

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0113-04

• 实验研究 •

阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔肿瘤坏死因子 α 和组织因子水平的影响

吴旭斌^{1,2}, 周胜华¹, 伍广伟², 刘启明¹, 吴隐雄², 邓金龙²

(1. 中南大学湘雅二院心血管内科, 湖南省长沙市 410011;

2. 广西壮族自治区人民医院心内科, 广西南宁市 530021)

[关键词] 阿托伐他汀; 肿瘤坏死因子 α ; 组织因子; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔血浆和外周血单核细胞表达肿瘤坏死因子 α 和组织因子水平的影响。方法 采用高胆固醇饮食法建立动脉粥样硬化兔模型 ($n=12$), 随机给予阿托伐他汀或淀粉 4 周, 同时 6 只兔以普通饲料喂养。12 周后, 取各组兔主动脉测定斑块内膜面积, 分离外周血单核细胞培养 24 h, 采用酶联免疫吸附法检测血浆和细胞培养上清液中肿瘤坏死因子 α 及细胞膜组织因子水平。结果 阿托伐他汀能降低主动脉斑块面积百分数、血浆和外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 及组织因子水平 (均 $P<0.01$); 主动脉斑块面积百分数、血浆及外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 和组织因子水平两两之间呈正相关 (均 $P<0.01$)。结论 阿托伐他汀在降低胆固醇同时, 还可通过降低肿瘤坏死因子 α 和组织因子水平发挥抗动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Tumor Necrosis Factor- α and Tissue Factor in Atherosclerotic Rabbits

WU Xu-Bin^{1,2}, ZHOU Sheng-Hua¹, WU Guang-Wei², LIU Qi-Ming¹, WU Yin-Xiong², and DENG Jin-Long²

(1. Department of Cardiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Cardiology, the People's Hospital of Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Tumor Necrosis Factor- α ; Tissue Factor; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of atorvastatin in vivo on tissue factor (TF), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in peripheral blood monocytes and plasma from atherosclerotic rabbits. **Methods** Eighteen male New Zealand rabbits were randomly divided into normal diet group ($n=6$), high-cholesterol diet group (1% cholesterol diet, $n=12$). After 8 weeks, hypercholesterolemic rabbits were randomly fed with starch ($n=6$, starch group) or atorvastatin ($n=6$, atorvastatin group). Four weeks later, all rabbits were killed, aortas were removed under deep anesthesia, and monocytes were isolated from peripheral blood monocytes from these rabbits, then cultured for up to 24 hours. TF and TNF- α antigens in culture medium, cells and plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Atherosclerotic lesions were measured by experienced pathologist under Behring Pathology Imaging Analysis System in aortas from atherosclerotic rabbits. **Results** Compared with normal diet group, levels of TF ($P<0.01$) and TNF- α ($P<0.01$) were elevated in the plasma, peripheral blood monocytes and its culture medium from high-cholesterol diet groups. The levels of TF and TNF- α in peripheral blood monocytes and plasma from atherosclerotic rabbits, and the area of atherosclerotic lesions were reduced in atorvastatin treated groups (all $P<0.01$). The area of atherosclerotic lesions were significantly associated with the concentrations of TF and TNF- α ($P<0.01$), respectively. **Conclusions** Atorvastatin in vivo reduced TF and TNF- α levels in plasma and peripheral blood monocytes from atherosclerotic rabbits, and thus contribute to their antiatherosclerotic effect. Circulating monocyte/macrophages are a major original source of plasma TF and TNF- α .

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种慢性炎症疾病, 炎症贯穿 As 的始终。组织因子 (tissue factor, TF) 除了有促进血栓形成作用外, 还可作为细

胞膜受体, 介导平滑肌细胞迁移和增殖, 促进 As 发展。研究表明, 他汀类对 As 作用呈多效性, 除了降脂作用外, 还有抗炎、抑制平滑肌增生等作用。本研究旨在探讨阿托伐他汀体内干预对动脉粥样硬化兔血浆和外周血单核细胞表达炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和凝血因子 TF 的影响, 以丰富他汀类药物抗 As 理论机制。

[收稿日期] 2008-10-29

[修回日期] 2009-02-03

[作者简介] 吴旭斌, 博士, 主治医师, 主要从事介入心脏病学基础和临床研究. E-mail 为 xubinwu@hotmail.com. 通讯作者周胜华, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事介入心脏病学基础和临床研究。伍广伟, 主任医师, 主要从事介入心脏病学基础和临床研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

18只3月龄体重为2.0~2.5 kg的雄性新西兰大白兔由中南大学湘雅二医院医学动物实验中心提供,并由该中心提供饲养和观察场地。阿托伐他汀钙、胆固醇、干鸡蛋黄粉、戊巴比妥钠、淋巴细胞分离液和BCA法测定总蛋白浓度试剂盒,分别由北京红惠生物制药有限公司、北京鼎国生物技术有限责任公司、安徽亳州市众意蛋业有限责任公司、Sigma、Sigma和碧云天生物技术研究提供;酶联免疫吸附双抗体夹心法检测TF含量试剂盒和夹心法酶联免疫吸附测定TNF- α 含量试剂盒购自上海船夫生物科技有限公司。

1.2 早期动脉粥样硬化兔模型的建立和药物干预

18只兔单笼饲养观察1周后,随机选取12只兔予以高胆固醇饲料(含1%胆固醇、8%猪油和7.5%蛋黄粉的粗颗粒饲料^[1,2]),每日给予每只兔高胆固醇饲料120 g不足以普通兔饲料补充。单笼饲养,饮水不限。第9周开始随机加喂阿托伐他汀钙[5 mg/(kg·d)](阿托伐他汀组, $n=6$)或淀粉[5 mg/(kg·d)](淀粉组, $n=6$)4周。另6只予以普通饲料喂养12周(对照组, $n=6$)。

1.3 体重测量、采血及血脂测量

分别于高脂饲养前、高胆固醇饮食8周后及处死兔子前清晨测量兔体重,并从兔耳中动脉采血5 mL,2 mL用0.1 mol/L枸橼酸钠(1:9)抗凝,另2 mL加入普通的塑料管。分别2 000 r/min离心10 min,取上清液,EP管-20℃保存。抗凝血浆用于TF及TNF- α 的检测,未抗凝血浆用于测定血清总胆固醇(total cholesterol TC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol LDLC)含量。血脂测定送检验科测定,采用全自动生物化学分析仪,由专人质控。

1.4 动物处死、心脏取血和主动脉病理图像分析

所有试验兔均于试验结束当天处死。处死前12 h禁食,经耳缘静脉急速静脉注射戊巴比妥80 mg/kg麻醉。剪开胸壁,暴露心脏。用30 mL注射器穿刺左心室抽血20 mL,置入含有0.1 mol/L枸橼酸钠(1:9)的无菌50 mL离心管用作分离单核细胞(以上步骤均为无菌操作)。穿刺左心室,以4%多聚甲醛(22℃)经左心室灌注,同时剪开右心房,放血。直至心脏、血管内无血性液体流出后,仍继续以4%多聚甲醛冲洗以固定全身血管。逐层分离、离断心脏和全程主动脉,纵行剖开主动脉,苏丹Ⅳ染

色,由病理科医生采用北航病理图像分析系统进行动脉粥样硬化斑块面积测定。

1.5 单核细胞分离和培养

将上述心脏取血,采用Percoll密度梯度离心法分离收集外周血单个核细胞;进行细胞计数,用2%的苔盼蓝染色,计算活细胞数,活细胞数>95%;用含有10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基调整细胞浓度至 6×10^9 /L,移至6孔的细胞培养板,作4个复孔;置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育2 h,使单核细胞贴壁,然后除去非贴壁细胞,即可获得单核细胞。每孔加入完全培养基(含有10%的胎牛血清、青霉素100 ku/L和链霉素100 ku/L)2 mL,置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h,收集上清液,保存-70℃冰箱待测TNF- α 抗原;用PBS洗涤3次后每孔再加入150 μ L RIPA(含PMSF)裂解细胞约1 min,用细胞刮刮下贴壁的单核细胞,转移到0.5 mL的Eppendorf管内,4℃离心5 min,取上清液贮存于0.5 mL Eppendorf管内(测细胞膜总蛋白和TF),保存于-70℃冰箱。

1.6 血浆和单核细胞组织因子、肿瘤坏死因子 α 及单核细胞总蛋白水平测定

采用BCA法测定人单核细胞膜总蛋白浓度;采用酶联免疫吸附双抗体夹心法检测血浆及单核细胞TF含量;采用典型的夹心法酶联免疫吸附测定血浆及单核细胞TNF- α 含量。上述测定严格按说明书实验步骤操作。

1.7 统计学分析

采用SPSS19.0统计软件包进行统计学处理。所有资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本间均数比较采用ANOVA分析,方差齐时采用LSD方法进行两两比较,方差不齐时采用Tamhane's T2法。两指标间的相关分析采用Spearman分析。以双侧 $P < 0.05$ 为显著性检验标准。

2 结果

2.1 各组兔体重、血脂和血浆肿瘤坏死因子 α 及组织因子水平比较

各组兔在基线时体重、血脂和血浆TNF- α 、TF水平差异均无显著性($P > 0.05$)。与对照组比较,高胆固醇饮食8周后,淀粉组及阿托伐他汀组血清TC、LDLC、TNF- α 和TF均显著升高($P < 0.01$),且淀粉组及阿托伐他汀组血清TC、LDLC、TNF- α 和TF水平差异无显著性($P > 0.05$)。高胆固醇喂养12周后,与淀粉组比较,阿托伐他汀组血清TC、LDLC、

TNF-α 和 TF 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。各组兔的体重在实验过程中正常增长, 各组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。对照组血清 TC、LDLC、TNF-α 和 TF 水平在实验过程中均无明显变化 ($P > 0.05$)。可见, 健康的新西兰大白兔在进食高胆固醇饲料后, 发

生了高胆固醇血症, 而体重未受高胆固醇饮食影响; 高胆固醇血症经阿托伐他汀干预后, 血 TC、LDLC 及血浆 TNF-α、TF 水平明显降低, 而体重未见显著的变化 (表 1)。

表 1 各组兔体重、血脂和血浆肿瘤坏死因子 α、组织因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

指 标	对照组			淀粉组			阿托伐他汀组		
	0周	8周	12周	0周	8周	12周	0周	8周	12周
体重 (kg)	2.15 ± 0.13	2.94 ± 0.12	3.06 ± 0.09	2.08 ± 0.15	2.92 ± 0.11	3.12 ± 0.12	2.13 ± 0.65	2.88 ± 0.16	3.03 ± 0.12
TC (mmol/L)	1.60 ± 0.15	1.66 ± 0.13	1.69 ± 0.16	1.57 ± 0.21	25.38 ± 3.57 ^a	26.38 ± 3.32 ^a	1.71 ± 0.18	27.15 ± 3.22 ^a	13.94 ± 0.86 ^{ab}
LDLC (mmol/L)	0.59 ± 0.15	0.67 ± 0.12	0.73 ± 0.11	0.64 ± 0.17	14.13 ± 3.86 ^a	14.88 ± 3.81 ^a	0.74 ± 0.12	16.67 ± 2.50 ^a	7.76 ± 1.29 ^{ab}
TNF-α (ng/L)	386.8 ± 68.8	424.2 ± 64.1	431.9 ± 50.0	367.4 ± 59.6	3405.2 ± 442.6 ^a	3444.5 ± 372.0 ^a	369.7 ± 36.0	3720.8 ± 449.2 ^a	2184.4 ± 274.4 ^{ab}
TF (ng/L)	143.9 ± 36.8	142.8 ± 26.2	148.7 ± 20.2	131.0 ± 29.3	308.6 ± 51.8 ^a	322.7 ± 52.0 ^a	137.2 ± 24.5	315.9 ± 38.8 ^a	254.0 ± 40.7 ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与对照组同时期相比; b为 $P < 0.01$, 与淀粉组同时期相比。

2.2 兔外周血单核细胞总蛋白、肿瘤坏死因子 α 及组织因子水平

与对照组相比, 淀粉组、阿托伐他汀组兔外周血单核细胞分泌 TNF-α 及表达 TF 水平均显著升高 (均 $P < 0.01$); 与淀粉组相比, 阿托伐他汀组外周血单核细胞分泌 TNF-α 及表达 TF 水平均显著降低 (均 $P < 0.01$), 且各组间外周血单核细胞总蛋白差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 兔外周血单核细胞总蛋白、肿瘤坏死因子 α 及组织因子水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	TNF-α (ng/L)	TF (ng/L)	总蛋白 (mg/L)
对照组	108.95 ± 12.56	15.09 ± 1.73	1225.07 ± 172.57
淀粉组	343.41 ± 39.37 ^a	33.26 ± 5.13 ^a	1379.23 ± 270.91
阿托伐他汀组	223.30 ± 29.01 ^{ab}	24.94 ± 3.26 ^{ab}	1337.50 ± 393.06

a为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b为 $P < 0.01$, 与淀粉组相比。

2.3 各组兔主动脉病理变化

肉眼观, 对照组兔主动脉壁内膜光滑完整、无脂质条纹; 淀粉组兔主动脉内膜粗糙、布满脂质条纹、粥样斑块, 斑块多融合成片, 以主动脉近端为主; 阿托伐他汀组兔主动脉内膜脂质条纹、斑块较淀粉组明显减轻, 斑块呈散在分布 (图 1)。图像分析发现, 淀粉组兔主动脉斑块总面积及斑块/内膜总面积比显著高于对照组和阿托伐他汀组 ($P < 0.01$, 表 3)。

2.4 相关分析

兔主动脉粥样斑块面积百分数, 与血液 TC ($r = 0.92$)、LDLC ($r = 0.92$)、TNF-α ($r = 0.98$) 和 TF ($r = 0.92$) 显著正相关 (均 $P < 0.01$), 且与单核细胞 TNF-α ($r = 0.98$) 和 TF ($r = 0.95$) 水平显著正相关 (均 $P < 0.01$)。

兔血浆 TNF-α 水平, 与外周血单核细胞分泌 TNF-α ($r = 0.99$) 和 TF ($r = 0.96$) 表达水平显著正相关 (均 $P < 0.01$), 且与血液 TF ($r = 0.92$)、TC ($r = 0.89$)、LDLC ($r = 0.93$) 水平显著正相关 (均 $P < 0.01$)。

兔血浆 TF 水平, 与外周血单核细胞分泌 TNF-α ($r = 0.93$)、TF ($r = 0.98$) 表达水平以及血脂 TC ($r = 0.85$)、LDLC ($r = 0.85$) 水平呈显著正相关 (均 $P < 0.01$)。



图 1 主动脉粥样硬化病变情况 上、中、下分别为淀粉组、阿托伐他汀组和对照组。

表 3 各组兔主动脉图像分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	内膜总面积 (mm ²)	斑块总面积 (mm ²)	斑块/内膜面积
对照组	1728.6 ± 189.9	0	0
淀粉组	1834.0 ± 224.2	1494.2 ± 173.8	81.6% ± 6%
阿托伐他汀组	1709.5 ± 209.2	957.3 ± 196.6 ^a	55.6% ± 3% ^a

a为 $P < 0.01$, 与淀粉组相比。

3 讨论

本研究结果表明,高胆固醇喂养兔主动脉粥样斑块形成,血浆或单核细胞炎症因子 TNF- α 、凝血启动子 TF 水平升高,且斑块面积百分数与血脂 LDL-C、TC 和血浆或单核细胞炎症因子 TNF- α 、凝血启动子 TF 水平呈正相关,提示高胆固醇血症可诱发单核细胞表达炎症因子 TNF- α 及凝血启动子 TF,引起机体炎症反应及凝血瀑布的启动,导致 As 发生。与本研究结果类似,张大庆等^[3]观察到高脂血症可诱发兔血浆白细胞介素 6 水平及主动脉内膜单核细胞趋化蛋白 1 阳性细胞数增多等炎症反应,且血胆固醇水平与炎症程度、动脉硬化斑块面积成正比。这些都显示脂质、炎症及 TF 三者相互作用在 As 发病过程中起重要作用,其机制可能是高胆固醇血症可通过激活炎症细胞(如单核细胞)释放炎症因子 TNF- α 和凝血因子 TF,炎症因子又可促进细胞凝血因子 TF 的释放,引起血浆炎症因子和凝血因子升高,导致 As 及其并发症的发生。

另本研究结果还发现血浆中 TNF- α 和 TF 的水平与单核细胞表达 TNF- α 和 TF 的水平呈正相关,表明单核细胞是血浆 TNF- α 和 TF 的重要来源之一,特别是在高胆固醇血症的情况下。

本研究的结果还发现,阿托伐他汀干预可缩小兔主动脉粥样斑块面积百分数,降低单核细胞和血浆 TNF- α 和 TF 水平。这提示,阿托伐他汀可能通过调脂及降低单核细胞释放炎症因子 TNF- α 及凝血启动子 TF,打破高脂血症、炎症和凝血三者相互作用链,从而发挥防治 As 的发生、发展和恶化作用。与本研究结果相似,邓平等^[4]发现阿托伐他汀通过降低高胆固醇血症兔主动脉粥样斑块中环氧化酶 2

的表达,抑制基质金属蛋白酶 9 和白细胞介素 6 的分泌从而发挥降脂以外的抗炎症作用;Li 等^[5]发现阿托伐他汀降低高胆固醇血症兔血浆及脂肪细胞 TF 水平,且阿托伐他汀体外干预呈剂量依赖性抑制脂肪细胞表达和分泌 TF,并证实这种效果可被甲醛戊酸逆转;Zhao 等^[6]发现阿托伐他汀通过抑制脂肪细胞分泌 TNF- α 降低高胆固醇血症兔血清 TNF- α 水平。这些提示阿托伐他汀通过降脂、抗炎及抗 TF 等作用,从而在 As 的防治中起重要作用。

综上所述,高胆固醇血症可以诱发炎症和凝血异常,三者可能共同作用协同促进 As 的发生、发展和并发症的出现;动脉粥样硬化兔外周血单核细胞可能是血浆 TNF- α 和 TF 水平升高的重要来源之一;阿托伐他汀可通过调脂、降低外周血单核细胞和血浆 TNF- α 和 TF 的水平,发挥防治 As 及其并发症作用。

[参考文献]

- [1] Hong SC, Zhao SP, Liu Q, et al. Effect of the antioxidant probucol on soluble thrombomodulin (sTM) in hypercholesterolemia rabbits [J]. *Int J Cardiol* 2008; **123** (2): 180-182
- [2] Li JQ, Zhao SP, Li QZ, et al. A torvastatin reduces plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue of atherosclerotic rabbits [J]. *Clin Chim Acta* 2006; **370** (1-2): 57-62
- [3] 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
- [4] 邓平,赵水平,戴海鹰,等.阿托伐他汀对高胆固醇血症兔主动脉环氧化酶 2 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (2): 132-135
- [5] Li JQ, Zhao SP, Li QZ, et al. A torvastatin reduces tissue factor expression in adipose tissue of atherosclerotic rabbits [J]. *Int J Cardiol* 2007; **115** (2): 229-234
- [6] Zhao SP, Wu ZH, Wu J, et al. Effect of atorvastatin on tumor necrosis factor alpha serum concentration and mRNA expression of adipose in hypercholesterolemia rabbits [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; **46** (2): 185-189

(此文编辑 许雪梅)