

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-08-0600-03

阿托伐他汀抑制腹主动脉瘤基质金属酶 9 及核因子 KB 表达的实验研究

许文平¹, 邱 健², 李志梁³, 谢志泉², 何柏身¹, 梁爱琼²

(1. 中国人民解放军驻香港部队医院, 广东省广州市 518048; 广州军区广州总医院心内科, 广东省广州市 510010;

3. 南方医科大学附属珠江医院心内科, 广东省广州市 510040)

[关键词] 病理学与病理生理学; 腹主动脉; 阿托伐他汀; 大鼠; 基质金属酶 9; 核因子 KB

[摘要] 目的 研究阿托伐他汀对腹主动脉瘤基质金属酶 9 及核因子 KB 影响, 探讨其临床应用价值。方法 成年雄性 WISTER 大鼠 24 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 12 只; 分别皮下注射阿托伐他汀 4 mg/(kg·d) 和等容积的生理盐水。用弹力酶灌注法建立大鼠腹主动脉瘤模型。观察两组动脉瘤形成率和动脉壁病理学改变。HE 染色、弹力纤维 EVG 染色观察腹主动脉瘤组织学变化, 逆转录聚合酶链反应检测动脉基质金属酶 9 及核因子 KB mRNA 的表达水平, 免疫组织化学分析基质金属酶 9 及核因子 KB 的蛋白表达水平。结果 弹力酶灌注 2 周后实验组大鼠腹主动脉瘤形成率为 20%, 对照组动脉瘤形成率为 90%, 实验组动脉组织弹力纤维未见明显断裂消失等受损表现, 仅有少量炎症细胞浸润及基质金属酶 9 及核因子 KB 的表达。对照组动脉壁组织弹力纤维严重受损, 可见明显炎症细胞浸润, 基质金属酶 9 及核因子 KB 的表达显著增高。结论 阿托伐他汀能够降低动脉壁组织基质金属酶 9 及核因子 KB 的表达及炎症细胞的浸润, 减少弹力纤维的降解, 从而抑制实验性大鼠腹主动脉瘤的形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Treatment with Atorvastatin Suppresses the Development of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms

XU Wen Ping, QIU Jian, LI Zhi-Liang, XIE Zhi-Quan, HE Bai-Sheng, and LIANG Ai-Qiong

(Department of Cardiology, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aortic; Atorvastatin; Rats; Matrix Metalloproteinase-9; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] Aim To determine if treatment with hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) can influence the development of experimental abdominal aortic aneurysms (AAAs). Methods Twenty-four Wistar Rats were randomly divided into 2 equal groups ($n=12$). An animal model of AAAs was established by perfusion of the aorta with elastase, treated for 14 days with Atorvastatin 4 mg/(kg·d) or with NS alone. The expression of MMP-9 and NF- κ B were observed in aortic tissue by immunohistochemistry staining or by RT-PCR. Result The incidence of AAAs was reduced by 70% (2 of 10 rats treated with atorvastatin [20%] vs. 9 of 10 rats treated with vehicle [90%]; $P<0.05$). The development of AAAs in vehicle-treated rats were accompanied by a dense transmural inflammatory response, and complete destruction of the elastic media.

MMP-9 and NF- κ B expression increase significantly in vehicle-treated rats. Inflammatory infiltration was less found in Atorvastatin-treated rat, and little MMP-9 and NF- κ B expression in atorvastatin-treated rats. Conclusion Treatment with Atorvastatin reduced the development of elastase-induced experimental AAAs. The underlying mechanism was associated with structural preservation of aortic wall elastin and the presence of a chronic inflammatory response, there was a relative reduction in aortic wall expression of MMP-9 and NF- κ B, the effect is independent on serum cholesterol levels.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)发生的独立的危险因素, 炎症细胞的浸润、细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)过度表达是腹主动脉瘤病因学研究最深入也是最为广泛接受的观点^[1]。

近年来随着对腹主动脉瘤发病机制研究的深入, 寻求药物治疗途径抑制炎症及MMP的分泌, 阻止AAA的生长发展已成为人们关注的热点之一。基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、核因子KB(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在炎症细胞的浸润及细胞外基质金属酶的表达中起着重要的调控作用^[2]。他汀类药物是治疗和预防As最有效的药物之一, 除能调节血脂外, 还具有重要的抗炎作用^[3]。本研究通过用阿托伐他汀对实验性腹主动脉瘤进行干预, 观察其对腹主动脉瘤核因子KB及MMP-9表达的影响。

[收稿日期] 2008-05-12 [修回日期] 2008-08-12

[基金项目] 广东省自然科学基金资助(基金编号 A2005505)

[作者简介] 许文平, 博士研究生, 主治医师, 主要从事大血管疾病研究, 联系电话为 020-61653499, E-mail 为 xwpeat@126.com。通讯作者邱建, 硕士, 主任医师, 教授, 主要从事心血管内科研究, 联系电话为 020-36653566。李志梁, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事冠心病研究, 联系电话为 020-61642359。

响,探讨其可能的作用机制及临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,10 周龄,体重 180~200 g,由南方医科大学实验动物中心提供(质量合格证号:0005998)。猪胰弹力蛋白酶:SIGMA 公司 E1250,LOT0847700。弹力纤维 EVG 染色套装:BASO 公司(套装内容包括:0.25%高锰酸钾、0.5%草酸、Elastin Stain、Van Gieson Stain)。免疫组织化学检测试剂盒:武汉博士德公司。RNA 提取试剂 Trizol:invitrogen 公司。AMV 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶、dNTP、随机引物 Oligo(dT):TakarRa 公司。阿托伐他汀:辉瑞制药公司赠与(LOT55837004)。

1.2 动物分组及模型建立

雄性 Wistar 大鼠 24 只,10 周龄,体重 180~200 g,随机分成 2 组:实验组 12 只,手术前 7 d 开始阿托伐他汀溶液皮下注射至弹力蛋白酶灌注术后 14 d [1 次/日,4 mg/(kg·d)]。对照组 12 只,手术前 1 周开始 0.9%生理盐水肌注至弹力蛋白酶灌注术后 14 d [1 次/日,4 mL/(kg·d)]。每日光照 12 h,自主饮食进水。

动物模型的建立参照文献[4]方法并略加改进。以 3%的戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔注射麻醉,游离出肾动脉下腹主动脉及左髂总动脉,阻断血流后,由左髂总动脉插入导管至腹主动脉分叉上方,于分叉处结扎腹主动脉(连套管),以微量注射泵加压灌注 iv 型猪胰弹力蛋白酶 2 mL,灌注速度 4 mL/h。30 min 后抽吸余液,拔出导管,结扎左髂总动脉。灌注前后分别用游标卡尺测量腹主动脉直径,计算灌注 2 周后动脉扩张率及腹主动脉瘤的形成率。

1.2 取材及制片

术后 2 周麻醉各组大鼠,剖腹后游离腹主动脉,测直径,剪下动脉,一部分置于 4%中性甲醛液中固定,制成常规石蜡切片(厚 4~5 μm)供 HE 染色、弹力蛋白-胶原蛋白染色及免疫组化研究。另一部分置于液氮中冻存备用。

1.3 各组大鼠腹主动脉核因子 κB、基质金属蛋白酶 9 表达的检测

同一标本之相邻石蜡切片分别行 MMP-9 和核因子 κB 免疫组织化学染色(SABC 法)。一抗核因子 κBp65 或 MMP-9(工作浓度 1:100),按试剂盒说明染色。胞浆或胞膜呈棕黄色沉淀为阳性表达。400 倍光镜下计数阳性颗粒的相对面积(%),测出 MMP-9

和核因子 κB 的表达率。液氮冻存的腹主动脉总 RNA 的提取按 Trizol 试剂盒的说明提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA。核因子 κB 引物序列:上游:5'-CCA GGC GGA CAT CTA CAA-3',下游:5'-CAA GGC CAA ATG AAA GGA-3',扩增片段大小为 230 bp。MMP9 引物序列:上游:5'-TGG CTC TAG GCT ACA GCT TTG-3',下游:5'-CAA GGC CAA ATG AAA GGA-3',扩增片段大小为 486 bp。上述引物均由英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应条件:94℃变性 5 min → 94℃退火 30 s → 72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶图像分析系统进行扫描分析和光密度扫描,并计算 MMP-9 及核因子 κB 与内对照 β-actin 的 OD 比值,将表达量化。

1.4 统计学处理

用 SPSS 10.0 软件包对数据进行统计分析,各组数据描述均采用均数 ± 标准差,两组间数值的比较采用独立样本 *t* 检验,两组腹主动脉瘤形成率的比较用确切概率法。两组变量相关性分析运用 pearson 相关分析。

2 结果

2.1 灌注 2 周后大鼠腹主动脉形态结构学变化及腹主动脉瘤的形成率

对照组及实验组大鼠术中术后各死亡 2 只,存活 10 只。术前两组大鼠腹主动脉直径差异无显著性($P > 0.05$)。对照组大鼠在灌注后 2 周,腹主动脉可见明显扩张、硬化,弹力纤维不连续,较多的弹力纤维降解甚至消失,动脉壁出现大量的炎性细胞浸润。实验组动脉灌注 2 周后见部分腹主动脉扩张,仍有清晰的内外弹力层将内膜、中膜、外膜分开,内皮细胞、平滑肌细胞排列整齐,动脉壁内无明显炎性细胞浸润。对照组大鼠腹主动脉扩张率为 151% ± 25%,动脉瘤形成率为 90%;实验组动脉扩张率为 54% ± 29%,动脉瘤形成率为 20%。两组大鼠腹主动脉扩张率差异有显著性($P < 0.05$);两组大鼠腹主动脉瘤形成率之间差异有显著性($P < 0.05$,表 1)。

2.2 两组大鼠腹主动脉壁内基质金属蛋白酶 9、核因子 κB 的表达比较

对照组腹主动脉壁内 MMP-9、核因子 κB 的表达明显增强,主要位于外膜炎性细胞;实验组腹主动脉壁内 MMP-9、核因子 κB 表达较对照组明显减少。比较两组炎性细胞计数、MMP-9、核因子 κB 的

表达率的差异有显著性。运用 pearson 相关分析法分析 MMP-9 的变化与核因子 κB 的变化有正相关关系(相关系数 $r = 0.748$, $P = 0.005$, 表 2, 表 3)。

表 1. 胰弹力蛋白酶灌注前后两组大鼠腹主动脉直径($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	灌注前直径 (mm)	灌注后直径 (mm)	腹主动脉 扩张率	动脉瘤 形成率
实验组	1.10 $\pm$ 0.11	1.70 $\pm$ 0.34	54% $\pm$ 29% ^a	20% ^a
对照组	1.12 $\pm$ 0.10	2.80 $\pm$ 0.31	151% $\pm$ 25%	90%

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 2. 两组大鼠腹主动脉炎性细胞及 MMP-9 和核因子 κB 蛋白表达($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	炎性细胞数 (个)	MMP-9	NF- κB
对照	10	44.3 $\pm$ 4.9	24.8 $\pm$ 3.0	18.4 $\pm$ 5.0
实验	10	30.8 $\pm$ 6.5	18.6 $\pm$ 6.5 ^a	10.1 $\pm$ 2.4 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 3. 实验与对照组大鼠腹主动脉壁基质金属蛋白酶 9 和核因子 κB mRNA 表达的相对含量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9	NF- κB
对照	6	1.07 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.01
实验	6	0.70 $\pm$ 0.13 ^a	0.68 $\pm$ 0.12 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

腹主动脉瘤是环境、遗传、生物化学等多因素共同作用的结果。As 是其主要病因之一。各种病因导致血管壁受损, 免疫反应被激活, 引起局部炎症细胞浸润、血管平滑肌细胞凋亡、细胞外基质代谢失衡及病理性重构, 最终导致动脉中膜受损, 动脉壁失去弹性, 不能耐受血流冲击逐渐膨大形成动脉瘤。

核因子 κB 是促炎症基因表达的枢纽之一, 可参与机体的炎症反应、免疫反应、细胞分化与凋亡及其他应激反应。As 是一个免疫介导的慢性炎症。各种原因导致血管壁核因子 κB 的激活, 并诱导相关炎症因子的激活及分泌; 同时各种炎症细胞的浸润诱导基质金属蛋白酶的大量表达, 基质金属蛋白酶的大量分泌引起腹主动脉弹力纤维及胶原纤维的损伤, 最终导致腹主动脉瘤的形成和发展。在众多的基质金属蛋白酶中, 又以基质金属蛋白酶 9 的作用最为显著^[5]。

他汀类药物是治疗和预防 As 最有效的药物, 众多的研究表明他汀类药物除降脂作用之外, 尚有抗

炎、抗氧化、减少炎症递质水平等作用^[6]。使用他汀类药物可以改善动脉血管壁的炎症及细胞外基质的重构, 降低心血管事件的发生率^[7]。临床观察也证明长程使用他汀类药物可降低腹主动脉瘤术后患者的死亡率^[8]。这些研究提示他汀类药物对动脉瘤可能有益处, 但其疗效和可能机制尚须进一步明确。

本研究证实: 在实验性腹主动脉瘤中, 细胞外基质的结构弹力纤维大量破坏, 弹力纤维明显减少或消失, 同时有大量炎症细胞浸润, MMP-9 及核因子 κB 的表达明显增强, 且核因子 κB 表达的升高与 MMP-9 的表达增加呈正相关关系。此结果一方面提示在腹主动脉瘤形成的过程中有核因子 κB 的激活及 MMP-9 等基质金属酶的分泌的增加; 另一方面也提示活化的核因子 κB 可能通过启动 MMP-9 等基因的表达促进 MMP-9 分泌增加, 从而引起弹力纤维的降解及细胞外基质的重构。

应用阿托伐他汀对腹主动脉瘤大鼠进行干预后发现, 阿托伐他汀可以抑制腹主动脉瘤的形成。其作用机制可能与以下因素有关: 通过其调节血脂作用改善血管内皮功能; ④抑制腹主动脉局部核因子 κB 的激活及 MMP-9 表达, 从而抑制动脉壁局部炎症反应、改善细胞外基质的重构。这一结果对腹主动脉瘤的治疗可能有着潜在的意义: 一方面阿托伐他汀可阻止 As, 减缓腹主动脉瘤的发生; 另一方面对于小的腹主动脉瘤患者应用阿托伐他汀, 可能可以阻止病变的进一步发展, 从而减少动脉瘤破裂的危险和手术治疗带来的风险。

[参考文献]

- [1] W Richard, Marcus Anderton, Edward C, et al. Matrix metalloproteinase-8 and -9 are increased at the site of abdominal aortic aneurysm rupture [J]. *Circulation*, 2006, **113** (3): 438-445.
- [2] Miyake T, Aoki M, Masaki H, et al. Regression of abdominal aortic aneurysms by simultaneous inhibition of nuclear factor kappaB and ets in a rabbit model [J]. *Circ Res*, 2007, **101** (11): 1175-1184.
- [3] 许竹梅, 赵水平, 聂 赛, 等. 阿托伐他汀增加单核细胞过氧化物酶增殖体激活受体 γ 表达改善炎症反应[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **4** (32): 329-332.
- [4] Alan Daugherty, Lisa A. Cassis Mouse Models of Abdominal Aortic Aneurysms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 429-434.
- [5] 许文平, 邱 健, 丁 力, 等. 腹主动脉瘤的发病机制及内科治疗进展[J]. *实用医学杂志*, 2006, **22** (9): 1086-1088.
- [6] 刘 颖, 李建军, 李庚山, 等. 氯沙坦对球囊成形术后兔血管内膜增生及核因子 κB 活性的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 50-52.
- [7] 董少红, 温碧珉, 罗林杰, 等. 大剂量阿托伐他汀对急性冠状动脉综合征的调脂及抗炎作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (1): 21-23.
- [8] Kertai MD, Boersma E, Westerhout CM, et al. Association between long-term statin use and mortality after successful abdominal aortic aneurysms surgery [J]. *Am J Med*, 2004, **116** (2): 96-103.

(此文编辑 李玲玲)