

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-0193-04

• 实验研究 •

阿司匹林和氟伐他汀对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的血管平滑肌细胞环氧合酶 2 表达的抑制作用

刘红梅, 黄体钢, 王 林, 甄 琴, 杨万松

(天津医科大学第二医院心脏科, 天津市 300211)

[关键词] 内科学; 环氧合酶 2; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$; 阿司匹林; 氟伐他汀; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞

[摘要] **目的** 观察血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的人脐动脉平滑肌细胞环氧合酶 2 的表达, 并探讨阿司匹林和氟伐他汀的干预作用。**方法** 培养人脐动脉平滑肌细胞, 用不同浓度的血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 作用细胞, 观察环氧合酶 2 的表达; 用不同浓度的阿司匹林、氟伐他汀或二者联用药物预处理细胞, 观察血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的环氧合酶 2 的表达。分别采用逆转录聚合酶链反应和细胞免疫化学染色法检测环氧合酶 2 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 可诱导人脐动脉平滑肌细胞环氧合酶 2 mRNA 的表达, 且呈浓度依赖性, 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时环氧合酶 2 表达最强; 阿司匹林和氟伐他汀均可抑制血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 对环氧合酶 2 的诱导, 且随着药物浓度增大抑制作用增强; 与单独应用阿司匹林或氟伐他汀比较, 二者联合应用时血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的环氧合酶 2 表达水平明显减低 ($P < 0.05$); 细胞爬片免疫组织化学实验与以上结果符合。**结论** 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 可诱导人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 的表达, 可能在动脉粥样硬化病变过程发挥重要作用; 阿司匹林和他汀类药物抑制血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 对环氧合酶 2 的诱导, 且有协同抑制作用, 为指导临床用药提出了新的思路。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Inhibition of Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ Induced Expression of Cyclooxygenase-2 by Aspirin and Fluvastatin in Human Vascular Smooth Muscle Cells

LIU Hong-Mei, HUANG Ti-Gang, WANG Lin, ZHEN Qin, and YANG Wan Song

(Cardiology Department of the Second Hospital Affiliated Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[KEY WORDS] Cyclooxygenase-2; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; Aspirin; Fluvastatin; Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cell

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ induced cyclooxygenase-2 (COX-2) in cultured human umbilical vascular smooth muscle cells and investigate the influence of aspirin and fluvastatin on it. **Methods** Vascular smooth muscle cells were prepared from human umbilical arteries. The expression of COX-2 were observed in these cells after stimulated with different concentrations of angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ for 1 h, or stimulated with $\text{Ang} \text{ II}$ after treated with different concentrations of aspirin or fluvastatin or their combination for 1 h. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and cell immunocytochemistry were used for COX-2 mRNA and protein analysis. **Results** The expression of COX-2 mRNA was markedly increased under the stimulation of $\text{Ang} \text{ II}$ in a dose dependent manner and reached to the peak when the concentration of $\text{Ang} \text{ II}$ was 1.0 $\mu\text{mol/L}$. This effect was inhibited by aspirin and fluvastatin, and the amount of COX-2 mRNA decreased gradually when the drugs dose increased. The amount of COX-2 mRNA was even lower in the drugs combination group than those in monotherapies groups ($P < 0.05$). Results of the COX-2 protein expression with cell immunocytochemistry were coincident with those of mRNA expression with RT-PCR. **Conclusions** COX-2 can be induced by $\text{Ang} \text{ II}$ in cultured human vascular smooth muscle cells, which may play an important role in the progression of atherogenesis. Aspirin and fluvastatin can suppress the expression of COX-2, which may bring a novel therapeutic idea for drugs use.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一个有许多炎症细胞和因子参与的慢性炎症反应过程^[1]。环氧合酶 (cyclo-oxygenase, COX) 是花生四烯酸合成前

列腺素 (prostaglandin, PG) 和血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 的重要限速酶。大量研究证实 COX-2 可在 As 病变处表达并受多种炎症细胞因子调节^[2], 提示 COX-2 不仅参与 As 的病理发生, 而且可能影响斑块的稳定性^[3]。血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$) 具有促炎症作用, 参与许多心血管疾病过程。Ang II 可诱导 COX-2 的表达在动物实验已得到证实^[4], 但在人血管细胞中的研究尚不多见。阿司匹林和他汀类药物目前是治疗冠心病的一线用药。他

[收稿日期] 2006-09-14 [修回日期] 2007-02-01

[作者简介] 刘红梅, 博士研究生, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 Raincho@163.com。通讯作者黄体钢, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管内科。王林, 博士研究生, 研究方向为心血管内科, 现工作单位为天津市胸科医院心内科。

汀类药物对 COX-2 的作用目前研究尚少且存在分歧^[5], 而阿司匹林和他汀类药物联合应用后对 COX-2 的影响在国内外均未见报道。本文观察 Ang Ⅱ 对人脐动脉平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 中 COX-2 表达的影响, 并观察单用阿司匹林、氟伐他汀及二者联合应用时对 COX-2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

血管紧张素 Ⅱ 和阿司匹林 (Sigma 公司); 氟伐他汀 (北京诺华公司); RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa, 中国大连宝生物有限公司); COX-2 鼠抗人单克隆抗体、免疫组织化学染色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养与分组

用贴块法培养人脐动脉 SMC, 经鉴定后取第 2~3 代用于实验。Ang Ⅱ 刺激实验: 用不同浓度 Ang Ⅱ (终浓度分别为 0、0.001、0.01、0.1 和 1.0 μmol/L) 孵育 1 h; 药物干预实验: 分别用终浓度为 0.5、1.0、2.0 和 5.0 mmol/L 阿司匹林孵育 1 h 后, 加入 0.1 μmol/L Ang Ⅱ 继续孵育 1 h; ④ 分别用终浓度为 0.1、1.0 和 10.0 μmol/L 氟伐他汀孵育 1 h 后, 加入 0.1 μmol/L Ang Ⅱ 继续孵育 1 h; ④ 用 2.0 mmol/L 阿司匹林和 1.0 μmol/L 氟伐他汀孵育 1 h 后加入 0.1 μmol/L Ang Ⅱ 继续孵育 1 h; 非药物处理组用 0.1 μmol/L Ang Ⅱ 孵育 2 h, 不加药物干预。各组均重复 3 次。

1.3 逆转录聚合酶链反应

采用 Trizol RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA。以 β-actin 作为内参照, 采用 PCR 反应试剂盒进行逆转录聚合酶链反应检测。COX-2 (225 bp) 上游引物为 5'-CCG TAT AAG TGC GAT TGT AC-3', 下游引物为 5'-TGG ACT GTC AAT CAA ATG TG-3'; β-actin (545 bp) 上游引物为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3', 下游引物为 5'-CIT TCT TAA TGT CAC GCA CGA TTT C-3'。COX-2 的反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性 50 s → 57℃ 退火 45 s → 72℃ 延伸 1 min, 循环 36 次, 72℃ 延伸 10 min; β-actin 的反应条件同上, 循环 30 次。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用 GENE Genius 凝胶成像系统观察分析, 测定各个条带的光密度值, 同一样品经 β-actin 光密度值校正后进行比较。

1.4 细胞免疫化学法

将培养的血管 SMC 接种于含盖玻片的六孔板

中, 待细胞增殖到合适密度后取出细胞爬片。冷丙酮固定 10 min, 进行细胞免疫化学染色。以 COX-2 鼠抗人单克隆抗体为一抗, 生物素标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, DAB 显色, 梯度乙醇脱水, 中性树脂封片。

1.5 统计学方法

用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验或 Dunnett's *T* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素 Ⅱ 诱导人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 表达

Ang Ⅱ 作用后 COX-2 mRNA 的表达明显增高, 呈浓度依赖性; 0.001 μmol/L Ang Ⅱ 即引起 COX-2 mRNA 的明显表达, 当 Ang Ⅱ 为 1.0 μmol/L 时表达最强, 不同浓度组间比较差异具有显著性 ($P < 0.05$; 表 1 和图 1)。

表 1. 不同浓度血管紧张素 Ⅱ 诱导的人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Ang Ⅱ (μmol/L)	COX-2 mRNA
0	0.25 ± 0.02 ^b
0.001	1.23 ± 0.01 ^{ab}
0.01	1.52 ± 0.06 ^{ab}
0.1	2.03 ± 0.15 ^{ab}
1.0	2.40 ± 0.12 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 μmol/L Ang Ⅱ 组比较; b 为 $P < 0.05$, 组间比较。

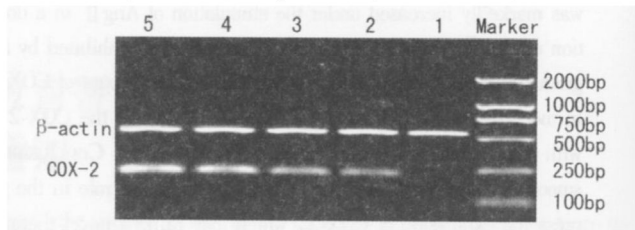


图 1. 不同浓度血管紧张素 Ⅱ 诱导的人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 mRNA 的表达 1~5 分别为 0、0.001、0.01、0.1 和 1.0 μmol/L 血管紧张素 Ⅱ。

2.2 阿司匹林和氟伐他汀对血管紧张素 Ⅱ 诱导的人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 表达的影响

阿司匹林或氟伐他汀预先孵育后 Ang Ⅱ 诱导的 COX-2 mRNA 的表达明显下降 ($P < 0.05$), 且随浓度加大 COX-2 mRNA 的表达水平逐渐降低, 不同浓度组间差异具有显著性 ($P < 0.05$; 表 2 和 3 及图 2)。

表 2. 不同浓度阿司匹林和氟伐他汀干预下血管紧张素 Ang II 诱导环氧合酶 2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	COX-2 mRNA
非药物处理组	1.03 \pm 0.04
阿司匹林	
0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.91 \pm 0.07 ^{ab}
1.0 $\mu\text{mol/L}$	0.76 \pm 0.03 ^{ab}
2.0 $\mu\text{mol/L}$	0.49 \pm 0.02 ^{ab}
5.0 $\mu\text{mol/L}$	0.35 \pm 0.02 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与非药物处理组比较; b 为 $P < 0.05$, 不同药物浓度组间比较。

表 3. 不同浓度氟伐他汀干预下血管紧张素 Ang II 诱导环氧合酶 2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	COX-2 mRNA
非药物处理组	1.03 \pm 0.04
氟伐他汀	
0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.81 \pm 0.01 ^{ab}
1.0 $\mu\text{mol/L}$	0.53 \pm 0.01 ^{ab}
10.0 $\mu\text{mol/L}$	0.39 \pm 0.01 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与非药物处理组比较; b 为 $P < 0.05$, 不同药物浓度组间比较。

2.3 阿司匹林和氟伐他汀联合作用对血管紧张素 Ang II 诱导的人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 表达的影响

与单独应用阿司匹林或氟伐他汀相比, 阿司匹林和氟伐他汀联合用药组 COX-2 mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$; 表 4 和图 2)。

表 4. 阿司匹林和氟伐他汀联合作用对血管紧张素 Ang II 诱导的环氧合酶 2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	COX-2 mRNA
阿司匹林	0.49 \pm 0.02
氟伐他汀	0.53 \pm 0.01
阿司匹林+ 氟伐他汀	0.23 \pm 0.30 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与阿司匹林组或氟伐他汀组比较。

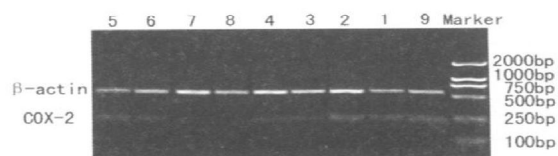


图 2. 阿司匹林和氟伐他汀对血管紧张素 Ang II 诱导环氧合酶 2 mRNA 表达的影响 1-4 分别为 0.5、1.0、2.0 和 5.0 mmol/L 阿司匹林作用组, 5-7 分别为 0.1、1.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 氟伐他汀作用组, 8 为阿司匹林和氟伐他汀联合作用组, 9 为非药物处理组。

2.4 阿司匹林和氟伐他汀对血管紧张素 Ang II 诱导的人血管平滑肌细胞环氧合酶 2 蛋白表达的影响

无 Ang II 作用时细胞基本无黄染; Ang II 作用下细胞胞质明显黄染, COX-2 蛋白表达增加。阿司匹林和/或氟伐他汀预先处理后, 细胞胞质黄染程度明显减低, 以联合用药组染色最浅, 联合用药对 Ang II 诱导 COX-2 蛋白表达的抑制作用最强(图 3)。

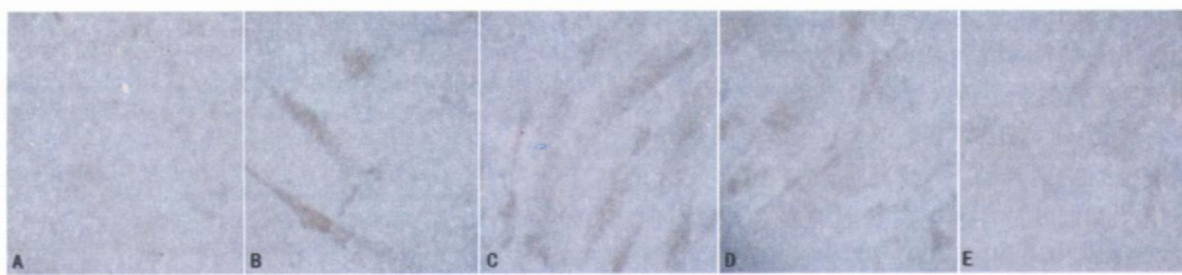


图 3. 阿司匹林和氟伐他汀对血管平滑肌细胞环氧合酶 2 蛋白表达的影响 ($\times 160$) A 为空白对照组, B 为血管紧张素 Ang II 作用组, C 为阿司匹林预处理组, D 为氟伐他汀预处理组, E 为阿司匹林和氟伐他汀联合用药组。

3 讨论

涉及 As 形成过程的促炎症反应介质(包括肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、干扰素 α 、氧化型低密度脂蛋白等)均可诱导 COX-2 表达^[6]; As 组织中的内皮细胞、SMC 以及炎性细胞受到炎性细胞因子刺激时均能诱导表达 COX-2^[2,7], 而给予 COX-2 抑制剂后

可使动物新生内膜增厚程度减轻^[2,4], 提示 COX-2 在 As 的形成和发展中发挥重要作用。

研究表明 Ang II 可诱导鼠血管 SMC 中 COX-2 和 PG 生成从而调节细胞增殖^[4]。本实验观察到, 在 Ang II 刺激下人血管 SMC 中 COX-2 mRNA 的表达水平明显增高, 这一作用在 Ang II 剂量很小 (0.001 $\mu\text{mol/L}$) 时即已表现出来, 且随 Ang II 刺激浓度的

加大而逐渐增强, 1.0 μmol/L 时达到最强, 存在浓度依赖关系; 同时细胞爬片免疫组织化学染色显示 COX-2 蛋白表达增高。COX-2 及其产生的 PG 在 As 进程中起着促进炎症反应和增殖的作用^[1,4]。COX-2 和 PGE2 能促进基质金属蛋白酶活化和释放, 对巨噬细胞迁移具有重要作用, 并通过抑制斑块内胶原合成促使胶原降解导致斑块不稳定, 增加临床冠状动脉缺血事件的发生^[8]。COX-2 在血清细胞因子、致丝裂原和其他致细胞增殖因素的作用下明显增加并大量调节释放 PG, 从而促进细胞有丝分裂、SMC 迁移和增殖、细胞外基质合成, 在 As 的慢性增殖性病变中发挥重要作用^[9]。因此, COX-2 及其 PG 产物通过多种机制促进 As, 是 As 病理进程中一个重要的中间或中介环节^[2]。而 Ang Ⅱ 的促 As 作用可能部分是由 COX-2 介导的。

阿司匹林和他汀类药物目前是冠心病抗 As 治疗的一线用药, 在临床上得到广泛应用。阿司匹林主要通过抑制 COX 发挥作用, 小剂量阿司匹林主要抑制 COX-1, 对 COX-2 只有极低水平的抑制^[10]。而他汀类药物除有降血脂作用外, 还表现出多方面的非降脂作用^[11]。有关他汀类药物对 COX-2 的作用, 目前研究尚少且意见分歧: 多数研究显示他汀类药物可抑制 COX-2 的表达; 但也有学者证实在培养的人血管 SMC 中, Mevastatin 和 Lovastatin 上调 COX-2 的表达, 由此促进 PG 的合成。这些结果的分歧提示不同的他汀类药物可能通过不同的信号转导途径影响 COX-2 的表达, 从而产生不同的结果^[5]。

本实验结果发现不同浓度阿司匹林和氟伐他汀组 COX-2 mRNA 表达均明显减低, 且随着阿司匹林和氟伐他汀浓度增大 COX-2 表达水平逐渐减低, 存在浓度依赖关系。COX-2 蛋白表达同时减低。已有学者证实, 阿司匹林可通过抑制 IκB 激酶活性阻止胞质中 IκBα 的降解^[15], 或通过限制核因子 κB 的核定位^[16] 抑制其活性和炎症基因的表达; 而他汀类对 COX-2 的抑制作用也可能与抑制核因子 κB 的活性有关^[14,17]。二者均可通过抗炎、免疫抑制、抗血小板、减少血栓素的形成发挥抗血栓、抗 As 作用, 在 As 治疗中的某些方面有着相似的作用方式和途径。越来越多的研究将阿司匹林和他汀类联系起来, 有报道他汀类与阿司匹林合用能明显降低 C 反应蛋白^[18] 和纤维蛋白原水平; 对临界性高胆固醇血症患

者采用低剂量阿司匹林联合辛伐他汀治疗可以减少凝血酶的生成^[19]。本实验将阿司匹林和氟伐他汀联合应用后表现出优于单独应用抑制 COX-2 表达的作用, 二者具有协同效应。而二者联合应用后所表现出的“额外”效应的机制和临床意义尚待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Paramo JA, Rodriguez JA, Belouci O, Orbe J. Monocyte cyclooxygenase-2 activity: a new therapeutic target for atherosclerosis [J]. *Curr Drug Targ Cardiovasc Haematol Disord*, 2005, 5 (4): 303-311.
- [2] Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE deficient and C57BL/6 mice [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2005, 39 (3): 443-452.
- [3] 李洪涛, 陈倩, 吴宗贵, 梁春, 潘晓明, 樊民, 等. 诱导型环氧合酶在人冠状动脉粥样硬化组织中的表达分布[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (5): 533-536.
- [4] Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 2000, 35 (1 Pt1): 68-75.
- [5] Francesco Cipollone, Bianca Rocca, Carlo Patrono. Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (2): 246-255.
- [6] Cipollone F, Fazio M, Mezzetti A. Novel determinants of plaque instability [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3 (9): 1962-975.
- [7] Cipollone F, Fazio M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De Cesare D, et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/PGE synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans [J]. *Circulation*, 2003, 107 (11): 1479-485.
- [8] Mezzetti A. Pharmacological modulation of plaque instability [J]. *Lupus*, 2005, 14 (9): 769-772.
- [9] 翁少翔, 单江, 徐耕, 马骥. 小白菊内酯抑制胎牛血清诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及信号转导机理[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2002, 16 (5): 331-335.
- [10] 施桂英. 从环氧合酶的研究进展评价当今的非甾体抗炎药[J]. *中华内科杂志*, 2002, 41 (12): 857-859.
- [11] Veillard NR, Mach F. Statins: the new aspirin [J]? *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59 (11): 1771-786.
- [12] Mirr Jean Yin, Yumi Yamamoto, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(κappa)B kinase-beta [J]. *Nature*, 1998, 396 (6706): 77-80.
- [13] Lesley A, Stark, Malcolm G, Dunlop. Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-κappa B-driven transcription and apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (14): 5985-6004.
- [14] Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega I, Perez F, et al. HMG-CoA reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32 (7): 2057-064.
- [15] Hennekens CH, Sacks FM, Tonkin A, Jukema JW, Byington RP, Pitt B, et al. Additive benefits of pravastatin and aspirin to decrease risks of cardiovascular disease: Randomized and observational comparisons of secondary prevention trials and their meta-analyses [J]. *Arch Intern Med*, 2004, 164 (1): 40-44.
- [16] Musial J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85 (2): 221-225.

(此文编辑 文玉珊)