

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0881-04

• 实验研究 •

西洛他唑抗动脉粥样硬化的作用机制

卢振华, 马业新, 冯达应, 柯 辉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化; 西洛他唑; 单核细胞趋化蛋白 1; 基质金属蛋白酶 9

[摘要] 目的 观察西洛他唑对兔动脉粥样硬化斑块组织的影响, 进一步探讨西洛他唑抗动脉粥样硬化作用及其可能机制。方法 将 30 只新西兰雄性白兔随机分为正常对照组、高脂饮食组和西洛他唑组。酶法检测血脂, 免疫沉淀法测定血清 C 反应蛋白水平, 免疫组织化学检测基质金属蛋白酶 9 和核因子 KB 的表达, 病理形态学分析各组主动脉内膜厚度和斑块面积, 逆转录聚合酶链反应检测血管组织单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达。结果 实验第 12 周末, 西洛他唑组总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平低于高脂饮食组, 但高于正常对照组 (P 均 < 0.01); 西洛他唑组主动脉内膜厚度和斑块面积低于高脂饮食组, 但大于正常对照组 (P 均 < 0.01); 西洛他唑组核因子 KB、单核细胞趋化蛋白 1 和基质金属蛋白酶 9 的表达弱于高脂饮食组, 但强于正常对照组 (P 均 < 0.01)。结论 西洛他唑有抗动脉粥样硬化作用, 其作用机制可能与下调核因子 KB、单核细胞趋化蛋白 1 及基质金属蛋白酶 9 的表达有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Study of Anti-Atherosclerotic Mechanism of Cilostazol

LU Zhen-Hua MA Ye-Xin FENG Da-Ying and KE Hui

(Department of Cardiology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030 China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis Cilostazol Monocyte Chemoattractant Protein-1; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of Cilostazol on rabbit atherosclerotic plaque and try to illustrate the anti-atherosclerotic mechanism of Cilostazol. **Methods** Thirty New Zealand male rabbits were randomly divided into normal control group ($n=10$), high-cholesterol group ($n=10$) and Cilostazol group ($n=10$). The levels of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) were detected by Enzymatic assay, and the level of C-reactive protein (CRP) were detected by immuno-precipitation; the aortic intimal thickness and plaque area of aorta were measured by pathomorphology; the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was detected with immunohistochemical method, and the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was detected by RT-PCR. **Results** At the end of 12 weeks, the levels of TC, TG and LDLC in the Cilostazol group were significantly lower than that of high-cholesterol group ($P < 0.01$), but higher than that of control group ($P < 0.01$); the aortic plaque area and intimal thickness in the Cilostazol group were significantly lower than that in the high-cholesterol group ($P < 0.01$), but higher than that in the control group ($P < 0.01$); the NF- κ B, MCP-1 and MMP-9 expression of Cilostazol group were significantly lower than that of high-cholesterol group ($P < 0.01$), but higher than that of control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Cilostazol has obvious anti-atherosclerotic effects, reducing the expression of NF- κ B, MCP-1 and MMP-9 may be the anti-atherosclerotic mechanism of Cilostazol.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一多因素参与的慢性进展性疾病, 现有研究表明, 核因子 KB (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的表达增强与 As 的发生发展密切相关^[1-3]。西洛他唑是一种选择性磷酸二酯酶 3 抑制剂, 可抑制血小板及平滑肌内磷酸二酯酶的水解, 增加细胞内

cAMP 水平, 具有抗血小板聚集及血管扩张作用。近年来发现西洛他唑有抗炎作用及抗平滑肌细胞增殖作用, 支架植入术后应用西洛他唑可减少新生内膜增生和重构, 有抗晚期再狭窄作用^[4], 但西洛他唑对 As 发生发展及可能的作用机制目前尚不清楚。本研究通过西洛他唑对兔 As 斑块组织的影响, 进一步探讨西洛他唑抗 As 作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

4 月龄雄性新西兰大耳白兔 30 只, 体重 2.0~

[收稿日期] 2008-07-01

[修回日期] 2008-10-03

[作者简介] 卢振华, 硕士研究生, 研究方向为心血管病介入治疗, Email 为 doctorluzhenhua@sina.com。马业新, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管病介入治疗。

2.5 kg由同济医学院动物实验中心提供。西洛他唑系中国大冢制药有限公司生产,胆固醇购自武汉亚法生物公司,总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒购自北京中生化试剂公司,NF- κ B和MMP-9免疫组织化学试剂盒及C反应蛋白试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

1.2 动物分组及兔动脉粥样硬化模型的建立

30只兔以普通饲料适应性喂养1周后随机分为三组,每组10只:正常对照组每兔每日给予普通兔饲料100 g;④高脂饮食组每兔每日给予高脂饲料100 g(含1 g胆固醇及5 g猪油);④西洛他唑组在高脂饮食组基础上,每天上午定时给予西洛他唑片50 mg/kg^[5](每片50 mg)配成水溶液于每日进食前灌胃。正常对照组和高脂饮食组采用与西洛他唑组等量的水溶液于每日进食前灌胃。各组动物分笼饲养12周,饮水不限。

1.3 血清脂质和C反应蛋白水平测定

分别于实验第0周、实验第12周末空腹经兔耳中动脉采血。取全血3 mL,4℃静置24 h分离血清-20℃保存。酶法测定TC、TG和LDL-C,免疫沉淀法测定CRP。

1.4 主动脉病理学观察

12周时经兔耳缘静脉注入过量苯巴比妥钠麻醉,开胸,迅速分离主动脉。粥样斑块大体标本取降主动脉3 cm,纵向剖开,生理盐水冲洗。先将标本置于4%福尔马林溶液内固定24 h,70%乙醇漂洗,将标本浸润在苏丹Ⅲ染液中,室温下静置15 min,再转移至80%酒精溶液内浸润20 min,然后自来水冲洗1 h拍照。另取主动脉弓处约0.5 cm长的血管组织置入10%中性甲醛溶液中浸泡,常规乙醇脱水,石蜡包埋,制成6 μ m厚连续切片,行HE染色,光镜下观察照相。HM IAS-2000彩色图文分析系统计算各组动物主动脉内膜厚度、中膜厚度、内膜/中膜厚度比及主动脉粥样斑块面积/内膜总面积比。

1.5 免疫组织化学检测斑块基质金属蛋白酶9和核因子 κ B的表达

采用SABC法分别检测主动脉粥样斑块组织中MMP-9及NF- κ B的表达,具体操作步骤按说明书进行。免疫组织化学染色以出现细胞黄染为阳性结果,细胞无黄染者为阴性细胞。每张切片选择4~6个高倍视野,计算平均值。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测血管组织单核细胞趋化蛋白1 mRNA的表达

取50 mg主动脉组织,用Trizol试剂盒提取总RNA,-70℃冻存备用。引物序列:MCP-1 mRNA上

游引物5'-GTC TCT GCA ACG CTT CTG TGC C-3',下游引物5'-AGT CGT GTG TTC TTG GGT TGT GG-3',产物为327 bp;GAPDH mRNA上游引物5'-GCG CCT GGT CAC CAG GGC TGC TT-3',下游引物5'-TGC CGA AGT GGT CGT GGA TGA CCT-3',产物为465 bp。反应条件为94℃变性60 s,54℃退火60 s,72℃延伸60 s,共35个循环,最后72℃延伸7 min。

1.5%琼脂糖凝胶电泳(含0.5 g/L EB)后,Bio-RAD凝胶成像系统成像,光密度值分析,以GAPDH为内参计算各目的片段相对光密度值。

1.7 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,多组间两两比较用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂和C反应蛋白水平变化

与实验第0周相比,除正常对照组外,实验第12周末高脂饮食组和西洛他唑组TC、TG和LDL-C水平明显升高($P < 0.01$);实验第12周末,高脂饮食组和西洛他唑组TC、TG和LDL-C水平高于正常对照组,西洛他唑组TC、TG和LDL-C水平低于高脂饮食组(P 均 < 0.01)。实验第0周各组CRP无明显差异;实验第12周末高脂饮食组和西洛他唑组较正常对照组明显增高,但西洛他唑组较高脂饮食组显著降低(P 均 < 0.01 ;表1)。

2.2 主动脉病理形态学变化

肉眼下,正常对照组主动脉内膜光滑,未见粥样硬化斑块;高脂饮食组主动脉内膜有严重的粥样硬化病变,斑块多融合成片,密布内膜面;西洛他唑组粥样斑块散在分布,病变较高脂饮食组减轻。HE染色显示,正常对照组血管内膜光滑、连续、内皮完整;高脂饮食组血管内膜明显增厚,内膜中大量巨噬细胞浸润,内有脂质沉积,形成泡沫细胞,并有平滑肌细胞增殖;西洛他唑组内膜增厚和平滑肌细胞增殖较高脂饮食组轻(图1)。与正常对照组相比,高脂饮食组和西洛他唑组内膜厚度和斑块面积显著增加($P < 0.01$);与高脂饮食组相比,西洛他唑组内膜厚度和斑块面积明显降低($P < 0.01$;表2)。

2.3 基质金属蛋白酶9和核因子 κ B的表达

与正常对照组相比,高脂饮食组MMP-9和NF- κ B阳性表达细胞均明显增加($P < 0.01$);而西洛他唑组MMP-9和NF- κ B阳性表达细胞明显低于高脂饮食组($P < 0.01$),但仍强于正常对照组($P < 0.01$;图2和3及表3)。

表 1 血脂和 C 反应蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

分 组	时间 (周)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	CRP (mg/L)
正常对照组	0	1.42 ±0.22	0.69 ±0.13	0.53 ±0.12	1.63 ±0.18
	12	1.44 ±0.20	0.73 ±0.16	0.53 ±0.13	1.67 ±0.21
高脂饮食组	0	1.40 ±0.21	0.75 ±0.15	0.54 ±0.13	1.64 ±0.20
	12	24.68 ±3.59 ^a	6.47 ±1.03 ^a	17.71 ±3.15 ^a	5.90 ±1.33 ^a
西洛他唑组	0	1.43 ±0.23	0.76 ±0.15	0.54 ±0.14	1.66 ±0.20
	12	17.78 ±3.04 ^{ab}	4.34 ±0.87 ^{ab}	12.16 ±2.96 ^{ab}	2.45 ±0.65 ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组第 12 周末相比; b为 $P < 0.01$, 与高脂饮食组第 12 周末相比。

表 2 第 12 周末主动脉病理形态学检测指标 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

分 组	内膜厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	内膜/中膜厚度比	斑块面积/内膜总面积比
正常对照组	10.6 ±2.2	248.2 ±22.0	4.2% ±0.5%	0.0% ±0.0%
高脂饮食组	192.6 ±30.3 ^a	308.1 ±30.0	62.2% ±5.1%	51.5% ±11.1% ^a
西洛他唑组	88.6 ±18.5 ^{ab}	270.3 ±23.0	26.3% ±0.0%	24.0% ±6.6% ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比; b为 $P < 0.01$, 与高脂饮食组相比。

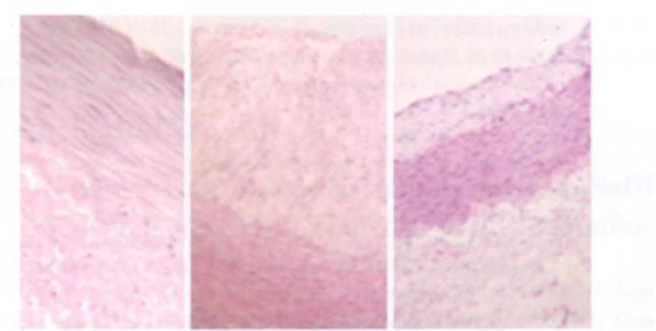


图 1. 主动脉 HE 染色 左为正常对照组, 中为高脂饮食组, 右为西洛他唑组。

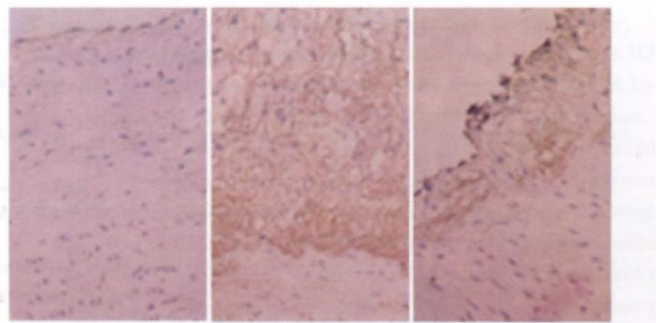


图 2. 免疫组织化学检测 MMP-9 的表达 左为正常对照组, 中为高脂饮食组, 右为西洛他唑组。

表 3 第 12 周末血管组织中 MMP-9 和 NF-κB 的表达 ($\bar{x} \pm s$ $n=10$)

分 组	MMP-9 阳性率	NF-κB 阳性率
正常对照组	5.2% ±0.9%	11.6% ±1.5%
高脂饮食组	55.5% ±9.8% ^a	42.5% ±7.5% ^a
西洛他唑组	22.5% ±7.9% ^{ab}	16.5% ±8.8% ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组比; b为 $P < 0.01$, 与高脂饮食组比。

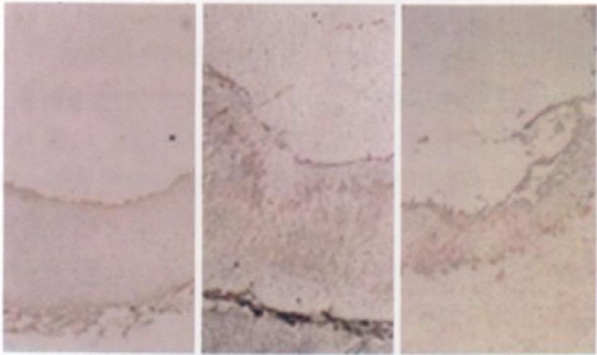


图 3 免疫组织化学检测 NF-κB 的表达 左为正常对照组, 中为高脂饮食组, 右为西洛他唑组。

2.4 主动脉单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达

第 12 周末, 高脂饮食组 MCP-1 mRNA 的表达 (相对吸光度值为 0.41 ±0.07) 较正常对照组 (相对吸光度值为 0.12 ±0.02) 明显增强 ($P < 0.01$); 西洛他唑组 MCP-1 mRNA 表达 (相对吸光度值为 0.20 ±0.03) 较高脂饮食组明显降低 ($P < 0.01$), 但仍强于正常对照组 ($P < 0.01$; 图 4)。

3 讨论

动脉粥样硬化是缺血性心脑血管病最常见的原因, 除经典的他汀类药物外, 用于防治动脉粥样硬化新的药物也是目前研究的热点。现已明确血清 TC、LDL 水平与 As 形成呈正相关。本研究通过高脂饮食成功建立了兔动脉粥样硬化模型, 也证实脂质代谢异常是 As 形成的重要因素。本研究中, 西洛他唑

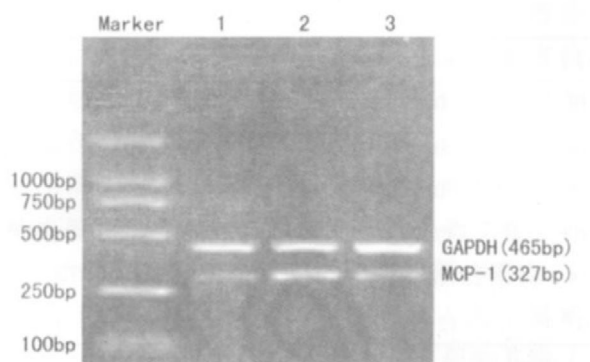


图4 主动脉 MCP-1 mRNA 的表达 1为正常对照组, 2为高脂饮食组, 3为西洛他唑组。

组 NF- κ B、MCP-1 和 MMP-9 的表达较高脂饮食组明显降低, 且病理形态学也表明西洛他唑组主动脉病变部位的内膜和平滑肌增生较轻, 说明西洛他唑有明显抗 A s 作用。

MMP-9 是一种含锌离子的蛋白酶, 能降解胶原纤维和弹性纤维, 减少纤维帽中细胞外基质成分, 使斑块组织脆性增加^[6, 7]。此外 MMP-9 促进平滑肌细胞的迁移和增殖。研究表明 MMP-9 基因敲除鼠能明显抑制平滑肌细胞的迁移和增殖及继发的内膜增生和管腔丢失^[7]。Morishige 等^[8]研究表明在猪冠状动脉球囊损伤术后 MMP-9 的高表达通过释放基质结合组织因子而导致血栓形成。研究发现, 在斑块进展期 MMP-9 的过表达能促进斑块内出血^[9]。这些说明 MMP-9 在动脉斑块中扮演着重要角色。MCP-1 作为一种特异性单核细胞趋化因子, 通过与单核细胞表面的趋化因子受体 2 的结合使血液中的单核细胞迁入血管内膜下, 并活化巨噬细胞, 摄取已进入内膜并发生修饰的脂蛋白形成单核细胞源泡沫细胞, 促使动脉粥样硬化形成, 在动脉粥样硬化早期起重要作用^[10]。NF- κ B 是调控 MCP-1 表达的关键因子, NF- κ B 活性增强可引起 MCP-1 表达增高, 进而巨噬细胞被活化, MMP-9 表达增加。CRP 是炎症的标志, 西洛他唑能显著降低 CRP 水平及 NF- κ B 的表达, 有明显的抗炎作用。其抗炎作用可能与西洛他唑增加细胞内 cAMP 水平, 进而抑制 MAPK 活

化及 NF- κ B 信号传导途径有关^[11]。

因此西洛他唑可能通过降低 NF- κ B 活性, 抑制 MCP-1 和 MMP-9 表达, 减轻平滑肌细胞的增殖和迁移, 从而防止内膜增厚, 减轻管腔狭窄; 另一方面通过降低 MMP-9 表达可减少细胞外基质成分的降解, 有防止斑块破裂、稳定斑块的作用。本研究还发现西洛他唑有明显降血脂作用, 与文献^[12]报道一致, 但具体机制尚不清楚。因而西洛他唑可能通过多个途径发挥抗动脉粥样硬化作用, 其用于防治动脉硬化具有广阔前景。

[参考文献]

- [1] 李建军, 李庚山, 黄从新. 球囊损伤兔主动脉后核因子 κ B 活性的动态变化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (1): 34-36
- [2] 胡厚源, 陈运贞. 单核细胞趋化蛋白 1 对其表面淋巴细胞功能相关抗原 1 清道夫受体和载脂蛋白 E 表达的影响及雌二醇的干预作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (4): 322-326
- [3] Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury [J]. *Circ Res* 2002, 91: 845-851
- [4] Douglas JS Jr, Holmes DR Jr, Kereiakes DJ, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol [J]. *Circulation*, 2005, 112 (18): 2826-2832
- [5] Uno T, Tanaka H, Nagai H. Effects of isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors on bacterial lipopolysaccharide-induced bronchial hyperreactivity in guinea pigs [J]. *Gen Pharmacol*, 1998, 30 (2): 167-173
- [6] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions [J]. *Ann NY Acad Sci* 1995, 748: 501-507
- [7] Shah PK. Role of inflammation and metalloproteinases in plaque disruption and thrombosis [J]. *Vasc Med*, 1998, 3: 199-206
- [8] Morishige K, Shinokawa H, Matsumoto Y, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries in vivo [J]. *Cardiovasc Res* 2003, 57: 572-585
- [9] De Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thüsen JH, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26 (2): 340-346
- [10] Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis* 1999, 147 (2): 213-225
- [11] Iwanoto M, Osajima A, Tanura M, et al. Adrenomedullin inhibits pressure-induced mesangial MCP-1 expression through activation of protein kinase A [J]. *J Nephrol* 2003, 16: 673-681
- [12] Mochizuki Y, Oishi M, Mizutani T. Effects of cilostazol on cerebral blood flow, P300 and serum lipid levels in the chronic stage of cerebral infarction [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2001, 10 (2): 63-69

(此文编辑 文玉珊)