑块组成成份、增加斑块稳定性的临床治疗药物,但新近有研究表明抗血小板药物阿司匹林也有类似作用。Cyrus 等<sup>[2]</sup>利用高胆固醇饮食诱发 LDL 受体缺陷小鼠模型证明小剂量阿司匹林能减轻血管的炎症反应,增加斑块中平滑肌细胞含量和胶原含量,减少巨噬细胞含量和脂质含量,从而增加斑块的稳定性。本研究证明阿司匹林和氯吡格雷有稳定斑块的作用,两药合用其作用似乎更强。

## [参考文献]

- [1] Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases 1 and -3 in vulnerable atheromatous plaques [J]. *Circulation*, 1999, **99** (19): 2 503-509
- [2] Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratic D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Circulation*, 2002, **106** (10): 1 282-287
- [3] 郭爱桃, 韦立新, 李向红. 冠状动脉粥样硬化斑块组成成分与斑块破裂的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 357-359
- [4] 郭爱桃, 韦立新, 石怀银, 李向红, 游联璧. 基质金属蛋白酶 1 与冠状动脉粥样硬化斑块破裂的关系[J]. *中华病理学杂志*, 2000, **29** (4): 263-266
- [5] 余丹青, 陈纪言, 李光, 罗建方, 李瑜辉. 基质金属蛋白酶与冠状动脉斑块稳定性相关研究[J]. *中国循环杂志*, 2003, **18** (2): 105-107
- [6] Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, et al. Levels of matrix metalloproteinase 1 in patients with and without coronary artery disease and relation to complex and noncomplex coronary plaques [J]. *Am J Cardiol*, 2005, **95** (1): 90-92
- [7] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and ugly [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (3): 251-262
- [8] Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis: implication for plaque rupture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (8): 1 070-073
- [9] Ambrose JA, Martinez EE. A new paradigm for plaque stabilization [J]. *Circulation*, 2002, **105** (16): 2 000-004
- [10] 顾晴, 陈纪林, 阮英菲. 阿司匹林、氯吡格雷及合用对兔动脉粥样硬化病变进展的抑制作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, **27** (1): 87-91
- [11] 张峻, 陈纪林, 顾晴, 关婷, 陈曦. 抗血小板药物抑制动脉粥样硬化进展及机制研究[J]. *中国循环杂志*, 2005, **20** (6): 463-467

(此文编辑 许雪梅)

•读者•作者•编者•

## 关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

由于网络的发展, E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部采用, 我刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较, E-mail 投稿具有快捷、方便、直观等特点, 且费用低廉。然而, 在接受 E-mail 投稿过程中我们发现, 稿件文本不一, 格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内, 经过传输, 文章早已面目全非, 又没有纸打印稿作对照, 不知文章里写了些什么, 尤其是当今计算机病毒肆虐, 新的病毒层出不穷, 一不小心染上病毒, 整个文件就要被删除。为规范 E-mail 投稿, 确保其安全性, 我刊特作如下规定:

1、E-mail 投稿时, 必须把文章作为附件发送, 严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。

2、附件中的文章应为 Word 格式。书写时, 进入 Word 界面后, 应首先进入页面设置窗口设置页面, 参数如下: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm, 下为 2.0 mm, 左为 2.2 mm, 右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字, 每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。然后点击选择其它参数, 如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。

3、插图粘贴于正文相应位置中, 表格直接在正文中绘制; 标题与注释直接写于正文相应位置, 严禁以文本框形式插入。

4、E-mail 投稿时, 科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信这两件不要扫描放入 E-mail 内, 请另用信函形式邮寄编辑部, 以方便存档。

5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。