

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-06-0444-05

氨氯地平对兔动脉粥样硬化及炎症因子 妊娠相关血浆蛋白 A 作用的影响

李璇, 陈良, 张梅, 李长江, 萧亚伟, 李晓楠, 徐新生, 蒋桂花

(教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室 山东大学齐鲁医院内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 动脉粥样硬化; 腹主动脉; 妊娠相关血浆蛋白 A; 高敏 C 反应蛋白; 超声检查; 氨氯地平

[摘要] 目的 观察氨氯地平对动脉粥样硬化炎症因子妊娠相关血浆蛋白 A 的作用。方法 20 只雄性新西兰大白兔应用球囊拉伤腹主动脉后高脂饲养 12 周, 然后随机分为氨氯地平组和对照组, 分别给予氨氯地平 5 mg/d 和溶媒对照治疗, 治疗 12 周后处死动物; 在实验开始, 12 周末和处死前耳缘静脉抽血检测高敏 C 反应蛋白和妊娠相关血浆蛋白 A 的水平, 同时应用高频超声检测腹主动脉; 处死动物后留取腹主动脉, 分别进行常规病理检查, 免疫组织化学染色检测妊娠相关血浆蛋白 A 的分布。结果 病理学和电镜结果显示, 与对照组比较氨氯地平组斑块明显减小、脂质含量降低、平滑肌纤维较多而胶原少; 超声检查也显示氨氯地平组内膜-中层厚度、收缩末期直径均明显减小 ($P < 0.01$), 而校正的内中膜回声强度明显增加 ($P < 0.01$)。氨氯地平还可以明显降低血清妊娠相关血浆蛋白 A 和高敏 C 反应蛋白的水平 ($P < 0.01$); 免疫组织化学显示氨氯地平组斑块局部妊娠相关血浆蛋白 A 的表达减少; 且血清妊娠相关血浆蛋白 A 的水平与高敏 C 反应蛋白和内膜-中层厚度相关 ($R^2 = 0.424$ 和 $R^2 = 0.339$)。结论 妊娠相关血浆蛋白 A 与动脉粥样硬化的严重程度密切相关, 氨氯地平可以抑制妊娠相关血浆蛋白 A, 从而延缓动脉粥样硬化的进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Amlodipine on Atherosclerosis and Inflammatory Marker Pregnancy-associated Plasma Protein-A in Rabbits

LI Xuan, CHEN Liang, ZHANG Mei, LI Chang-Jiang, XIAO Ya-Wei, LI Xiao-Nan, XU Xing-Sheng, and JIANG Gui-Hua

(Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Abdominal Aorta; Pregnancy-associated Plasma Protein-A; High Sensitive C-Reaction Protein; Ultrasound; Amlodipine

[ABSTRACT] Aim To observe the effect of amlodipine on pregnancy-associated plasma protein-A in atherosclerosis. Methods 20 male New Zealand rabbits were fed on a diet of 1% cholesterol for 12 weeks after they underwent balloon-induced abdominal aortic wall injury. At the end of the 12th week, they were divided into 2 groups at random. One group was given Amlodipine (5 mg/d) for 12 weeks, the other was control group. At the beginning of the experiment, the end of 12th week and 24th week, blood samples were collected to measure the concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A and high sensitive C-reaction protein; at the same time, abdominal aorta were examined by high frequency ultrasound. At the end of 24th week, abdominal aorta were processed and examined by pathological stain and immunohistochemical stain for pregnancy-associated plasma protein-A. Results Pathological results and electron microscope showed that compared with control group, the plaque area and Lipid deposition of amlodipine group reduced, smooth muscle cells increased and collagen minished. Ultrasound measurements also showed that intima-media thickness and end systolic diameter were significantly decreased ($P < 0.01$) and corrected intima-media echo intensity was increased ($P < 0.01$) in amlodipine group. Amlodipine also decreased pregnancy-associated plasma protein-A and high sensitive C-reaction protein in blood ($P < 0.01$) and pregnancy-associated plasma protein-A expression in atherosclerotic plaque with immunohistochemical stain. Pregnancy-associated plasma protein-A had a close relationship with high sensitive C-reaction protein and intima-media thickness ($R^2 = 0.424$ and $R^2 = 0.339$). Conclusion Pregnancy-associated plasma protein-A is associated with severity of atherosclerosis. Amlodipine can regress atherosclerosis by inhibiting pregnancy-associated plasma protein-A.

[收稿日期] 2008-10-08

[修回日期] 2009-04-10

[作者简介] 李璇, 硕士研究生, 主要研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床, E-mail 为 zhenglongkuaile@163.com。陈良, 博士研究生, 主要研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床。通讯作者张梅, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床, 联系电话为 0531-82169339, E-mail 为 daixh@vip.sina.com。

目前认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症过程^[1],炎症因子如高敏 C 反应蛋白(high sensitive C-reaction protein, hsC-RP)、妊娠相关血浆蛋白 A (pregnancy-associated plasma protein-A, PAPP-A)、细胞黏附分子等在 As 的发生发展中扮演重要角色。研究表明,氨氯地平具有消退 As 斑块的作用^[2,3],但具体机制尚未完全明了。本研究在新西兰大白兔动脉粥样硬化模型中给予氨氯地平治疗,观察其对 PAPP-A 的作用,进一步探讨氨氯地平抗 As 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性纯种新西兰大白兔 20 只,体重 1.5~2.0 kg(1.72 ± 0.12 kg),由山东省农业科学院提供。胆固醇(熔点 147℃~148.1℃,批号 20050219,河南平顶山市东珠生物制品有限公司),氨氯地平(批号 050412018,东瑞制药公司)。

1.2 动脉粥样硬化兔模型的建立及分组

20 只雄性纯种新西兰大白兔经球囊拉伤损伤腹主动脉后,用 1% 高胆固醇饲料喂养 12 周。12 周末同时改用普通饲料喂养并随机分为两组:氨氯地平组每只给予氨氯地平 5 mg/d;对照组给予溶媒对照。各组通过灌胃给予药物。药物治疗 12 周后处死实验兔。

腹主动脉球囊拉伤的方法^[4,5]:应用 30 mg/kg 戊巴比妥钠经兔耳缘静脉注射麻醉后,解剖右侧股动脉,直视穿刺鞘管后,沿导丝将球囊导管由股动脉送入腹主动脉,充盈球囊,然后回拉球囊导管至髂总动脉,反复回拉 3 次损伤腹主动脉内皮。退出球囊导管后结扎股动脉,局部和肌肉抗生素预防感染。

1.3 血清妊娠相关血浆蛋白 A 和高敏 C 反应蛋白的检测

应用 ELISA 法测定血清 PAPP-A 和 hsC-RP 的水平。实验兔分别于实验开始前、12 周末、24 周末禁食 12 h 以上,测量体重后,经耳缘静脉抽取空腹血,留取自凝血清,根据 PAPP-A ELISA 试剂盒(编号 DSL-10-27100,美国 DSL 公司)和 hsC-RP ELISA 试剂盒(编号 1930,美国 BPB 公司)说明,测定血清 PAPP-A 和 hsC-RP 的水平。

1.4 腹主动脉高频超声检测

实验兔分别于实验开始前、12 周末、24 周末进行 3 次腹主动脉体表超声检查。应用荷兰飞利浦公司 HP Sonos 7500 型超声显像仪,测量腹主动脉后壁

内膜-中层厚度(intima-media thickness, IMT)、腹主动脉收缩末期内径(Ds, mm)、腹主动脉收缩期峰值速度(Vp, cm/s)。然后调整仪器进入 AD-IBS 状态,调整感兴趣区(ROS)形状、方向和大小,分别置于腹主动脉内中膜和外膜,连续 2.48 s 测量,每个部位共获取 62 帧图像。仪器可以自动计算平均回声强度(AII, 单位 dB)。为了消除测量时所受仪器和腹壁条件的影响,本研究中将内中膜平均回声强度(AII-I)与外膜平均回声强度(AII-A)的比值 AIIc% 作为内中膜校正的 AD 值。

1.5 常规病理检查

24 周末,过量麻醉处死实验兔。截取髂总动脉分叉上 2~3 cm 腹主动脉斑块处血管段,4% 的福尔马林浸泡固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,包埋,应用 LEICA RM2243 型石蜡切片机(德国 Leica 公司)常规切片,切片厚度 5 μ m,固定于明胶处理的载玻片上。应用 LEICA AUTOSTAINER XL 型自动染色机(德国 Leica 公司)进行 HE 染色,中性树胶封片。油红 O 染色观察脂质含量,油红 O 0.5 g 溶解于 100 mL 98% 的异丙醇中,取上清液 6 mL,加蒸馏水 4 mL,静放 10 min 过滤备用,冰冻切片浸入备用的油红 O 液 10 min,水洗 30 s, Harris 苏木素 3 min,水洗 30 s, 1% 盐酸酒精分化 10 s,然后流水洗 5 min,吸干多余水分后甘油明胶封片。masson 染色观察胶原纤维,石蜡切片常规脱蜡至水, masson 复合染液 5 min, 0.2% 醋酸水溶液稍洗, 1% 磷钨酸 5~10 min, 0.2% 醋酸水溶液洗 2 次,亮绿染液 10 s, 0.2% 醋酸水溶液洗 2 次,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.6 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水并水化,用 3% H_2O_2 10 min 阻断内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 遍,浸入枸橼酸缓冲液,微波加热至 92℃~98℃, 15 min, PBS 洗 3 遍。5% 正常山羊血清封闭,室温温育 20 min 后,甩去血清,滴加 1 mg/L 的 PAPP-A 单克隆抗体(美国 DSL 公司), 4℃ 冰箱过夜, PBS 洗 3 遍,滴加浓度为 1:100 HRP 标记的二抗,室温温育 1 h, PBS 洗 3 遍。滴加 DAB 显色,镜下控制显色时间,苏木素复染,盐酸酒精分化后脱水、透明、中性甘油明胶封片。

1.7 电镜观察

应用电镜观察内皮细胞及平滑肌细胞的形态和完整性,观察胞浆内有无脂肪空泡,观察线粒体、高尔基体、内质网及胞核的形态。

1.8 统计学方法

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 t 检

验,治疗前后用配对 *t* 检验,相关关系采用直线回归相关分析。显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

20 只新西兰大白兔经过球囊拉伤以及高脂饮食 12 周后,共有 5 只动物意外死亡。有 15 只新西兰大白兔进入药物干预阶段,氨氯地平组 8 只,对照组 7 只。

2.1 血清学检测结果

造模后 PAPP-A 和 hsC-RP 的水平均比造模前显著增加($P < 0.01$);与对照组比较,氨氯地平可以明显降低血清 PAPP-A 和 hsC-RP 的水平($P < 0.01$;表 1)。

2.2 超声检查结果

造模后体表超声检查各个指标均比造模前增

加,其中 A II c% 减小($P < 0.01$);与对照组比较,氨氯地平组 IMT、Ds 均明显降低($P < 0.01$),Vp 亦降低($P < 0.05$),A II c% 明显增加($P < 0.01$,表 2)。

2.3 病理检测及电镜结果

HE 染色可见氨氯地平组较对照组斑块明显减小。油红 O 染色显示氨氯地平组斑块内脂质含量明显减少。masson 染色显示红色为平滑肌纤维,绿色为胶原纤维,对照组平滑肌纤维较少而胶原纤维较多,氨氯地平组平滑肌纤维多而胶原少。PAPP-A 免疫组织化学染色可见 PAPP-A 在内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞均有分布,对照组着色较深,说明其斑块部位表达 PAPP-A 较多,而氨氯地平组着色较浅,即 PAPP-A 表达降低(图 1)。电镜观察也可见对照组胞浆内有大量脂质蓄积,而氨氯地平组平滑肌细胞形态正常,胞浆内无脂质蓄积(图 2)。

表 1. 氨氯地平对血清炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$)

指 标	造模前($n=20$)	造模后($n=15$)	对照组($n=7$)	氨氯地平组($n=8$)
PAPP-A(IU/L)	1.67 \pm 0.76	10.57 \pm 2.45 ^a	4.70 \pm 1.32 ^b	1.96 \pm 0.81 ^{bc}
hsC-RP(μ g/L)	116.61 \pm 18.14	168.71 \pm 20.83 ^a	151.15 \pm 9.75	117.00 \pm 14.24 ^{bc}

a 为 $P < 0.01$,与造模前比较; b 为 $P < 0.01$,与造模后比较; c 为 $P < 0.01$,与对照组比较。

表 2. 氨氯地平对腹主动脉超声指标的影响($\bar{x} \pm s$)

指 标	造模前($n=20$)	造模后($n=15$)	对照组($n=7$)	氨氯地平组($n=8$)
IMT(mm)	0.32 \pm 0.06	0.97 \pm 0.11 ^a	0.87 \pm 0.01	0.54 \pm 0.16 ^{bd}
Ds(mm)	2.89 \pm 0.26	4.30 \pm 0.28 ^a	4.66 \pm 0.15	3.66 \pm 0.62 ^{bd}
Vp(cm/s)	80.9 \pm 9.6	125.6 \pm 28.9 ^a	108.9 \pm 7.2 ^b	101.5 \pm 7.2 ^{bc}
A II c	0.78% \pm 0.05%	0.63% \pm 0.06% ^a	0.57% \pm 0.06%	0.68% \pm 0.05% ^d

a 为 $P < 0.01$,与造模前比较; b 为 $P < 0.01$,与造模后比较; c 为 $P < 0.01$,d 为 $P < 0.01$,与对照组比较。

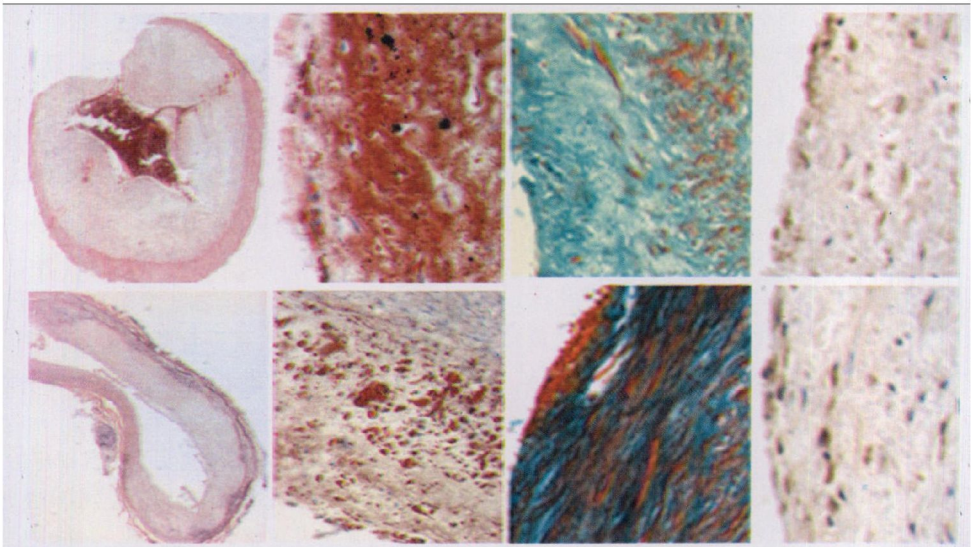


图 1. 两组腹主动脉病理染色图 上图为对照组,下图为氨氯地平组;从左到右依次为 HE 染色($\times 20$),油红 O 染色($\times 200$),masson 染色($\times 50$),妊娠相关血浆蛋白 A 免疫组织化学染色($\times 200$)

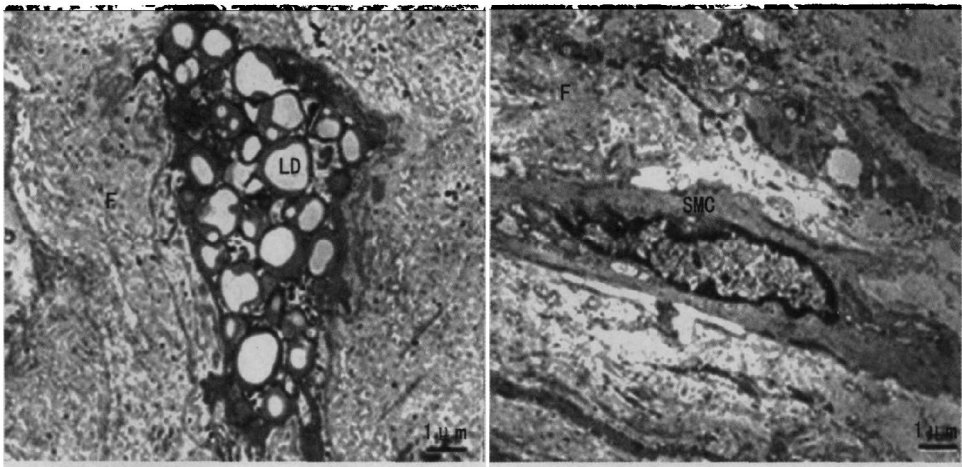


图 2. 两组腹主动脉斑块内细胞电镜图 左侧为对照组,右侧为氨氯地平组;图中 F 为胶原纤维和弹性纤维,LD 为脂质颗粒,SMC 为平滑肌细胞。

2.4 妊娠相关血浆蛋白 A 与其它指标的相关分析

直线相关回归分析血清 PAPP-A 与其它指标的相关性,PAPP-A 与 hsC-RP、IMT 显著相关, R^2 分别为 0.424 和 0.339 ($P < 0.01$;图 3 和图 4)。

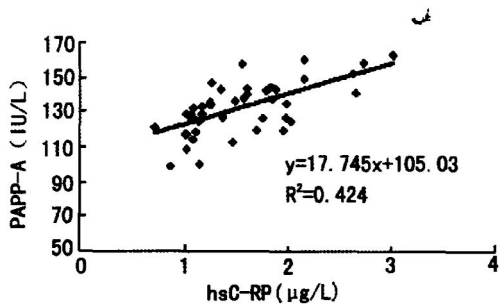


图 3. 妊娠相关血浆蛋白 A 与高敏 C 反应蛋白的相关性分析

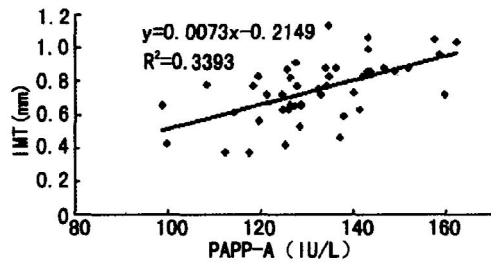


图 4. 妊娠相关血浆蛋白 A 与内膜-中层厚度的相关性分析

3 讨论

PAPP-A 对 As 的发生发展起着重要作用。PAPP-A 是一种锌结合的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP),主要通过作用于胰岛素样生长因子轴^[6] (insulin-like growth factor axis, IGF Axis)而发挥生物学作用。PAPP-A 可特异性地降解胰岛素样生长因子结合蛋白-4 (insulin-like growth factor-binding protein-4, IGFBPs-4),使之丧失结合 IGF-1 的能力^[7,8],释出游离的 IGF-1、IGF-2,从而启动 IGF-1 的一系列生物学效应,即促使平滑肌细胞增殖、炎性细胞释放、泡沫细胞增加及新生血管形成。Harrington 等^[9]通过将 PAPP-A 基因敲除的小鼠与 ApoE 基因敲除的小鼠杂交发现,两种基因双敲的小鼠比单纯 ApoE 敲除的小鼠斑块面积减少了 60% ~ 80%,且斑块局部 PAPP-A、IGFBP-4、IGF-1 及 IGF-1 受体的水平均明显降低,证明 PAPP-A 通过增加局部 IGF-1 的生物利用度来促进 As 的形成。

氨氯地平属于钙通道阻滞剂,是临床常用的抗高血压药物之一。而新近的研究发现,氨氯地平具有独立于抗高血压以外的抗 As 作用。Trion 等^[3]研究证实,在没有明显血压降低的情况下氨氯地平使 APOE * 3-Leiden/hCRP 转基因鼠的斑块面积减少了 43%。CAMELOT 试验及其亚试验的结果也显示,在有明确冠状动脉病变而血压正常的患者,氨氯地平可延缓 As 病变的进展,显著减少不良心血管事件^[10]。但氨氯地平作用于 As 的具体机制尚不清楚,可能是由于它的抗炎和抗氧化应激作用^[2,11,12]。

本实验通过体表超声检查发现氨氯地平可明显

降低 IMT, 升高 A II c%, 病理学结果也显示斑块面积明显减小, 斑块内脂质及其它成分亦减少, 证明了其抗 As 的作用。同时血清学和免疫组织化学显示循环和局部 PAPP-A 的水平也相应降低, 提示氨氯地平的抗 As 作用可能是通过抑制 PAPP-A 实现的。

本实验还发现 PAPP-A 与 hsC-RP 和 IMT 密切相关, 表明 PAPP-A 与 As 的炎症活动以及 As 的严重程度相关。hsC-RP 是已经确定的与 As 相关的炎症因子^[13]。Beaudeux 等^[14]发现, 存在颈动脉斑块而无症状的高脂血症患者, 其循环 PAPP-A 水平与 CRP 水平显著相关, 与颈动脉 IMT 无关。而 Cosin-Sales 等^[15]则发现稳定型心绞痛患者的 PAPP-A 与冠状动脉造影所见的复合斑块病变程度呈正相关。Bayes-Genis 等^[7]的研究也表明 PAPP-A 与 CRP 有一定相关性, 而与 cTnI 和 CK-MB 无关, 提示 PAPP-A 不是心肌坏死的标志物, 而是炎症相关的反应物。

本实验结果证明, PAPP-A 可以作为 As 炎症活动的标志物之一。氨氯地平可能通过抑制 PAPP-A 来延缓 As 的进展, 但具体机制仍待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.
- [2] Yoshii T, Iwai M, Li Z, et al. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions [J]. *Hypertens Res*, 2006, 29 (6): 457-466.
- [3] Trion A, de Maat M, Jukema W, et al. Anti-atherosclerotic effect of amlodipine, alone and in combination with atorvastatin, in APOE * 3-Leiden/hCRP transgenic mice [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47 (1): 89-95.
- [4] Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures [J]. *Arch Pathol*, 1961, 72 (8): 197-208.
- [5] 陈文强, 张运, 张梅, 等. 外源性人野生型 p53 基因转染导致兔动脉硬化斑块的不稳定性 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84 (1): 43-47.
- [6] Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis [J]. *Circ Res*, 2000, 86 (2): 125-130.
- [7] Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA, et al. Insulin like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increase in the coronary artery after angioplasty [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (3): 335-341.
- [8] Conover CA, Oxvig C, Overgaard MT, et al. Evidence that the insulin like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy-associated plasma protein-A [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84 (10): 4 742-745.
- [9] Harrington SC, Simari RD, Conover CA. Genetic deletion of pregnancy-associated plasma protein-A is associated with resistance to atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice challenged with a high-fat diet [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (12): 1 696-702.
- [10] 胡大一. 氨氯地平降压抗冠状动脉粥样硬化的新证据 [J]. *高血压杂志*, 2005, 13 (5): 259-260.
- [11] 刘海宁, 张兴华, 耿庆信. 拉西地平、氨氯地平对人脐静脉内皮细胞间粘附分子 1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (5): 575-578.
- [12] 徐丽梅, 涂玉林, 王北冰, 等. 氨氯地平对人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15 (7): 561.
- [13] 陈学军. C 反应蛋白与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (4): 355-357.
- [14] Beaudeux JL, Burc L, Imbert-Bismut F, et al. Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (1): e7-10.
- [15] Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminaki P, et al. Pregnancy-associated plasma protein a and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris [J]. *Circulation*, 2004, 109 (14): 1 724-728.

(此文编辑 李小玲)