

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0771-04

• 抗氧化专栏 •

## 普罗布考、氯吡格雷、阿托伐他汀综合疗法对兔动脉粥样硬化相关炎症因子的抑制作用

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

(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 100730 3 航空工业中心医院神经内科, 北京市 100012)

[关键词] 病理学; 血管细胞粘附分子 1; 白细胞介素 6 单核细胞趋化蛋白 1; 普罗布考; 氯吡格雷; 阿托伐他汀

[摘要] 目的 探讨普罗布考、氯吡格雷和阿托伐他汀联合用药对兔动脉粥样硬化相关炎症因子的抑制作用。方法 新西兰雄性大白兔 36只随机分为 4组, 分别给予正常及高脂饮食, 6周后高脂组再分为高脂组、高脂+阿托伐他汀组、高脂+普罗布考、氯吡格雷、阿托伐他汀联合干预组, 继续喂养 4周后采用免疫组织化学染色法观察主动脉斑块部位炎症因子的表达。结果 高脂组主动脉中血管细胞粘附分子 1、白细胞介素 6和单核细胞趋化蛋白 1的表达明显增加。阿托伐他汀组炎症因子血管细胞粘附分子 1、白细胞介素 6和单核细胞趋化蛋白 1的表达下降, 与高脂组比较差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ), 联合干预组血管细胞粘附分子 1、白细胞介素 6和单核细胞趋化蛋白 1的表达下降更为明显 ( $P < 0.01$ ), 与阿托伐他汀组比较差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。结论 抗氧化、抗血小板、他汀联合用药对动脉粥样硬化炎症因子的表达具有明显的抑制作用, 其作用优于单纯使用阿托伐他汀。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

## Effects of Probucol C lopidogrel A torvastatin United Therapy on M arkers of Inflammation of Rabbit A therogenesis

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

[KEY WORDS] Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Interleukin-6; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Probucol; Clopidogrel; Atorvastatin

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of united therapy of probucol (P), clopidogrel (Anti-thrombosis A) and atorvastatin (statin S) on markers of inflammation of rabbit atherogenesis. **Methods** 36 rabbits were randomized into four groups. 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 rest groups for 6 weeks. Then, animals were randomized to receive treatment or no treatment. One group of treatment were received atorvastatin, and the other accepted probucol and clopidogrel and atorvastatin and killed after 4 weeks. **Results** Arterial macrophage infiltration was abolished by the treatment of atorvastatin and united group. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and interleukin-6 (IL-6) were significantly diminished in the neointima and the media, and the same were monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Notedly, there was a more evident effect in united therapy than Atorvastatin in anti-inflammation. **Conclusions** Atorvastatin and united therapy diminishes the 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 meaningful additional prediction for the reduction of acute ischemic events in patients treated with united therapy.

在众多疾病所导致的死亡中, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心脑血管病仍排在第一位<sup>[1]</sup>, 延缓、抑制 As 病变的发生、发展, 阻止临床事件是国

内外学者关注和探索的关键领域。本研究探讨普罗布考 (probucol, P)、氯吡格雷 (anti-thrombosis, A)、阿托伐他汀 (statins, S) 三联用药对兔动脉粥样硬化模型炎症因子的干预效果。

[收稿日期] 2008-06-30

[修回日期] 2008-10-12

[作者简介] 王素香, 硕士, 主任医师, 研究方向为脑血管疾病, 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, 研究方向为脑血管疾病, 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。

## 1 材料和方法

### 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:

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周后随机分为正常对照组9只,给予正常基础饲料共10周,其余27只高脂喂养,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:1%胆固醇,2%猪油,10%蛋黄。喂养6周后高脂喂养组再分为3组,每组9只,其中高脂组继续单纯高脂喂养;阿托伐他汀组给予阿托伐他汀2.5 mg/(kg·d);联合干预组给予普罗布考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。两组药物均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 炎症因子的检测

免疫组织化学染色采用二步法免疫组织化学检测二氨基联苯胺(DAB)显色,棕黄色颗粒状物为阳性标记。测定血管细胞粘附分子1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的表达。主要步骤:脱蜡,水化组织切片;新配制的3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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VCAM-1多克隆抗体(Cell Applications, NC公司)1:500稀释;抗IL-6单克隆抗体(Santa Cruz公司生产)1:2000稀释;抗MCP-1抗体(博士德生物技术有限公司)1:100稀释。用LEICA DM-2500显微镜,在10×20镜下观察标本,应用LEICA M5040彩色显像软件采集图像,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(测量单位:Pixel)。

## 1.3 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,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 兔主动脉壁血管细胞粘附分子1的表达

正常对照组内膜和中膜的内皮细胞及平滑肌细胞内仅见散在棕黄色颗粒状阳性染色物质。高脂组

增厚的动脉内膜及中膜的内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞内可见大量VCAM-1棕黄色颗粒状阳性染色物质,尤以内膜明显,其平均面积为 $223\,739 \pm 123\,432$ (SimplePCI软件的像素值)。阿托伐他汀组和联合干预组VCAM-1阳性染色物质平均面积分别为 $100\,190 \pm 33\,841$ 和 $16\,524 \pm 13\,495$ ,明显低于高脂组( $P < 0.01$ ),联合干预组比阿托伐他汀组更低( $P < 0.05$ ,图1,表1)。

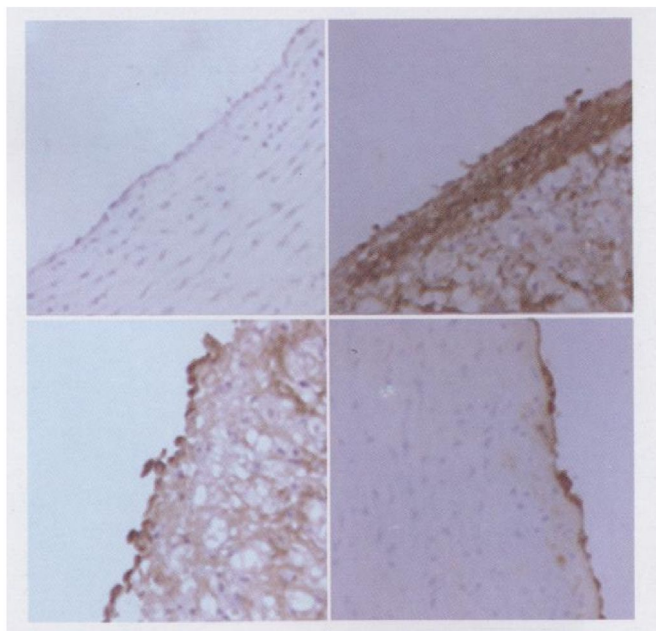


图1 各组兔主动脉壁血管细胞粘附分子1的表达(×200)

左上为正常对照组,右上为高脂组,左下为阿托伐他汀组,右下为联合干预组。

### 2.2 兔动脉壁白细胞介素6的表达

正常对照组内膜和中膜的内皮细胞及平滑肌细胞内仅见散在棕黄色颗粒状阳性染色物质。高脂组增厚动脉内膜及中膜的内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞内可见大量IL-6棕黄色颗粒状阳性染色物质,尤以内膜明显,阳性颗粒物面积为 $108\,347 \pm 52\,118$ (SimplePCI软件的像素值)。阿托伐他汀组和联合干预组IL-6阳性染色物质明显低于高脂组,其阳性颗粒物面积分别为 $63\,725 \pm 17\,150$ ( $P = 0.01$ )和 $29\,466 \pm 16\,266$ ( $P < 0.01$ ),联合干预组与阿托伐他汀组比较差异也具有显著性( $P < 0.05$ ,图2,表1)。

### 2.3 兔动脉壁单核细胞趋化蛋白1的表达

正常对照组内膜和中膜的内皮细胞及平滑肌细胞内仅见散在棕黄色颗粒状阳性染色物质。高脂组增厚的动脉内膜及中膜的内皮细胞、巨噬细胞及平



滑肌细胞内可见大量 MCP-1 棕黄色颗粒状阳性染色物质, 尤以内膜明显, 阳性颗粒物面积为  $188\ 581 \pm 110\ 651$  (SimplePCI 软件的像素值)。阿托伐他汀和联合干预组 MCP-1 阳性染色物质明显低于高脂组, 其阳性颗粒物面积分别为  $101\ 414 \pm 87\ 263$  ( $P < 0.05$ );  $14\ 831 \pm 15\ 321$  ( $P < 0.01$ ), 联合干预组与阿托伐他汀组比较差异具有显著性 ( $P < 0.05$ , 图 3, 表 1)。

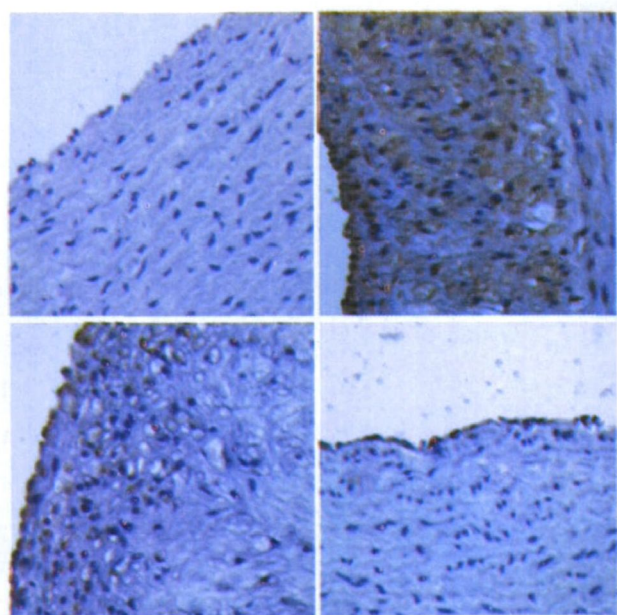


图 2 各组兔主动脉壁白细胞介素 6 免疫组织化学染色 ( $\times 200$ ) 左上为正常对照组, 右上为高脂组, 左下为阿托伐他汀组, 右下为联合干预组。

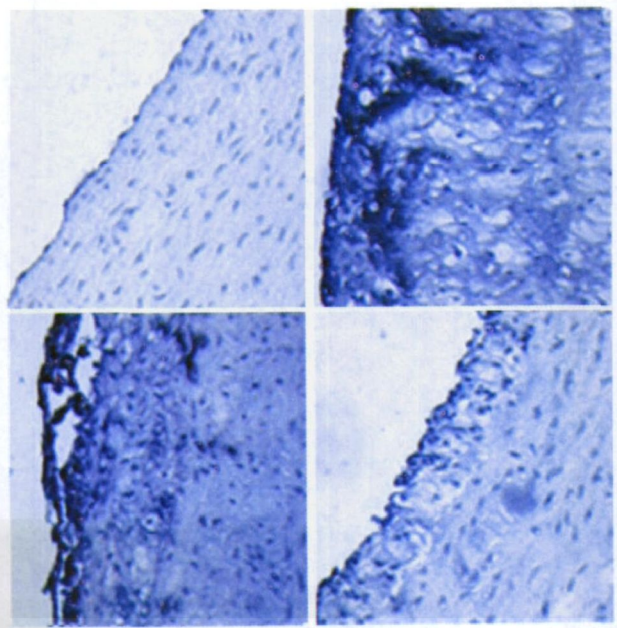


图 3 各组兔主动脉壁单核细胞趋化蛋白 1 免疫组织化学染色 ( $\times 200$ ) 左上为正常对照组, 右上为高脂组, 左下为阿托伐他汀组, 右下为联合干预组。

表 1 各组兔主动脉壁炎性细胞和炎性因子的表达

分 组	VCAM-1	IL-6	MCP-1
正常对照组	—	$2\ 903 \pm 905$	—
高脂组	$223\ 739 \pm 123\ 432$	$108\ 347 \pm 52\ 118$	$188\ 581 \pm 110\ 651$
阿托伐他汀组	$100\ 190 \pm 33\ 841^a$	$63\ 725 \pm 17\ 150^b$	$101\ 414 \pm 87\ 263^c$
联合干预组	$16\ 524 \pm 13\ 495^{ad}$	$29\ 466 \pm 16\ 266^{ad}$	$14\ 831 \pm 15\ 321^{ad}$

a 为  $P < 0.01$ , b 为  $P = 0.01$ , c 为  $P < 0.05$  与高脂组比较; d 为  $P < 0.05$  与阿托伐他汀组比较。

### 3 讨 论

近来的研究已经证实, 系统炎症的标志物可以作为缺血性心血管病、脑血管病危险性增加的潜在预测指标, 如 IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 等。这些因子可以作为传统危险因素的补充, 以识别正处于 As 发展阶段的新个体<sup>[2]</sup>。

本研究采用高脂喂养的方法, 诱导兔主 As 的形成, 用免疫组织化学染色法观察主动脉斑块部位炎性因子 IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 的表达。结果显示, 正常喂养组兔主动脉没有粥样硬化斑块, 动脉内膜仅有少量 IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 的表达, 而高脂组兔不仅血浆胆固醇水平明显增加, 而且主动脉有显著的粥样硬化病变, 动脉内膜和部分中膜 IL-6、MCP-1 和 VCAM-1 的表达明显增加, 阳性标记物部分聚集成团块状, 支持 As 病变为一个炎症的过程, 提示高脂组 As 病变和炎症反应明显, 高胆固醇血症可以诱发炎症<sup>[3]</sup>。

MCP-1 是由血管壁细胞分泌的重要的趋化因子, 在氧化性脂质的调节下表达和释放, 促进单核细胞进入内皮下以及泡沫细胞形成, 对血管平滑肌细胞组织因子的表达、增殖和趋化发挥不同程度的作用, 在 As 形成过程中发挥着重要的作用<sup>[4-6]</sup>。VCAM-1 是一种介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间粘附与相互作用的膜表面糖蛋白, 在内皮细胞、白细胞、血小板及平滑肌细胞表面仅有少量表达。VCAM-1 具有广泛的生物学活性, 通过受体-配体结合形式发挥作用, 导致细胞与细胞间或细胞与基质间的粘附, 并参与细胞信号传导与活化, 细胞生长与分化等一系列重要生理和病理过程<sup>[7]</sup>。IL-6 为急性炎症性细胞因子, 随年龄增加, 并与高血压、吸烟和胰岛素敏感性显著相关。IL-6 在 As 发病过程中具有重要作用, 可以促进 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 的产生。几个研究证实, IL-6 与缺血性心脏病有关。IL-6 还可以上调细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), 使白细胞容易向损伤的内皮聚集。IL-6 可以增加纤维蛋白

原和(tl)因子,两者都与动脉血栓危险增加有关。最近有研究报道 IL-6特别在人类冠状动脉斑块的肩部表达。在这样的区域,IL-6与血管紧张素 $\text{E}$ (angiotensin  $\text{E}$  Ang $\text{E}$ )共同存在,体外试验证实,血管紧张素 $\text{E}$ 可以增强内皮细胞和平滑肌细胞对 IL-6的表达。结果可以证实以往在鼠 As病变的研究,IL-6是在 As斑块中合成的,并且加重脂肪病变的发展。因此,IL-6通过增加组织因子、纤维蛋白原、(tl)因子和血管假性血友病因子的表达,激活内皮细胞和增加血小板的产生,以及通过降低抗凝血酶和蛋白 S 而诱导血栓前状态。IL-6目前已成为评估血栓危险的一个有用的工具。降低 IL-6的水平和阻止其活性,可成为降低血栓危险和抑制 As进展的潜在治疗目标<sup>[2 8]</sup>。

本研究针对高脂饲养的兔,将干预组分为阿托伐他汀组和联合干预组。干预 4 周后,阿托伐他汀组炎症因子 VCAM-1、IL-6和 MCP-1的表达明显下降,与高脂组比较差异具有显著性。联合干预组将普罗布考、氯吡格雷、阿托伐他汀联合使用,并与高脂组和单纯使用阿托伐他汀组做对照,观察单药和联合用药对抗 As炎症因子的作用。结果显示,炎症因子 VCAM-1、IL-6和 MCP-1的表达下降更为明显,与高脂组比较具有显著性。两个干预组间比较显示,联合干预组比阿托伐他汀组更具优势。

普罗布考、阿托伐他汀、氯吡格雷分别是抗氧化、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<sup>[9]</sup>。普罗布考是一种人工合成的抗氧化制剂,可以改善内皮功能,抑制内皮细胞的凋亡,抑制氧化型低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的水平,抑制粘附分子的表达, P选择素的表达,使一氧化氮增多<sup>[10 11]</sup>。他汀制剂具有抗 As效应,该效应不仅与降低血浆胆固醇水平相关,而且与其降低循环血液中的化学因子 MCP-1、VCAM、ICAM、肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-8和 IL-1的表达密切相关<sup>[12 13]</sup>。氯吡格雷通过对血小板活性的抑制,可以对缺血性动脉

施加抗炎作用<sup>[14]</sup>。本研究提示抗氧化、他汀和抗血小板的联合用药策略比单独使用他汀能显示出更强的抗 As作用,可以为临床抗 As的治疗提供良好实验基础和使用方法。

#### [参考文献]

- [1] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Effects of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progressing of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2004 **291**: 1 071-080
- [2] Rattazzi M, Puato M, Faggin E, et al. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders [J]? *Hypertension*, 2003 **21** (10): 1 787-803
- [3] 王素香,王拥军,尹洪超,等. 普罗布考、氯吡格雷、阿托伐他汀综合疗法对兔动脉粥样硬化病变的干预 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (8): 628-632
- [4] Rosenson RS, Tangney CC, Levine DM, et al. Association between reduced low density lipoprotein oxidation and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 production in statin-treated subjects [J]. *J Laboratory & Clinic Medicine*, 2005 **145** (2): 83-87
- [5] 黎娜,朱文玲,陈莲凤,等. 单核细胞趋化因子 1和 Fractalkine对平滑肌细胞增殖、趋化和组织因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (11): 975-978
- [6] Ishizuka T, Matsumura K, Matsui T. Accumulation and neointimal formation after balloon arterial injury in cholesterol-fed rabbits [J]. *J Cardio-vasc Pharmacol*, 2003 **41** (4): 571-578
- [7] Toshinori Sano H, Moriwaki H, et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis [J]. *Annals New York Acad Sci*, 2001 **947**: 199-206
- [8] Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis [J]. *British Haematol*, 2001 **115** (1): 3-12
- [9] 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 4): 22-27
- [10] Steven R, Thomas SR, Hou JY, et al. Processes involved in the site-specific effect of probucol on atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb & Vasc Biol*, 2005 **25** (8): 1 684-690
- [11] 曹剑,朱冰坡,范利,等. 普罗布考对老年下肢动脉硬化症的抗氧化和抗炎作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (4): 336-338
- [12] 张大庆,赵水平,周宏年,等. 阿托伐他汀对高胆固醇饮食兔动脉粥样硬化病变的影响及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005 **13** (6): 745-748
- [13] Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, et al. A torvastatin 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
- [14] 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 J Pharmacol*, 2005 **146** (3): 419-424

(此文编辑 李玲玲)