

PAS 综合疗法对兔动脉粥样硬化病变的干预

王素香¹, 王拥军¹, 尹洪超², 梁宪红¹, 卫景沛³, 林金嬉¹, 梁德君¹

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院神经内科, 北京市 100050; 2. 中国医学科学院基础医学研究所病理学系, 北京市 100005; 3. 航空工业中心医院神经内科, 北京市 100012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 普罗布考; 氯吡格雷; 阿托伐他汀

[摘要] **目的** 探讨普罗布考抗氧化、氯吡格雷抗血小板制剂、阿托伐他汀联合用药对兔动脉粥样硬化病变的干预作用。**方法** 新西兰雄性大白兔 36 只随机分为 4 组, 分别给予正常饮食及高脂饮食 6 周后高脂组再分为 3 组: 高脂组, 高脂+阿托伐他汀 2.5 mg/(kg·d) 组, 高脂+普罗布考(1.0 g/d)+氯吡格雷 5 mg/(kg·d)+阿托伐他汀 2.5 mg/(kg·d) PAS 组, 继续喂养 4 周后观察主动脉粥样硬化斑块形成情况, 分别采用 HE 染色和免疫组织化学染色观察斑块部位内膜病变程度和炎症细胞的表达。**结果** 高脂组主动脉有粥样硬化病变形成, 病变内有大量巨噬细胞聚集。阿托伐他汀和 PAS 组动脉粥样硬化病变明显减轻, 斑块部位内膜面积和厚度下降, 巨噬细胞数量显著减少, 与高脂组比较差异具有显著性($P < 0.01$), 联合治疗组优于阿托伐他汀组($P < 0.05$)。**结论** 抗氧化、抗血小板、他汀联合用药对动脉粥样硬化斑块的形成和炎症具有明显的干预作用, 其作用优于单纯使用阿托伐他汀, 说明联合治疗对于稳定斑块、以及干预缺血事件的发生较单纯使用他汀类药物更具有临床应用的意义。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of PAS United Therapy on Atherogenesis of Rabbits Model

WANG Su-Xiang, WANG Yong-Jun, YIN Hong-Chao, LIANG Xian-Hong, WEI Jing-Pei, LING Jin-Xi, and LIANG De-Jun
(Department of Neurology, Capital Medical University Affiliated Tiantan Hospital, Beijing 100050, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Macrophage; Probucol; Clopidogrel; Atorvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of united therapy of probucol (P) and clopidogrel (Anti-thrombosis, A) and atorvastatin (statin, S) on rabbit atherogenesis. **Methods** 36 rabbits were randomized into four groups. The one group did not receive treatments and served as control group. Atherosclerosis was induced in the aorta arteries of rabbits by atherogenic diet in the next groups for 6 weeks. Then, animals were randomized to receive either no treatment or therapy. One group of treatment were received atorvastatin 2.5 mg/(kg·d), and the other accepted probucol(1.0 g/d) and clopidogrel 5 mg/(kg·d) and atorvastatin 2.5 mg/(kg·d) and killed after 4 weeks. **Results** Atorvastatin and united therapy induced a significant reduction in serum lipids and in lesion size, also were the area and thickness in neointima. Arterial macrophage infiltration was abolished by the treatment. Notedly, there was a more evident effect in united therapy than Atorvastatin in anti-atherosclerosis. **Conclusions** Atorvastatin and united therapy diminish the plaque lesion and neointimal inflammation in rabbit atherosclerosis model, and the effect of united therapy was more than atorvastatin. This could contribute to the more stabilization of the atherosclerotic plaque, and may be a more meaning additional prediction for the reduction of acute ischemic events in patients treated with united therapy.

脑血管病和冠心病是工业化国家人群的两大主要死亡原因, 而动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 仍然是心脑血管病的最主要原因。因此, 寻找各种治疗方法以期延缓、甚至阻止 As 病变的发展是国内外科学家关注和探索的关键领域。普罗布考抗氧化(probucol, P)、抗血小板制剂(anti-thrombosis, A)、他汀抗炎、降脂(statins, S)是天坛医院王拥军教授倡导

多年的联合干预 As 的理念。本研究采用普罗布考、氯吡格雷、阿托伐他汀作为 PAS 三联, 并与单药阿托伐他汀组作对照, 对兔动脉粥样病变进行干预, 旨在为这一理念奠定实验基础, 也为临床治疗 As 疾病建立常规干预的方法。

1 材料与方法

1.1 动脉粥样硬化模型建立和分组

健康新西兰雄性大白兔 36 只, 体重 2.0~2.5 kg, 3~4 月龄, 购自实验动物研究中心, 许可证号为 SYXK(京)2005-0042。分笼饲养, 饲喂正常的全价颗粒饲料, 自由饮水, 观察 1 周后随机分为 4 组。其中

[收稿日期] 2008-01-03 [修回日期] 2008-06-20

[作者简介] 王素香, 硕士, 主任医师, 研究方向为脑血管病, 联系电话为 13651132132, E-mail 为 suxiangw@sina.com。王拥军, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病。联系电话为 010-67016611, E-mail 为 yongjunwang111@yahoo.com.cn。尹洪超, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病及防治机理, 联系电话为 010-65284063, E-mail 为 yhc-0130@yahoo.com.cn。

对照组(9只)给予正常基础饲料共10周;其余为高脂喂养组(27只)给予1%胆固醇饲料100 g/(kg·d)。全价颗粒饲料及含1.0%胆固醇的高脂饮食饲料由实验动物中心提供。高脂饮食配方为1%胆固醇,2%猪油,10%蛋黄,喂养6周后再分为3组,每组9只。高脂组继续单纯高脂喂养;他汀组给予阿托伐他汀2.5 mg/(kg·d);PAS组给予普罗布考(1.0 g/d)、氯吡格雷5 mg/(kg·d)、阿托伐他汀2.5 mg/(kg·d)3种药物联合干预。前两组药物搅拌在高脂饲料中喂养。普罗布考(粉剂,齐鲁制药公司生产)、氯吡格雷(波力维75 mg/片,赛诺菲公司生产,生产批号J20040006)、阿托伐他汀(立普妥20 mg/片,辉瑞公司生产,生产批号J20030048)。

1.2 体重称量和血液生物化学检测

于实验前、10周(实验结束前)称量每组动物的体重。于实验前及6周、10周末(结束前)分别经耳中央静脉和心脏取血,离心后取血清,标本在日立7072全自动生物化学分析仪上测定,检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的浓度。血脂检测试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司提供。

1.3 病理学检查

10周末用2%苯巴比妥20 mL麻醉实验兔,心脏采血后处死。取出主动脉(从主动脉起始处至髂动脉分叉处),剔除动脉外膜脂肪组织,生理盐水冲洗。取主动脉起始处作0.3 cm环状剪切,后沿主动脉弓至降主动脉背侧面纵行正中中线剪开、铺平,置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h以上。选取靠近主动脉弓部的降主动脉,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,血管横断面作5 μm连续切片,分别做苏木素-伊红及免疫组织化学染色。

用NIKON100对铺平的主动脉进行摄像,观察斑块破裂、血栓形成情况,将照片输入计算机,用SimplePCI图像分析软件测定斑块面积及主动脉面积,并计算斑块/主动脉内膜面积比。

对HE染色标本进行摄像,用SimplePCI图像分析软件观察动脉壁,并随机选取5个视野,以内膜最厚处为中心,测量该点的内膜厚度及中膜厚度,并计算内膜/中膜厚度比,取该样本的平均值。同时对内膜、中膜面积进行测量,并计算内膜/中膜面积比。

1.4 炎性细胞检测

免疫组织化学染色采用二步法,DAB显色,棕黄色颗粒状物为阳性标记,测定巨噬细胞的表达。

主要步骤:脱蜡,水化组织切片;新配制的3% H₂O₂去离子水孵育20 min;抗原修复;滴加一抗;滴加试剂1(聚合修复物);滴加试剂2(二抗);DAB溶液显色;自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。抗单核巨噬细胞单克隆抗体(RAM11 DakoCytomation公司生产)1:1 500稀释。在10×20光镜下观察标本,应用LEICA IM50彩色显像仪采集图像,SimplePCI图像分析软件计算每张图像阳性颗粒的面积。阳性颗粒面积值采用SimplePCI软件的像素值表示。

1.5 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件包进行统计分析,统计指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。单组治疗前后比较采用配对t检验,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂检测和体重

在试验开始时各组兔的血脂和体重差异均无显著性,正常饮食组治疗前后血浆TC、LDLC、TG和HDLC变化均无显著性($P > 0.05$)。单纯高脂组喂养10周后与之前比较,兔血浆TC和LDLC显著升高($P < 0.01$)。治疗组干预4周后,阿托伐他汀组TC和LDLC水平明显低于高脂组($P < 0.05$),PAS组下降更加明显($P < 0.01$),两个干预组组间比较差异无显著性。高脂组和两个干预组TG和HDLC在整个实验过程中略有增加,治疗后组间比较差异无显著性。各组兔的体重在实验过程中增长,4组间差异无显著性(表1和表2)。

表1. 实验前后各组动物体重比较($\bar{x} \pm s$, kg)

分组	实验前	实验后
对照组	2.39 ± 0.17	3.17 ± 0.33
高脂组	2.54 ± 0.21	3.07 ± 0.27
他汀组	2.37 ± 0.11	3.07 ± 0.28
PAS组	2.43 ± 0.20	3.11 ± 0.15

2.2 病理形态学改变

肉眼观察可见正常对照组内膜光滑,无斑块形成。高脂组主动脉管壁有大量黄白色粥样斑块向管腔突出,并连成片状,从主动脉近端到远端,斑块逐渐减轻。阿托伐他汀组和PAS组斑块减少,以PAS组最为明显(图1)。

表 2. 实验前后各组动物血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

分 组	TC		LDLC		HDLc		TG (mmol/L)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	1.38 ± 0.86	1.4 ± 0.71	0.39 ± 0.47	0.21 ± 0.12	0.67 ± 0.27	0.73 ± 0.12	0.87 ± 0.25	0.83 ± 0.26
高脂组	1.41 ± 0.61	35.65 ± 7.26	0.30 ± 0.15	19.60 ± 4.41	0.63 ± 0.29	3.54 ± 0.63	1.46 ± 1.62	3.14 ± 2.64
他汀组	1.79 ± 0.61	26.15 ± 13.19 ^a	0.59 ± 0.43	14.33 ± 6.80 ^a	0.83 ± 0.17	3.31 ± 1.30	0.92 ± 0.48	2.92 ± 3.01
PAS 组	1.28 ± 0.39	22.14 ± 9.41 ^b	0.32 ± 0.23	11.30 ± 3.95 ^b	0.68 ± 0.19	3.39 ± 1.20	0.96 ± 0.60	1.18 ± 1.02

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较。



图 1. 各组兔动脉大体标本 A 为对照组, B 为高脂组, C 为他汀组, D 为 PAS 组。

正常对照组、高脂组、阿托伐他汀组和 PAS 组的斑块/动脉内膜面积比分别为 0.0%、69.0% ± 21.1%、45.9% ± 19.2%、21.1% ± 15.0%。高脂组与阿托伐他汀组、高脂组与 PAS 组、阿托伐他汀组与 PAS 组组间比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$; 表 3)。

各组动脉 HE 染色光镜下可见对照组主动脉内膜内皮细胞完整, 排列整齐, 内弹力膜清晰完好, 中膜平滑肌细胞体积、排列正常, 内膜及中膜均未见泡沫细胞及脂质沉积。高脂组主动脉内膜明显增厚, 斑块隆起明显, 内含大量泡沫细胞, 内皮细胞肿胀、变性、部分缺失, 内弹力膜断裂、模糊, 中膜增厚伴平滑肌细胞增生, 胞体变大, 排列紊乱, 内膜及中膜均可见大量巨噬细胞。阿托伐他汀组和 PAS 组 As 病变较高脂组明显减轻。4 组动脉内膜/中膜厚度及内膜/中膜面积组间比较差异均有显著性 ($P < 0.05$; 表 3)。

与高脂组比较, 阿托伐他汀组和 PAS 组可以使高脂组兔动脉内膜厚度/中膜、内膜/中膜面积比值明显下降 ($P < 0.01$)。阿托伐他汀组和 PAS 组间比较, 差异也有显著性意义 ($P < 0.05$, 图 2 和表 3)。

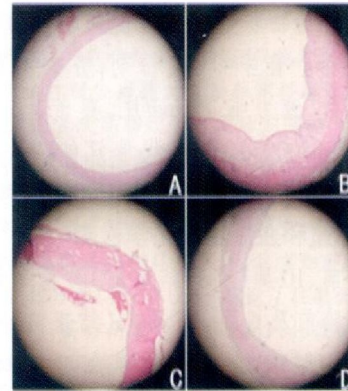


图 2. 各组兔主动脉壁 HE 染色 ($\times 500$) A 为对照组, B 为高脂组, C 为他汀组, D 为 PAS 组。

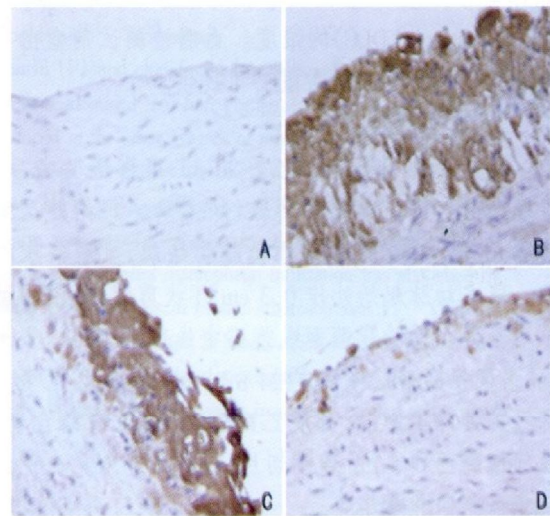


图 3. 各组兔主动脉壁巨噬细胞 ($\times 200$) A 为对照组, B 为高脂组, C 为他汀组, D 为 PAS 组。

2.3 兔动脉壁巨噬细胞的表达

正常兔动脉壁没有或仅有少量的棕黄色颗粒状阳性染色。高脂组增厚的动脉内膜可见大量巨噬细胞棕黄色颗粒状阳性染色物质。阿托伐他汀和 PAS 组巨噬细胞阳性染色物质明显低于高脂组 ($P < 0.01$), PAS 组较阿托伐他汀组减轻更加明显 ($P < 0.05$, 图 3 和表 3)。

表 3. 斑块与主动脉内膜面积、斑块与中膜厚度和斑块与中膜面积比值

分 组	斑块/主动脉面积	内膜/中膜厚度	内膜/中膜面积	巨噬细胞
正常组	0	0	0	
高脂组	69.0% ±21.1%	127.8% ±51.5%	97.7% ±50.0%	202035 ±78138
他汀组	45.9% ±19.2% ^a	67.8% ±30.6% ^b	53.1% ±32.6% ^b	108914 ±55930 ^b
PAS 组	21.1% ±15.0% ^{bc}	18.1% ±26.3% ^{bc}	16.8% ±23.9% ^{bc}	40717 ±28753 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与高脂组比较; c 为 $P < 0.05$, 与他汀组比较。

3 讨论

近年来的基础研究证实, As 是慢性、弥漫性炎症性疾病, 免疫炎症贯穿了从粥样斑块的形成到斑块破裂到血栓形成的整个过程, 而斑块的破裂以及继发的血栓形成是造成临床事件的关键因素, 是缺血性心、脑血管病的重要原因。

在 As 病变早期阶段甚为关键的环节是, 巨噬细胞源性泡沫细胞在局部的聚集。巨噬细胞是 As 斑块的主要组成细胞, 多位于内膜斑块的中下部分, 大量巨噬细胞的聚集是斑块炎症和不稳定的关键特征^[1]。巨噬细胞上调清道夫受体, 吞噬细胞外的氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL), 形成泡沫细胞。巨噬细胞诱导大量基因产生, 并产生组织因子(tissue factor, TF), 细胞活素(cytokines), 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)。这些因子又促进 As 病变的发展和斑块的不稳定。因此, 巨噬细胞在 As 病变的发展中起着极为关键的作用^[3]。近年来针对 As 病变形成和稳定斑块的策略就包括保护血管内皮细胞、控制炎症、调节血脂、抗氧化以及抗血小板治疗^[3,7]。

在本研究中, 高脂喂养组在喂养 10 周后与之前比较, 兔血浆 TC 和 LDLC 显著升高($P < 0.01$)。兔主 As 斑块大体面积、斑块部位内膜面积及厚度明显增大, 巨噬细胞在动脉内膜大量聚集。而正常喂养组兔血脂正常, 主动脉没有 As 病变出现, 动脉内膜只有少量的巨噬细胞存在, 提示高脂喂养可诱发兔高脂血症和 As 病变, 其病变形态与人类 As 病变极为相似。

普罗布考、阿托伐他汀、氯吡格雷分别是抗氧化、抗炎调脂和抗血小板制剂的具有代表性的药物, 但同时又都具有阻止血管炎症发生和发展的作用, 至少可以部分产生对临床有益的结局^[8]。

氧化应激是缺血性心脑血管病的主要危险因素之一, LDL 的氧化是 As 病变形成的主要原因。证据证实, ox-LDL 是 LDL 最强的导致 As 的形式, 促进了 As 性病变的发展, 抗氧化治疗可以抑制病变的发

展^[9-11]。普罗布考是一种人工合成的抗氧化制剂, 可以在动脉管腔内和内皮下发挥抑制 LDL 氧化的作用。研究证实, 普罗布考能明显降低高脂喂养和高血压鼠主动脉组织中氧化胆固醇的含量, 从而使 ox-LDL 的形成减少; 而且使 As 斑块体积下降, 细胞外基质增加, 巨噬细胞数量减少, 从而发挥其的抗炎作用, 并使斑块更加稳定^[12,13]。

近年研究发现他汀类药物不仅是一类良好的调脂药物, 而且具有抑制和逆转 As 的作用^[14-16]。有利于修复破裂或溃疡的 As 斑块, 有利于斑块的稳定和/或降低破裂斑块部位的血栓形成。他汀类药物还可以改善高胆固醇血症患者的内皮功能, 降低人类 As 的炎症, 明显减少巨噬细胞和 T 细胞, 减少巨噬细胞分泌金属蛋白酶, 减少 ox-LDL, 增加胶原的含量, 减少血管平滑肌细胞的凋亡, 减少与 As 病变相关的细胞死亡。另外, 他汀制剂还表现出重要的抑制血栓形成的作用。

炎症和血小板激活是急性冠状动脉综合征的紧急情况。血小板可以通过增加白细胞和内皮的炎症反应, 而增加缺血性损伤。抑制血小板的活性可以预防冠心病人的缺血并发症。氯吡格雷(clopidogrel), 选择性 ADP 拮抗剂的抗血小板制剂, 其通过对血小板活性的抑制, 可以对缺血动脉施加抗炎作用, 减少心脑血管缺血事件的发生^[17]。

针对高脂饲养的兔, 将这三种药物联合使用, 并与高脂组和单纯使用阿托伐他汀做对照, 期望在强强联合下能够发挥更好的抗 As 病变的作用。结果显示阿托伐他汀和 PAS 组 4 周后, TC 和 LDLC 水平明显低于高脂组, PAS 组下降更加明显, 两个干预组间比较差异无显著性。同时两个干预组 As 大体病变明显减轻, 斑块部位内膜面积和厚度下降, 巨噬细胞数量显著减少, 与高脂组比较差异具有显著性, PAS 组优于阿托伐他汀组。

综上所述, 抗氧化、抗血小板、他汀联合用药对 As 斑块的形成和炎症具有明显的干预作用, 其作用优于单纯使用阿托伐他汀, 说明联合治疗对于稳定斑块、以及干预缺血事件的发生较之单纯使用他汀

类药物更具有临床应用的意义。

[参考文献]

- [1] Marcu L, Fang Q, Jo JA, et al. In vivo detection of macrophages in a rabbit atherosclerotic model by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **181** (2): 295-303.
- [2] Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization [J]. *Stroke*, 2006, **37** (7): 1923-932.
- [3] Rattazzi M, Puato M, Faggin E, et al. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders [J]? *J Hypertension*, 2003, **21** (10): 1787-803.
- [4] Norbert N, Laurent D, Philippe D. The Vulnerable Carotid Artery Plaque: Current Imaging Methods and New Perspectives [J]. *Stroke*, 2005, **36**: 2764-772.
- [5] Steven EN, E MT, Paul S, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2004, **291**: 171-080.
- [6] Paoletti R, Goto AM, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy [J]. *Circulation*, 2004, **109** (23) (Supplement): III20-III26.
- [7] Fang L, Wei H, Mak KH, et al. Marker of low-grade inflammation and soluble cell adhesion molecules in Chinese patients with coronary artery disease [J]. *Cardiol*, 2004, **20** (14): 1433-438.
- [8] Kereiakes DJ. Adjunctive pharmacotherapy before percutaneous coronary intervention in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the role of modulating inflammation [J]. *Circulation*, 2003, **108** (16) (supplement): III22-III27.
- [9] Yu YM, Chang WC, Wu CH. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid [J]. *J Nutri Biochem*, 2005, **16** (11): 675-81.
- [10] Hellings D, Seabron R, Femin O, et al. Effect of antioxidants on atherosclerotic plaque formation in balloon-Denuded and irradiated hypercholesterolemic rabbits [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2005, **46** (4): 540-547.
- [11] Thomas, MJ. Physiological aspects of low-density lipoprotein oxidation [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2000, **11** (3): 297-301.
- [12] Hodis HN, Hashimoto S, Mack WJ, et al. Probucol reduces oxysterol formation in hypertensive rabbits [J]. *Hypertension*, 2000, **36** (3): 436-441.
- [13] Steven B, Thomas SR, Hou JY, et al. Processes involved in the site-specific effect of probucol on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 2005, **25** (8): 1684-690.
- [14] Funatsu T, Kakuta H, Tanaka H, et al. Atorvastatin (liptor): a review of its pharmacological and clinical profile [J]. *Nippon yakuri-gaku Zasshi*, 2001, **117** (1): 65-69.
- [15] Rosenson RS. Pluripotential mechanisms of cardioprotection with HMG-CoA reductase inhibitor therapy [J]. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 2001, **1** (6): 411-420.
- [16] Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **160** (1): 49-58.
- [17] Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ, et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2005, **146** (3): 419-424.

(此文编辑 李小玲)