

## 厄贝沙坦抑制高胆固醇诱导载脂蛋白 E 基因 敲除小鼠动脉粥样硬化的炎症机制

姚瑞, 程翔, 廖玉华, 陈勇, 谢江娇, 余娴, 丁英俊, 唐婷婷

(华中科技大学同济医学院附属协和医院内科 同济医学院心血管研究所 心血管免疫实验室, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 厄贝沙坦; 炎症因子; 基因敲除

[摘要] 目的 探讨厄贝沙坦对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的影响及炎症机制。方法 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为普食组、高胆固醇饮食组、高胆固醇饮食+厄贝沙坦组, 每组 15 只, 分别予蒸馏水、蒸馏水、厄贝沙坦 10 mg/(kg·d) 灌胃 12 周。无创血压系统测小鼠血压; 内眦动脉取血检测血清总胆固醇和甘油三酯水平; 冰冻切片光镜下定位主动脉根部, 油红 O 染色评估斑块大小; 实时定量聚合酶链反应和 Western blotting 方法检测主动脉肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6、单核细胞趋化蛋白 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达。结果 高胆固醇饮食组小鼠血脂水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 且斑块面积明显高于普食组 ( $P < 0.01$ ); 厄贝沙坦明显减小斑块面积 ( $P < 0.01$ ), 同时降低肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 6、单核细胞趋化蛋白 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达 ( $P < 0.01$ )。结论 血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体拮抗剂厄贝沙坦可以通过降低炎症因子的表达, 从而达到抑制动脉粥样硬化发生发展的目的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Mechanism of Irbesartan Suppressing Inflammation in High Cholesterol-Diet Induced Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice

YAO Rui, CHENG Xiang, LIAO Yu-Hua, CHEN Yong, XIE Jiang-Jiao, YU Xian, DING Ying-Jun, and TANG Ting-Ting

(Laboratory of Cardiovascular Immunology, Institute of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Irbesartan; Inflammation Cytokines; Gene Knockout

[ABSTRACT] Aim To investigate the potential effects and molecular mechanisms of an angiotensin  $\text{AT}_1$  receptor blockers irbesartan on the process of atherosclerosis in high cholesterol-diet apolipoprotein E knockout (ApoE KO) mice.

Methods Adult male ApoE KO mice were given normal diet or high cholesterol-diet and randomized to no treatment or irbesartan 10 mg/(kg·d) for 12 weeks. Systolic blood pressure was measured by a kind of non-invasive tail cuff system in conscious mice.

The plasma total cholesterol and triglyceride concentration were measured by autoanalyzer. Atherosclerotic lesion area in aortic root was evaluated by oil red O staining. Inflammatory cytokines were measured by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting.

Results The ApoE KO mice with high cholesterol-diet was associated with a marked increase in plasma lipid levels, atherosclerotic lesion area, as well as the expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). These changes were suppressed in mice that were treated with irbesartan 10 mg/(kg·d) for 12 weeks concomitant with high cholesterol-diet administration, with no significant change in systolic blood pressure and plasma lipid levels.

Conclusion The results suggest that irbesartan can attenuate atherosclerosis, and this effect is partly related to the inhibition of inflammatory response which leads to the decrease in the expression of inflammatory cytokines.

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 血管紧张素  $\text{AT}_1$  (angiotensin  $\text{AT}_1$  Ang  $\text{AT}_1$ ) 是肾素-血管紧张素系统 (rennin-angiotensin system, RAS) 的中间产物, 通过影响血管内皮细胞、单核/巨噬细胞和平滑肌细

胞, 促进血管新生, 影响脂质代谢等多方面参与动脉粥样硬化病理生理过程, 从某种意义上讲 Ang  $\text{AT}_1$  是一种炎症介质<sup>[1,2]</sup>。Ang  $\text{AT}_1$  型受体 (angiotensin  $\text{AT}_1$  type 1 receptor, AT1) 介导了 Ang  $\text{AT}_1$  几乎全部的生理和病理功能。AT1 阻断剂 (angiotensin receptor blocker, ARB) 通过阻断 Ang  $\text{AT}_1$  与 AT1 受体的结合所产生的一系列生物学效应, 可以抑制动脉粥样硬化斑块的形成, 这在部分临床和基础研究中已得到证实, 厄贝沙坦是 ARB 的一种, 其对动脉粥样硬化的具体作用和分子生物学机制尚未十分明了<sup>[3-5]</sup>。本研究采用

[收稿日期] 2008-05-04

[修回日期] 2008-07-25

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 973 项目 (2007CB512000, 2007CB512005); 国家自然科学基金 (30600234)

[作者简介] 姚瑞, 博士研究生, 主要从事心血管免疫学研究, E-mail 为 yryaorui@yahoo.com.cn。程翔, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管免疫学研究。通讯作者廖玉华, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管免疫学研究, E-mail 为 liaoyh27@163.com。

载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E knockout, ApoE KO) 小鼠建立动脉粥样硬化模型, 探讨厄贝沙坦对动脉粥样硬化发生发展的作用及其分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除雄性小鼠 45 只, 体重 18.5 g 左右, 由北京大学动物中心从美国 Jackson 实验室引进繁殖。

### 1.2 动脉粥样硬化模型的建立及动物处理

6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分成三组: 普通饮食组、高胆固醇饮食组、高胆固醇饮食 + 10 mg/(kg·d) 厄贝沙坦 (Sanofi-Aventis 提供) 组, 每组 15 只, 其中高脂饮食的配方为 1.25% 胆固醇 + 21% 猪油 + 普通饲料。所有动物引进后于 SPF 级动物房适应一周后开始实验, 即从 7 周龄开始, 分别给予普食或高胆固醇饮食, 且普通饮食组、高胆固醇饮食组和高胆固醇饮食 + 厄贝沙坦组分别给予蒸馏水、蒸馏水、蒸馏水配制的 1.2% 羧甲基纤维素溶液溶解的厄贝沙坦混悬液灌胃, 用前 30 s 摇匀, 每日一次。厄贝沙坦的剂量为 10 mg/(kg·d), 每周称重一次以调整用药剂量。以上实验进行 12 周后, ML125 鼠尾部无创血压系统测小鼠血压, 内眦取血检测血清总胆固醇和甘油三酯, 2% 戊巴比妥麻醉后取心脏及血管, 所有研究方法均经实验动物伦理委员会批准。

### 1.3 粥样斑块面积的评估

平左右心房水平切下主动脉根部, 固定于 4% 中性多聚甲醛中 24 h, 用 OCT 组织包埋置冰冻切片机上固定, 自心底部向主动脉方向做 10  $\mu$ m 的横断面切片, 未染色状态下于显微镜下观察, 当三个主动脉瓣均出现且管腔基本变圆时将该切片贴于多聚赖氨酸处理过的洁净玻片上, 然后隔 70  $\mu$ m 再贴一片, 如此重复 4 次, 共留取 5 个切片, 涵盖 320  $\mu$ m 的范围, 最后一个切片的镜下所见应为: 主动脉瓣近于消失, 管腔完全变圆<sup>[6]</sup>。切片用油红 O 染色, 病理组织实时摄像显微镜系统下采图, 运用 HMIAS 2000W 分析各个组织切片的斑块面积, 以各小鼠 5 个切片的斑块面积均值为该小鼠主动脉根部粥样斑块面积大小。

### 1.4 实时定量聚合酶链反应检测

分别取主动脉弓部血管, 应用 Trizol 500  $\mu$ L 匀浆、抽提组织总 RNA。RT-PCR 法逆转录至 cDNA, 所有引物均参照 Genbank 提供的序列, 用 Primer5.0 合成, 由上海生物工程公司合成。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tur-

mor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 引物为 5'-TAC TGA ACT TCG GGG TGA TCG GTC-3' (forward) 和 5'-CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3' (reverse), 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 引物为 5'-AGA GCA ATA CTG AAA CCC TA-3' (forward) 和 5'-CAA CAT AAT TTA GAT ACC CAT G-3' (reverse), 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 引物为 5'-CTC ACC TGC TGC TAC TCA TTC AC-3' (forward) 和 5'-GAT TTA CGG GTC AAC TTC ACA TTC-3' (reverse), 血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 引物为 5'-TGA ACC CAA ACA GAG GCA GAG-3' (forward) 和 5'-GGT ATCC CAT CAC TTG AGC AG-3' (reverse),  $\beta$ -actin 引物为 5'-TGC TGT CCC TGT ATG CCT CTG-3' (forward) 和 5'-TTG ATG TCA CGC ACG ATT TCC G-3' (reverse)。应用 SYBR Green iv 荧光染料技术行实时定量 PCR 反应, 获取各组标本的标准曲线, 计算机分析 Ct 值。

### 1.5 Western blotting 检测

每组取 7 根血管组织匀浆后提取总蛋白, 以牛血清白蛋白作标准曲线, BCA 法测定蛋白浓度。常规电泳, 转膜, 封闭后分别加入 TNF- $\alpha$ 、IL-6 (Santa Cruz 公司)、MCP-1 (Abcam 公司) 和 VCAM-1 (Rand D 公司) 抗体及内参  $\beta$ -actin (Abcam 公司) 一抗抗体, 4  $^{\circ}$ C 轻摇过夜, 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记二抗, 化学发光试剂增强反应, X 线压片曝光, 用 GSD8000 密度扫描分析系统 (英国 UVP 公司) 进行图像分析, 分别以 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 与  $\beta$ -actin 条带的吸光面积积分比值来评定 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 蛋白的表达水平。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据直接显著性用多个样本的均数比较及两两比较用 ANOVA 方差分析检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 血脂和血压水平

19 周时, 高胆固醇饮食组和高胆固醇饮食 + 厄贝沙坦组血脂水平明显升高, 与普通饮食组相比差异显著 ( $P < 0.01$ ), 而高胆固醇饮食组与高胆固醇饮食 + 厄贝沙坦组之间总胆固醇和甘油三酯水平差异无显著性。厄贝沙坦干预后, 血压水平虽略有下降, 但与非干预组相比差异无统计学意义 (表 1)。

表 1. 19 周时各组小鼠血脂和血压水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

| 分 组           | 总胆固醇<br>(mmol/L)              | 甘油三酯<br>(mmol/L)             | 收缩压<br>(mmHg)  |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 普通饮食组         | 14.28 $\pm$ 1.42              | 1.07 $\pm$ 0.14              | 96.8 $\pm$ 1.6 |
| 高胆固醇饮食组       | 42.74 $\pm$ 5.91 <sup>a</sup> | 2.08 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup> | 98.4 $\pm$ 2.2 |
| 高胆固醇饮食+ 厄贝沙坦组 | 39.82 $\pm$ 4.23 <sup>a</sup> | 1.92 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup> | 95.9 $\pm$ 2.3 |

a 为  $P < 0.01$ , 与普通饮食组相比。

## 2.2 主动脉根部斑块面积变化

普通饮食组、高胆固醇饮食组、高胆固醇饮食+厄贝沙坦组均有明显动脉粥样硬化斑块形成,以高胆固醇饮食组最为明显。经厄贝沙坦灌胃治疗 12 周后,斑块面积明显减小( $P < 0.01$ ; 图 1 和表 2)。

表 2. 各组小鼠主动脉根部动脉粥样硬化斑块相关参数分析 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 分 组           | 斑块面积(mm <sup>2</sup> )          | 斑块面积/腔面积                         |
|---------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 普通饮食组         | 0.037 $\pm$ 0.01                | 7.71% $\pm$ 1.27%                |
| 高胆固醇饮食组       | 0.238 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>  | 39.92% $\pm$ 4.20% <sup>a</sup>  |
| 高胆固醇饮食+ 厄贝沙坦组 | 0.123 $\pm$ 0.022 <sup>ab</sup> | 25.28% $\pm$ 5.05% <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.01$ , 与普通饮食组相比; b 为  $P < 0.05$ , 与高胆固醇饮食组相比。

## 2.3 厄贝沙坦对炎症因子表达的影响

表 3. 炎症因子 mRNA 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 分 组           | TNF- $\alpha$                     | IL-6                              | MCP-1                             | VCAM-1                            |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 普通饮食组         | 0.0276 $\pm$ 0.0059               | 0.0012 $\pm$ 0.0003               | 0.0312 $\pm$ 0.0081               | 0.0627 $\pm$ 0.0116               |
| 高胆固醇饮食组       | 0.2652 $\pm$ 0.0413 <sup>a</sup>  | 0.0043 $\pm$ 0.0006 <sup>a</sup>  | 0.1781 $\pm$ 0.0352 <sup>a</sup>  | 0.3413 $\pm$ 0.064 <sup>a</sup>   |
| 高胆固醇饮食+ 厄贝沙坦组 | 0.1102 $\pm$ 0.0186 <sup>ab</sup> | 0.0022 $\pm$ 0.0005 <sup>ab</sup> | 0.0783 $\pm$ 0.0132 <sup>ab</sup> | 0.1432 $\pm$ 0.0265 <sup>ab</sup> |

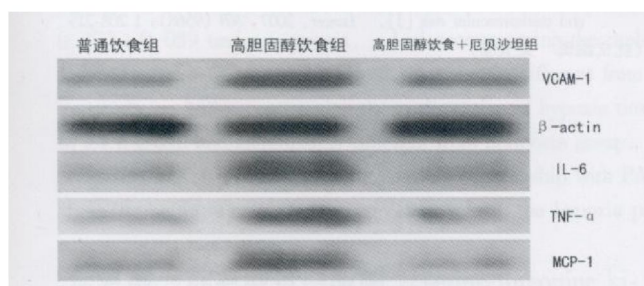
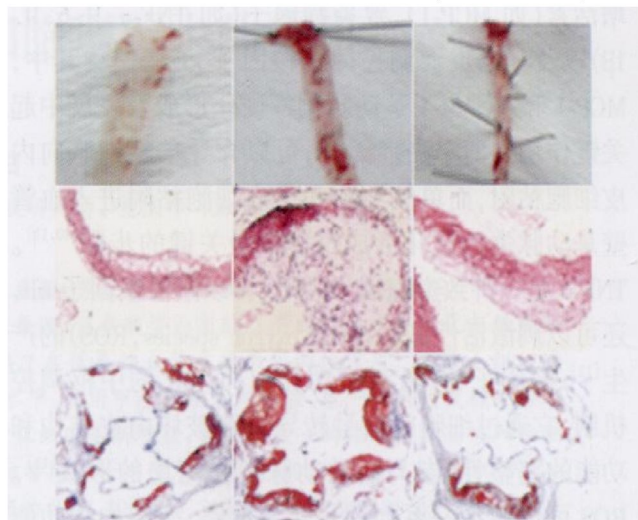
a 为  $P < 0.01$ , 与普通饮食组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与高胆固醇饮食组相比。

图 2. 厄贝沙坦对高胆固醇饮食载脂蛋白 E 基因敲除小鼠炎症因子的影响 1 为普通饮食组, 2 为高胆固醇饮食组, 3 为高胆固醇饮食+ 厄贝沙坦组。

## 3 讨论

动脉粥样硬化斑块发生发展是一个复杂的过程,是内皮细胞、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞和血小板结构和功能变化的结果。流行病学和临床研究表明高胆固醇血症、高血压、糖尿病、高同型半胱氨酸血症等是动脉粥样硬化发生发展的主要危险因素。目前,已

高胆固醇饮食后,炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 的表达明显增加,经厄贝沙坦治疗后,表达明显下降,但仍较普通饮食组高(表 3 和图 2)。

图 1. 主动脉根部斑块面积变化 上为血管油红 O 染色大体观,中为血管组织切片 HE 染色( $\times 100$ ),下为血管冰冻切片油红 O 染色( $\times 40$ )。从左往右为普通饮食组、高胆固醇饮食组和高胆固醇饮食+ 厄贝沙坦组。

经有大量药理学研究从减少危险因素,抑制动脉粥样硬化的发生发展等多方面来干预动脉粥样硬化斑块的形成,其治疗的靶点包括脂质修饰、RAS、一氧化氮(nitric oxide, NO)利用率、Ca<sup>2+</sup>内流、氧化应激、血管炎症、血小板聚集、SMC 增殖等<sup>[7]</sup>。研究表明,高胆固醇不但可以引起 AT1 水平明显升高,而且可以增加 SMC 对 Ang II 刺激的反应性,这就提示 ARB 药物可能有抗动脉粥样硬化作用<sup>[8]</sup>。目前,已经有研究证实 ARB 类药物可以减少氧化应激,改善内皮功能,降低 SMC 增殖,激活凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)等,有关厄贝沙坦对动脉粥样硬化的作用及机制尚未十分明了。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血浆总胆固醇水平明显升高,从而导致动脉粥样硬化斑块形成,是研究动脉粥样硬化最好的动物模型。本研究证实,厄贝沙坦 10 mg/(kg·d)对血压和血脂没有明显影响,但可以明显减少载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块面积。



动脉粥样硬化伴随着进行性的炎症反应,内膜下的脂质经过氧化修饰后可以产生各种粘附分子(如 VCAM-1、细胞间粘附分子 1 和 E 选择素)、化学趋活素(如 MCP-1)、致炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ )以及其它炎症调控因子核因子  $\kappa$ B 等<sup>[9]</sup>。其中, MCP-1 和 VCAM-1 是动脉粥样硬化形成及发展中起关键作用的两个炎症因子,可以介导单核细胞向内皮细胞粘附,而单核细胞和内皮细胞粘附进入血管壁是动脉粥样硬化形成过程中最关键的步骤<sup>[10, 11]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种致炎症因子,不仅可以激活核因子  $\kappa$ B,还可以刺激活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生<sup>[12]</sup>;核因子  $\kappa$ B 激活是动脉粥样硬化的中枢调控机制,它通过细胞间信号转导通路破坏内皮结构和功能的完整性,参与启动动脉粥样斑块的形成<sup>[13]</sup>。ROS 可以激活一系列信号转导通路,引起内皮功能失调,血管张力的变化、血管重塑和血管炎症反应<sup>[14]</sup>。IL-6 也是一种重要的致炎症因子,在激活 Jak2/Stat3 信号转导通路的同时,还可以上调 AT1 的表达,加重氧化应激反应和内皮功能失调<sup>[15]</sup>。由此可见, TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 在动脉粥样硬化发生发展中扮演重要的角色,减少这些炎症因子的表达,可以抑制动脉粥样硬化的发生和发展。本研究结果发现,厄贝沙坦治疗后 MCP-1、VCAM-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达较高胆固醇饮食组明显降低。

综上所述,厄贝沙坦在不明显影响血压和血脂的情况下可以减少载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块面积,其作用机制可能是通过抑制 Ang Ⅱ与 AT1 结合,阻断炎症信号转导通路,减少炎症因子的表达,从而抑制了动脉粥样硬化的进展。

#### [参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, **420** (6917): 868-874.
- [2] Grote K, Drexler H, Schieffer B. Renin-angiotensin system and atherosclerosis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, **19** (4): 770-773.
- [3] Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: AT(1) receptor regulation [J]. *Circulation*, 2002, **105** (4): 530-536.
- [4] 程芳洲, 鲍翠玉, 彭 绩, 等. 替米沙坦对大鼠血管损伤性重塑过程中粘着斑激酶表达和活化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 500-502.
- [5] Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: oxidative stress and atherogenesis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (3): 393-396.
- [6] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice [J]. *Atherosclerosis*, 1987, **68** (3): 231-240.
- [7] Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, et al. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, **9** (4): 818-839.
- [8] Daugherty A, Rateri DL, Lu H, et al. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor [J]. *Circulation*, 2004, **110** (25): 3 849-857.
- [9] Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **6** (2): 15-20.
- [10] Inoue S, Egashira K, Ni W, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Circulation*, 2002, **106** (21): 2 700-706.
- [11] Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species [J]. *Mol Immunol*, 2002, **39** (9): 499-508.
- [12] Branan L, Hovgaard L, Nitulescu M, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (11): 2 137-142.
- [13] de Winther MP, Kanters E, Kraal G, et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (5): 904-914.
- [14] Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (1): 29-38.
- [15] Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, et al. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk [J]. *Lancet*, 2007, **369** (9568): 1 208-219.

(此文编辑 文玉珊)