

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0105-04

• 实验研究 •

缬沙坦的抗动脉粥样硬化作用及其可能机制

曾永利, 成 蓓, 马志强

(华中科技大学同济医学院附属协和医院综合科, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 内科学; 缬沙坦; 过氧化体增殖物激活型受体 γ ; 单核细胞趋化蛋白 1; 白细胞介素 6; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究血管紧张素 AT_1 型受体拮抗剂缬沙坦对兔动脉粥样硬化病变中过氧化体增殖物激活型受体 γ 及单核细胞趋化蛋白 1 和白细胞介素 6 的影响。方法 24 只雄性大耳兔随机分为 3 组: 正常组 ($n=8$), 高胆固醇饮食组 (1% 胆固醇+ 5% 猪油颗粒饲料, $n=8$), 缬沙坦组 [10 mg/(kg·d), $n=8$], 喂养 12 周。对各组兔采血进行血脂测定, 主动脉内膜/中膜比值测定, 采用逆转录聚合酶链反应检测过氧化体增殖物激活型受体 γ 和单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达, 采用酶联免疫吸附测定法检测兔血清白细胞介素 6 的水平。结果 缬沙坦组过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的表达较高胆固醇饮食组明显增加 (1.75 ± 0.23 比 1.12 ± 0.16 , $P < 0.05$), 缬沙坦组单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达较高胆固醇饮食组明显减少 (1.14 ± 0.22 比 1.95 ± 0.32 , $P < 0.05$)。缬沙坦组白细胞介素 6 水平较高胆固醇饮食组明显减少 (32.42 ± 6.12 比 83.73 ± 5.42 ng/L, $P < 0.05$)。缬沙坦组内膜/中膜厚度比值较高胆固醇饮食组明显减少 ($P < 0.05$)。缬沙坦组及高胆固醇饮食组的血清胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇差异无显著性, 但均明显高于正常组 ($P < 0.01$)。结论 缬沙坦抑制兔动脉粥样硬化主动脉单核细胞趋化蛋白 1 的表达和血清白细胞介素 6 水平, 其机制可能是增加过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 表达有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Valsartan on Atherosclerosis in the Cholesterol-fed Rabbits

ZENG Yong-Li, CHENG Bei, and MA Zhi-Qiang

(Department of Polyclinical Therapeutics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China)

[KEY WORDS] Valsartan; Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma; Monocyte Chemoattractant Protein 1; Interleukin 6; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of Valsartan on the mRNA expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and the secretion of interleukin 6 (IL-6) in experimental atherosclerotic rabbits. **Methods** Male Japanese White Rabbits were randomly divided into three groups: control group, cholesterol group, Valsartan group. All rabbits were fed according to experiment design for 12 weeks. Blood samples were taken from vein for detection of serum lipid. The intima-media thickness was measured. PPAR γ and MCP-1 were examined by reverse transcription polymerase chain reaction. IL-6 in serum was evaluated by ELISA. **Results** The expression of PPAR γ mRNA was higher in Valsartan group than cholesterol group (1.75 ± 0.23 vs 1.12 ± 0.16 , $P < 0.05$). The expression of MCP-1 mRNA was lower in Valsartan group than cholesterol group (1.14 ± 0.22 vs 1.95 ± 0.32 , $P < 0.05$). The levels of IL-6 was lower in Valsartan group than cholesterol group (32.42 ± 6.12 vs 83.73 ± 5.42 ng/L, $P < 0.05$). The ratio of intima-media reduced obviously in Valsartan group than those of cholesterol group ($P < 0.05$). Levels of serum TC, TG, LDL-C in cholesterol group and Valsartan group were significant higher than those of control group ($P < 0.01$), but they had not significant difference between cholesterol group and Valsartan group. **Conclusions** Valsartan could inhibit the MCP-1 mRNA expression and IL-6 level by increasing PPAR γ mRNA expression in experimental atherosclerotic rabbits.

近年来的研究提示炎症反应在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生、发展中起重要作用, 炎症反应的激活可能是导致斑块不稳定的一个重要因素^[1]。研究表明单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte che-

moattractant protein 1, MCP-1) 在动脉粥样硬化的发生、发展和不稳定斑块的形成中起重要作用^[2]。白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是炎症反应中的关键因子之一, 与 As 进展密切相关^[3]。过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 通过调控相应基因的表达, 减少炎症介质的产生和释放, 对动脉粥样硬化有抑制作用^[4]。近年来研究表明肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 中的血管紧张素 ET

[收稿日期] 2006-09-14 [修回日期] 2006-02-10

[作者简介] 曾永利, 硕士研究生, 住院医师, 主要研究方向为冠心病基础和临床治疗, 联系方式为 027-63204187, E-mail 为 zyluh@126.com。通讯作者成蓓, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为冠心病和高血压基础和临床治疗, 联系方式为 027-85351552, E-mail 为 cheng-bei81@yahoo.com.cn。马志强, 博士研究生, 副主任医师, 主要研究方向为冠心病基础和临床治疗, E-mail 为 mazy@tom.com。

(angiotensin I_2 , Ang I_2) 通过致炎作用参与 As 的发生、发展过程^[5]。但是其机制并不明确。本实验旨在建立兔动脉粥样硬化模型,在病理状态下观察血管紧张素 I_1 型受体拮抗剂缬沙坦 (Valsartan) 对 MCP-1 和 IL-6 以及 PPAR γ 变化的影响,探讨其抗炎和抗动脉粥样硬化的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组

日本大耳白兔 24 只(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供),体重为 2.0 ± 2.2 kg, 雄性。随机分为 3 组,每组 8 只。正常组:喂以普通兔饲料;高胆固醇饮食组:喂以含 1% 胆固醇,5% 猪油的兔饲料;缬沙坦组:喂以含 1% 胆固醇,5% 猪油的兔饲料加 10 mg/(kg·d) 体重缬沙坦(代文),北京诺华制药有限公司产品(生产批号: XO119)。每兔每日总食量约为 120 g,单笼喂养,喂养 12 周。

1.2 标本采集

第 12 周末以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉兔,取耳缘静脉血 2 mL,静置离心, -20°C 保存。麻醉状态下,剖开动物胸腔,剥离升主动脉至腹主动脉分叉处,去除外膜脂肪组织,取主动脉根部至主动脉弓立即置于液氮中保存,取主动脉近端 1 cm 置 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋。

1.3 血脂测定

取得的静脉血静置,离心取血清,采用 HITACHI7170A 临床化学分析仪测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG) 和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

1.4 动脉血管内膜和中膜比值测定

固定后的血管经石蜡包埋,连续切片,厚度为 4 ~ 5 μm ,石蜡切片经苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE) 染色,在 HPIAS2000 型图像分析仪上测定血管壁内膜和中膜的厚度,计算内膜/中膜比值。

1.5 主动脉血管壁单核细胞趋化蛋白 1 和过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ mRNA 测定

按照 Trizol (Invitrogen 公司产品) 说明书提取动脉组织 RNA,采用紫外分光光度计测定其浓度。取细胞总 RNA 2 μL ,按逆转录试剂盒(TaKaRa 公司产品) 说明逆转录合成 cDNA。每一标本取逆转录产物 4 μL 进行逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, PCR) 反应。MCP-1 上游引物: 5'-TGT GCT TGC CCA GCC AGA TG-3', 下游引

物: 5'-GTG TCT GCA TTT TCT TGT CC-3', PCR 扩增片段大小为 230 bp。PPAR γ 上游引物: 5'-GGC TTC CAC TAT GGA GTT CAT GC-3', 下游引物: 5'-GAG GAC CCC GTC TTT ATT CAT CA-3', PCR 扩增片段大小为 663 bp。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase GAPDH) 为内对照物,上游引物 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA-3', 下游引物 5'-CAC AAT GCC GAA GTG GTC GT-3', PCR 扩增片段大小为 293 bp。以 cDNA 为模板加入 TaqDNA 合成酶, $10\times$ Buffer, Mg^{2+} , dNTP 和上下引物进行 PCR 反应,每管 PCR 反应体系中均加入内对照引物 GAPDH。MCP-1 PCR 反应条件: 94°C 变性 5 min $\rightarrow 94^\circ\text{C}$ 30 s $\rightarrow 54^\circ\text{C}$ 40 s $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 30 s, 进行 35 个循环, 72°C 延伸 7 min。PPAR γ PCR 反应条件: 94°C 变性 5 min $\rightarrow 94^\circ\text{C}$ 30 s $\rightarrow 57^\circ\text{C}$ 40 s $\rightarrow 72^\circ\text{C}$ 30 s, 进行 35 个循环, 72°C 延伸 7 min。所得 PCR 产物点样于 1.5% 的琼脂糖上, EB 染色, 观察结果。在 HPIAS2000 型图像分析仪上对电泳结果进行扫描分析, 并计算 MCP-1 及 PPAR γ 与内对照 GAPDH 的 OD 比值。

1.6 各组兔血清中白细胞介素 6 水平的测定

酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定兔血浆 IL-6 的水平,(试剂盒购自深圳晶美公司),测定血清 IL-6 的水平采用标准品稀释液来稀释标准品。严格按试剂盒和酶标仪说明书提示的步骤进行操作。

1.7 统计分析

应用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组血脂检测结果采用方差分析,组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 为统计学差异有显著性。

2 结 果

2.1 各组血脂结果

经 12 周喂养后,缬沙坦组和高胆固醇饮食组的 TC、TG、LDLC 差异均无显著性($P > 0.05$),而两组的上述指标均明显高于正常组($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 各组病理学改变及各组内膜,中膜厚度的影响

标本在光镜下可见正常组血管分层清晰,内膜完整,内皮细胞连续;高胆固醇饮食组血管内皮不连续,内膜明显增厚,增厚的内膜中可见大量泡沫细胞;缬沙坦组内膜局限性隆起,较高胆固醇饮食组内膜下泡沫细胞减少(图 1)。高胆固醇饮食组内膜/中膜厚度比值较正常组明显增多($P < 0.01$)。缬沙坦组内膜/中膜厚度比值较高胆固醇饮食组明显减

少($P < 0.05$, 表 2)。

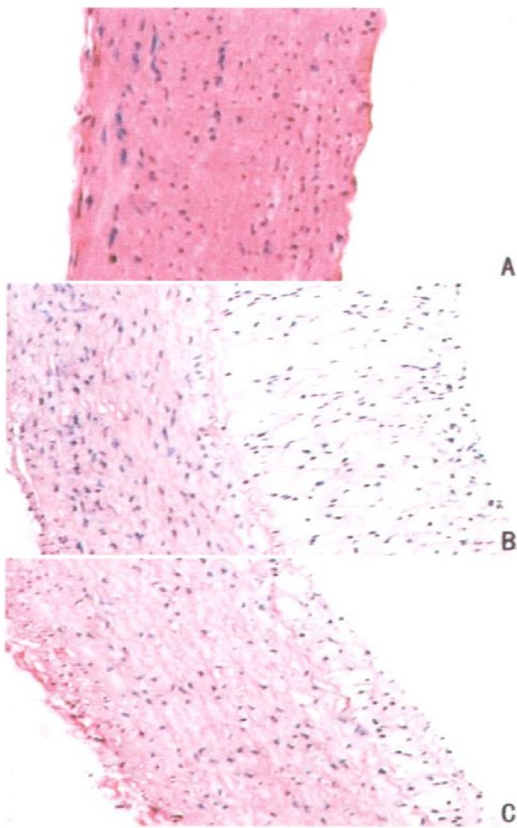


图 1. 各组主动脉光镜下病理改变 A 为正常组; B 为高胆固醇饮食组; C 为缬沙坦组。

表 1. 第 12 周各组血脂检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
正常组	1.35 ± 0.12	0.70 ± 0.15	0.61 ± 0.22
高胆固醇饮食组	24.83 ± 1.15 ^a	2.78 ± 0.35 ^a	22.68 ± 0.87 ^a
缬沙坦组	22.01 ± 0.93 ^a	2.13 ± 0.36 ^a	20.15 ± 0.84 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较。

表 2. 各组主动脉内膜和中膜厚度检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	内膜厚度(μm)	中膜厚度(μm)	内膜/中膜厚度值
正常组	9.97 ± 3.32	244.68 ± 21.21	4.12% ± 1.21%
高胆固醇饮食组	187.87 ± 79.85 ^a	310.38 ± 89.23	62.99% ± 22.73% ^a
缬沙坦组	66.86 ± 36.89 ^{ab}	263.20 ± 32.56	10.56% ± 9.18% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高胆固醇饮食组比较。

2.3 缬沙坦对兔主动脉组织单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的影响

高胆固醇饮食组 MCP-1 mRNA (1.95 ± 0.32) 表达较正常组 MCP-1 mRNA (0.34 ± 0.19) 表达明显增多($P < 0.05$), 缬沙坦组 MCP-1 mRNA 表达(1.14 ± 0.22) 较高胆固醇饮食组 MCP-1 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 缬沙坦对兔主动脉组织过氧化体增殖物激活型受体 γ mRNA 的影响

高胆固醇饮食组 PPAR γ mRNA (1.12 ± 0.16) 表达较正常组 PPAR γ mRNA (0.24 ± 0.12) 表达明显增多($P < 0.05$), 而缬沙坦组 PPAR γ mRNA (1.75 ± 0.23) 较高胆固醇饮食组 PPAR γ mRNA 表达明显增多($P < 0.05$, 图 3)。

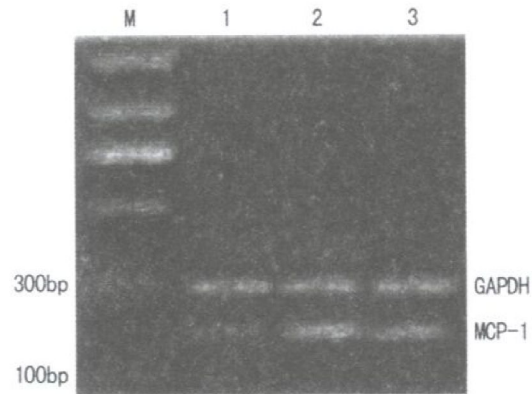


图 2. 各组 MCP-1 mRNA 的表达情况 M 为 DNA 分子质量标准; GAPDH 为 293 bp; MCP-1 为 230 bp; 1 为正常组; 2 为高胆固醇饮食组; 3 为缬沙坦组。

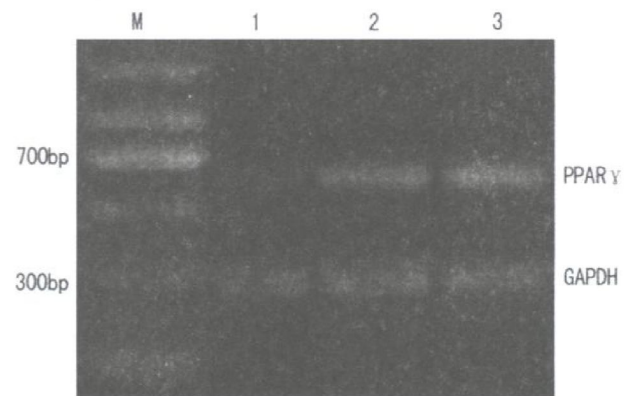


图 3. 各组 PPAR γ mRNA 的表达情况 M 为 DNA 分子质量标准; GAPDH 为 293 bp; PPAR γ 为 663 bp; 1 为正常组; 2 为高胆固醇饮食组; 3 为缬沙坦组。

2.5 各组兔外周血白细胞介素 6 水平的变化

喂养 12 周后, 高胆固醇饮食组 IL-6 水平(83.73 ± 5.42 ng/L) 较正常组(4.06 ± 1.12 ng/L) 明显增多($P < 0.05$), 而缬沙坦组 IL-6(32.42 ± 6.12 ng/L) 水平较高胆固醇饮食组明显降低($P < 0.05$)。

3 讨论

越来越多的证据表明, 高血压可以通过促炎症反应促进动脉粥样硬化的发展, 炎症反应已成为动脉粥样硬化与高血压这两种疾病的“桥梁”。血管紧

张素 ① 在体内广泛分布,特别是心脏,血管局部 Ang ② 在动脉粥样硬化形成和发展的多个环节中起作用。有研究表明 Ang ③ 通过诱导 MCP-1 及 MCP-1 受体(CCR2)的表达,参与了动脉粥样硬化的形成和发展^[6]。研究发现^[7], Ang ④ 能够引起血管平滑肌细胞产生白细胞介素 6,表明 Ang ⑤ 具有强烈的致炎症作用。在本实验中发现血管紧张素 ⑥ 型受体拮抗剂缬沙坦可以抑制兔动脉粥样硬化主动脉组织中 MCP-1 mRNA 表达和血清 IL-6 的水平,支持缬沙坦具有抗炎的作用,同时发现缬沙坦增加主动脉组织 PPAR γ mRNA 的表达,提示缬沙坦抗炎作用可能与增加 PPAR γ mRNA 的表达有关。

动脉粥样硬化斑块具有许多炎症反应激活的特征,包括单核细胞进入血管壁并被激活,内皮细胞激活,细胞因子和趋化因子等促炎介质上调等。单核/巨噬细胞向内膜下迁移是动脉粥样硬化发生中的早期和关键事件。实验发现,不同阶段 As 病变组织中均有大量 MCP-1 mRNA 表达,提示在食饵性 As 时,参与 As 斑块形成的动脉壁细胞处于相当活跃的状态,可能不同程度地产生和分泌 MCP-1^[8]。Ni 等^[9]在大鼠实验中,通过转染人 MCP-1 缺失型突变体,阻断 MCP-1 的表达,抑制了 Ang ⑦ 诱导的动脉粥样硬化病变的进程,同时也抑制了 Ang ⑧ 诱导的多种炎症基因的表达。以上结果提示抑制 MCP-1 对延缓动脉粥样硬化的进程有重要作用。白细胞介素 6(IL-6)是一种重要的炎症细胞因子,在调节免疫应答和炎症反应中起重要作用,可通过复杂的细胞因子网络促进动脉粥样硬化的发生和发展。研究表明动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞分泌释放的 IL-6 诱导白细胞聚集,增强斑块炎症反应,上调巨噬细胞内多种金属蛋白酶的表达^[10],参与斑块破裂和血栓形成。有研究表明缬沙坦除降血压作用外,还可减少已受损动脉表达 IL-6,抑制其中性粒细胞和巨噬细胞的渗出^[11],减轻炎症反应。本研究发现缬沙坦显著降低兔动脉粥样硬化病变中 MCP-1 mRNA 的表达和血清中 IL-6 水平,说明缬沙坦通过抑制单核细胞的趋化和炎症因子的表达而发挥抗动脉粥样硬化作用。

为了进一步研究缬沙坦抑制炎症因子的可能机制,本实验检测了缬沙坦对 PPAR γ mRNA 的影响,结果表明缬沙坦增加 PPAR γ mRNA 表达,同样,有研究发现沙坦类药物能增加血管内皮细胞上 PPAR γ 的表达^[12]。PPAR γ 的激活能够抑制内皮细胞 MCP-1,及其受体 CCR2,血管细胞黏附分子-1(vascular cell

adhesion molecule-1, VCAM-1) 和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达,从而抑制单核细胞和 T 淋巴细胞的黏附和募集^[13]。目前认为,PPAR 主要是抑制了炎症因子基因转录中 3 个关键的转录因子:核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB), 激动蛋白 1(activator protein 1, AP-1) 和转录信号传感及激活因子的功能而发挥调控作用。Kim 等^[14] 研究发现 PPAR γ 抗炎作用可能通过拮抗核因子核因子 κB 的活性,通过抑制核因子 κB 的激动亚单位 P65/RelA 转录而实现的。因此 PPAR γ 和核因子 κB 的关系有待进一步研究。总之,缬沙坦通过阻断 Ang ⑨ 的作用,抑制 MCP-1 mRNA 的表达和 IL-6 水平而发挥抗炎作用抑制动脉粥样硬化,其机制可能是增加 PPAR γ mRNA 的表达。

[参考文献]

- [1] 陈学军, 李建军. C 反应蛋白与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化志, 2002, 10 (4): 355-357.
- [2] Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2001, 104 (3): 365-372.
- [3] Ito T, Ikeda U, Shimpo M. Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2000, 102: 2 522-527.
- [4] Staels B. PPAR gamma and atherosclerosis [J]. *Curr Med Res Opin*, 2005, 21 (Suppl 1): S13-S20.
- [5] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35: 881-900.
- [6] Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11 (6): RA194-205.
- [7] Kranzhofner R, Schmidt J, Pfeffer CA, Hagl S, Lipp P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 1 623-629.
- [8] 崔华, 何作云. 不同阶段食饵性动脉粥样硬化兔血管壁核因子 κB 活化和单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 C α 表达的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (4): 312-314.
- [9] Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K. Monocyte chemoattractant protein 1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (3): 534-539.
- [10] Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisl S, Xu XO, Chai NN. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators [J]. *Circulation*, 1999, 99: 3 103-109.
- [11] Wu L, Iwai M, Nakagami H, Li Z, Chen R, Suzuki J. Roles of angiotensin ⑩ type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin ⑪ type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury [J]. *Circulation*, 2001, 104: 2 716-721.
- [12] Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity [J]. *Circulation*, 2004, 109 (17): 2 054-057.
- [13] Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao G. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone [J]. *Hypertension*, 2002, 40 (5): 687-693.
- [14] Kim YS, Han CY, Kim SW, Kim JH, Lee SK, Jung DJ. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner as a novel coregulator of nuclear factor-kappa b in oxidized low density lipoprotein-treated macrophage cell line RAW 264.7 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (36): 33736-740.

(此文编辑 李小玲)