

# 氯沙坦对兔动脉粥样硬化炎症因子的影响

于丽娜<sup>1</sup>, 徐延敏<sup>1</sup>, 赵辉<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学第二医院心脏科, 天津市 300211; 2. 天津市天和医院心内科, 天津市 300050)

[关键词] 动脉粥样硬化; 血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ ; 氯沙坦; C反应蛋白; 白细胞介素 6

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 受体拮抗剂氯沙坦对兔动脉粥样硬化的影响及机制。方法 32只新西兰大白兔适应性喂养 1周后随机分为正常对照组、高脂组和氯沙坦组, 观察各组药物干预前后体重、血脂、血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 及炎症指标的变化。结果 动脉粥样硬化模型建立后, 高脂组和氯沙坦组血脂、白细胞介素 6 及 C反应蛋白水平高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 但高脂组和氯沙坦组之间无统计学差异。药物干预 8周后, 氯沙坦组白细胞介素 6 和 C反应蛋白水平低于高脂组 ( $P < 0.05$ ), 但氯沙坦组和高脂组血脂、白细胞介素 6 和 C反应蛋白水平高于正常对照组, 氯沙坦组与高脂组之间血脂水平无统计学差异。氯沙坦组和高脂组内膜/中膜厚度比值较正常对照组增大, 氯沙坦组内膜/中膜厚度比值较高脂组减小 ( $P < 0.05$ )。氯沙坦组和高脂组血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 水平较正常对照组增高 ( $P < 0.05$ ), 但高脂组与氯沙坦组之间无统计学差异。结论 氯沙坦具有抗动脉粥样硬化作用, 该作用与脂质代谢无关, 与抑制动脉粥样硬化过程中的炎症反应密切相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Losartan on Inflammatory Factors in Atherosclerotic Rabbits

YU LiNa, XU YanMin, and ZHAO Hui

(Department of Cardiology, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis, Angiotensin $\text{Ang}^{\text{II}}$ , Losartan, C-Reactive Protein, Interleukin-6

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of losartan on atherosclerosis in rabbits. **Methods**

32 New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: control group, high-cholesterol group and losartan group. The level of weights, lipids and inflammatory factors, such as interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) were detected before the losartan intervention and two months after the losartan intervention respectively. The content of angiotensin $\text{Ang}^{\text{II}}$  was detected on later stage of the experiment. Pathological examination was performed on the ratio of intima thickness to media thickness of the iliac arteries. **Results** After the atherosclerosis model was set up, the serum lipids and CRP, IL-6 of rabbits in high-cholesterol group and losartan group rised significantly compared to the control group, but there was no statistical difference between two groups. After the losartan intervention, serum CRP, IL-6 were higher in high-cholesterol group and losartan group compared to the control group, but lower in losartan group. Serum lipids of rabbits in high-cholesterol group and losartan group also rised significantly compared to the control group, but there was no statistical difference between them either. The ratio of intima thickness to media thickness were higher in high-cholesterol group and losartan group compared to the control group ( $P < 0.05$ ), but the ratio in losartan group was lower than high-cholesterol group. Angiotensin $\text{Ang}^{\text{II}}$  was higher in high-cholesterol group and losartan group compared to the control group. But there was no statistical difference between them. **Conclusion** Losartan can prevent the development of atherosclerosis due to its action of inhibiting inflammation and the effect of losartan on atherosclerosis may not be related to the lipid metabolism.

动脉粥样硬化 (As) 是进展性炎症疾病。肾素-血管紧张素系统参与 As 的发生发展过程, 血管紧张素 $\text{Ang}^{\text{II}}$ 与 As 炎症机制的关系日益受到人们重视,  $\text{Ang}^{\text{II}}$ 可以诱导多种炎症因子的表达, 促进平滑肌细胞增殖, 参与 As 发生和发展过程<sup>[1, 2]</sup>。已经

证实降血脂可以减轻炎症反应, AT1受体拮抗剂在稳定斑块的炎症反应过程中是否有直接作用或这种作用是否被降脂治疗所掩盖尚不清楚。本研究旨在探讨 AT1受体拮抗剂氯沙坦是否可通过阻断  $\text{Ang}^{\text{II}}$ 的一系列生物活性, 从多个方面、多个角度发挥抗 As 作用。

[收稿日期] 2010-05-05 [修回日期] 2010-06-08

[作者简介] 于丽娜, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病基础与临床, Email为 vuvuakuaile1983@163.com。徐延敏, 博士, 教授, 研究方向为心脏电生理和心脏介入治疗, Email为 xuyaminPhD@yahoo.com.cn。赵辉, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病基础与临床。

## 1 材料和方法

### 1.1 分组

健康纯种新西兰大白兔 32只, 雌雄不限, 体重

1.5~2.1 kg 月龄 3~4 个月。室温保持在 15℃~20℃, 自由饮水, 普通饲料适应性喂养一周, 排除饮食异常者, 稳定血脂水平和代谢状况。之后称重并随机分为三组: 正常对照组 ( $n=10$ ) 每只动物喂食普通饲料 100 g/d 早晚各 50 g 高脂组 ( $n=9$ ) 每只动物喂食高脂饲料 (1% 胆固醇 + 5% 猪油 + 10% 蛋黄粉 + 84% 普通饲料) 100 g/d 早晚各 50 g 氯沙坦组 ( $n=10$ ) 喂食同高脂饮食组。高脂组和氯沙坦组进行右髂动脉球囊剥脱术, 正常对照组同时进行假手术。4 周末称重, 抽取耳缘静脉血测定血脂水平及血清炎症指标, 氯沙坦组在高脂饮食的同时加用氯沙坦钾片 (科素亚) 25 mg/(kg·d) 口服, 继续喂养 8 周。12 周末称重, 抽取耳缘静脉血再次测定血脂水平和血清炎症指标。将动物处死, 取髂动脉硬化斑块明显处的血管组织置于 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定 24 h 留做病理检测, 剩余的血管段制成组织匀浆, -70℃ 冻存备用。

## 1.2 髂动脉球囊剥脱术

以 3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉 (0.5~1 mL/kg), 固定台固定, 四肢展开, 暴露右侧股动脉区, 剪毛备皮, 常规消毒铺巾, 局部 1% 利多卡因皮下麻醉, 沿股动脉走行做纵形切口, 分离股动脉约 3~4 cm, 穿入 2 根丝线, 结扎动脉远心端, 近心端用动脉夹夹闭。以动脉穿刺针穿刺血管后送入 0.014 英寸导丝, 插入球囊, 深度 15~20 cm, 向球囊内注入生理盐水, 维持压力 8~12 个大气压, 缓慢回拉球囊至切口处回抽球囊内液体维持负压, 再将导管送至原处, 重复上述过程 3 次。退出球囊和导丝, 结扎动脉。生理盐水清除术野, 安尔碘清洗, 伤口局部用庆大霉素预防感染, 逐层缝合筋膜及皮肤, 无菌敷料包扎。假手术不插入球囊, 余步骤同上。

## 1.3 血脂、炎症指标及血管紧张素 II 含量检测

三组家兔喂养 4 周后, 于耳缘静脉采集静脉血 4 mL; 药物干预 8 周后, 即处死前, 再次于耳缘静脉采集静脉血 4 mL。血样静置 30 min 以 3500~4000 r/min 离心, 取上层血清分装, -70℃ 冻存。采用酶法测定血脂, 由 Selectra-E 全自动生化仪进行检测。采用 ELISA 法测定白细胞介素 6 (IL-6) 和 C 反应蛋白 (CRP)。室温复融组织匀浆, 用放射免疫法检测血管组织 Ang II 含量。

## 1.4 内膜中膜厚度检测

取髂动脉, 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定, 脱水, 石蜡包埋后切片, HE 染色, 显微镜下观察血管内膜。每个标本随机选取 3 个低倍镜视野, 用鼠

标准准确勾勒管腔、斑块、内弹力层、外膜轮廓, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统分别测量内膜与中膜厚度, 取其均值, 并计算两者的比值。

## 1.5 统计学方法

所有资料处理使用 SPSS13.0 统计软件包。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 同一受试对象处理前后的比较采用配对  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氯沙坦对血脂水平的影响

高脂喂养 4 周、12 周时, 高脂组和氯沙坦组血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 水平明显高于同时期正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 但高脂组与氯沙坦组之间无统计学差异。正常对照组整个实验中血脂无明显变化, 而高脂组和氯沙坦组 12 周时 TG、TC 及 LDLC 水平较 4 周时升高 ( $P < 0.05$  表 1)。

表 1 各组不同时期血脂水平 ( $\bar{x} \pm s$  mmol/L)

时间	正常对照组 ( $n=10$ )	高脂组 ( $n=9$ )	氯沙坦组 ( $n=10$ )
4 周			
TG	0.82 ± 0.20	12.89 ± 8.35 <sup>a</sup>	12.88 ± 9.58 <sup>a</sup>
TC	1.77 ± 0.62	51.98 ± 15.84 <sup>a</sup>	45.23 ± 15.80 <sup>a</sup>
LDLC	1.02 ± 0.60	22.56 ± 6.92 <sup>a</sup>	19.61 ± 5.95 <sup>a</sup>
12 周			
TG	0.85 ± 0.27	27.72 ± 18.44 <sup>ab</sup>	24.88 ± 15.07 <sup>ab</sup>
TC	1.70 ± 0.64	69.81 ± 18.24 <sup>ab</sup>	67.84 ± 13.72 <sup>ab</sup>
LDLC	1.04 ± 0.60	29.59 ± 7.87 <sup>ab</sup>	29.84 ± 7.56 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$  同组内与 4 周时比较。

### 2.2 氯沙坦对白细胞介素 6 和 C 反应蛋白的影响

高脂喂养 4 周时, 高脂组和氯沙坦组血清 CRP 和 IL-6 水平高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 但高脂组与氯沙坦组之间无统计学差异; 高脂喂养 12 周时, 高脂组和氯沙坦组血清 CRP 和 IL-6 水平高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 而氯沙坦组血清 CRP 和 IL-6 水平低于高脂组 ( $P < 0.05$ ), 且氯沙坦组 12 周时血清 CRP 和 IL-6 水平低于 4 周时血清水平 ( $P < 0.05$ ); 高脂组和正常对照组 12 周时血清 CRP 和 IL-6 水平与 4 周时血清水平无明显差别 (表 2)。

表 2 各组不同时期血清 CRP和 IL-6水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	CRP(mg/L)		IL-6( ng/L)	
	4周	12周	4周	12周
正常对照组	2 867 ±0 388	2 872 ±0 337	19 135 ±19 156	27. 059 ±18 146
高脂组	4 353 ±0 316 <sup>a</sup>	4 655 ±0 334 <sup>a</sup>	98 015 ±19 563 <sup>a</sup>	97. 408 ±18 417 <sup>a</sup>
氯沙坦组	4 533 ±0 367 <sup>a</sup>	3 338 ±0 387 <sup>ab</sup>	101 786 ±16 559 <sup>a</sup>	58 565 ±13 068 <sup>ab</sup>

a为  $P < 0. 05$  与正常对照组比较; b为  $P < 0. 05$  与高脂组比较。

2 3 血管紧张素 Ⅱ含量的变化

氯沙坦组和高脂组 AngⅡ含量明显高于正常对照组 ( $P < 0. 05$ ), 但氯沙坦组与高脂组之间 AngⅡ含量无统计学差异 (表 3)。

表 3 各组 AngⅡ含量 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/g)

分 组	AngⅡ含量
正常对照组 (n= 10)	73 397 ±9 511
高脂组 (n= 9)	134 367 ±60 244 <sup>a</sup>
氯沙坦组 (n= 10)	133 979 ±62 440 <sup>a</sup>

a为  $P < 0. 05$  与正常对照组比较。

2 4 氯沙坦对内膜中膜厚度的影响

正常对照组内膜无明显增厚; 高脂组内膜有程度不等的增厚, 管腔呈偏心性狭窄, 中膜平滑肌细胞减少, 排列紊乱, 可见大量胞质淡染, 充满脂质空泡的泡沫细胞, 内弹力膜拉伸, 分离, 断裂, 部分血管可见管腔内血栓形成; 氯沙坦组血管病变较轻, 内膜增厚不明显, 斑块面积较小, 管腔狭窄程度较轻, 内弹力膜仍有部分完整, 断裂部分较少, 中膜平滑肌细胞排列整齐, 部分吞噬脂质呈泡沫细胞样改变 (图 1)。高脂组和氯沙坦组内膜 /中膜厚度比值较正常对照组增大 ( $P < 0. 05$ ), 且氯沙坦组内膜 /中膜厚度比值较高脂组减小 ( $P < 0. 05$  表 4)。

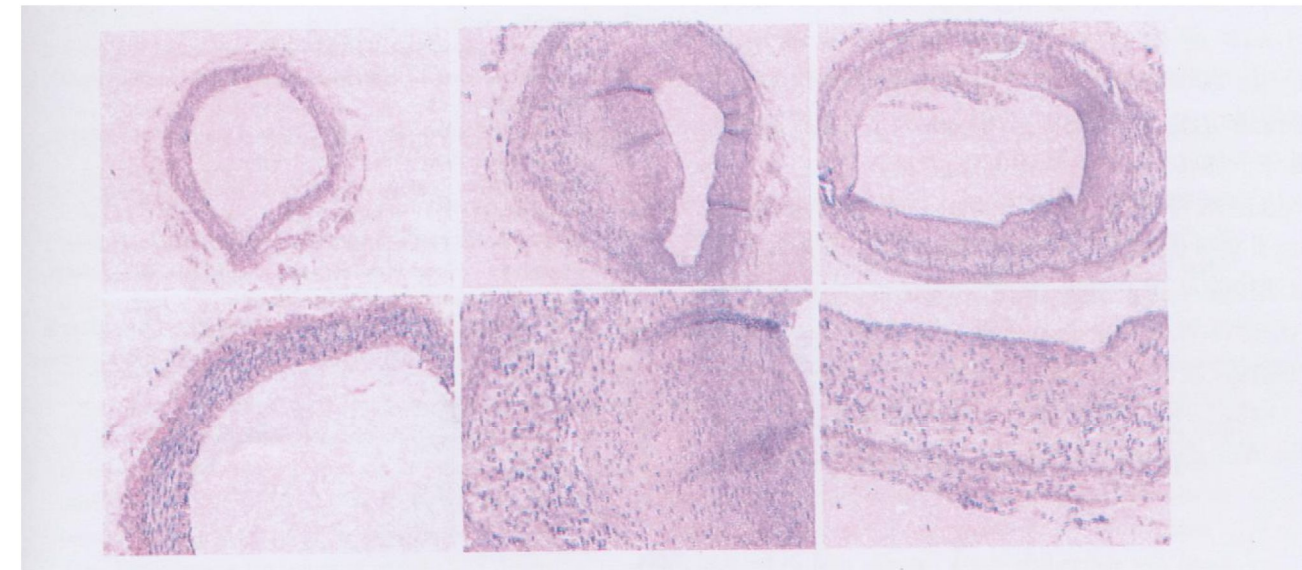


图 1. HE 染色 上图为 40 倍镜下, 下图为 100 倍镜下; 从左至右分别为正常对照组、高脂组、氯沙坦组。

表 4 各组髂动脉内膜 /中膜厚度比 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	内膜 /中膜厚度比
正常对照组 (n= 10)	0 208 ±0 082
高脂组 (n= 9)	1 864 ±0 556 <sup>a</sup>
氯沙坦组 (n= 10)	1 098 ±0 493 <sup>ab</sup>

a为  $P < 0. 05$  与正常对照组比较; b为  $P < 0. 05$  与高脂组比较。

3 讨论

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 是调节血管张力和水盐代谢平衡的神经内分泌系统。研究表明, 血管局部存在肾素-血管紧张素系统, 在病理情况下活性增加. 其产生的 AngⅡ作用于血管壁细胞和细胞外基质, 改变了炎症细胞因子、趋化因子及黏附分子的表达, 导致内皮功能紊乱, 促进脂质沉

积、炎症反应,最终导致As的形成<sup>[3-5]</sup>。本研究通过球囊损伤内皮造成血管内皮损伤以及喂饲高脂饲料后,高脂组和氯沙坦组兔的TC、TG及LDLC水平与正常对照组比较明显上升,且氯沙坦组和高脂组As病变组织中AngⅡ含量较正常对照组显著增加。表明血脂代谢紊乱和AngⅡ对As具有协同作用。这与研究报道高胆固醇血症可以上调AT1受体和ACE mRNA及蛋白的表达,使AngⅡ的生成增加<sup>[6-7]</sup>相一致。本研究后期,高脂组动脉壁见明显粥样斑块,管腔明显变窄,内弹力膜拉伸,分离,断裂,内膜/中膜厚度比显著增加;氯沙坦组粥样斑块明显减少,内皮细胞形态正常,内弹力膜仍有部分完整,断裂部分较高脂组减少,内膜/中膜厚度比较高脂组降低。表明氯沙坦抑制高脂血症引起的动脉内膜增生,发挥抗As作用。本研究中,高脂组和氯沙坦组血脂和血管组织AngⅡ均较对照组明显增高,但两组之间无明显差异,提示氯沙坦不是通过降低组织AngⅡ发挥抗As作用,也无降脂作用。目前认为AngⅡ的生物学作用是通过位于组织细胞膜上的特异性受体介导的,在病理情况下,AngⅡ与AT1受体结合力较高,对内膜增生起重要作用<sup>[8]</sup>。AngⅡ与AT1受体结合可激活血管内皮细胞膜NADP/NADPH氧化酶,产生的超氧阴离子具有信号传递功能,使转录因子NF-κB活化,继而启动黏附分子的转录,产生各种促炎症因子<sup>[9-11]</sup>。AT1受体拮抗剂可通过作用于NF-κB的抑制蛋白,使AngⅡ诱导的血管壁NF-κB活化降低,介导单核细胞迁移的MCP-1降低,黏附过程的ICAM-1、VCAM-1、E选择素及炎症指标下降<sup>[12-13]</sup>,抑制As发生中的炎性反应。

总之,As的形成是一个多因素共同作用的结果。AT1受体拮抗剂不仅有降血压、逆转心室重构

的作用,而且抑制NF-κB的表达,进而减少炎性细胞浸润,从而抑制As的发生发展。

#### [参考文献]

- [1] Papademetriou V. The potential role of AT1-receptor blockade in the prevention and reversal of atherosclerosis [J]. *J Hum Hypertens* 2002; **16** (Suppl 3): S34-41.
- [2] Kranzhoff R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. Angiotension induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19** (7): 1623-629.
- [3] Diet F, Pratt RE, Berry GJ, et al. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease [J]. *Circulation* 1996; **94** (7): 2756-767.
- [4] Ohishi M, Ueda M, Rakugi H, et al. Upregulation of angiotensin-converting enzyme during the healing process after injury at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans [J]. *Circulation* 1998; **99** (7): 56-67.
- [5] Ford CM, Shaohua Li, Pickering JG. Angiotensin Ⅱ stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT1 receptor, transforming growth factor-β, and Tyrosin phosphorylation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19** (18): 43-51.
- [6] Singh BM, Mehta JL. Interactions between the renin-angiotensin system and dyslipidemia [J]. *Arch Intern Med* 2003; **163**: 296-304.
- [7] Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, et al. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men [J]. *Circulation* 1999; **100** (21): 2131-134.
- [8] Weiss D, Kools JJ, Taylor WR. Angiotensin Ⅱ-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *Circulation* 2001; **103** (4): 48-54.
- [9] Miyazaki M, Sakonji H, Takai S, et al. Antiatherosclerotic effects of an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin Ⅱ antagonist in cynomolgus monkeys fed a high cholesterol diet [J]. *Br J Pharmacol* 1999; **12** (8): 523-529.
- [10] Ridder DA, Schwanninger M. NF-κB signaling in cerebral ischemia [J]. *Neuroscience* 2009; **158** (3): 995-1006.
- [11] 刘颖琳, 刘耕陶. 血管内皮细胞炎症反应与动脉粥样硬化的关系对药物研究的启示 [J]. *中国药理学通报*, 2001; **17** (4): 361-644.
- [12] Prasad A, Koh KK, Schenke WH, et al. Role of angiotensin Ⅱ type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis [J]. *Am Heart J* 2001; **142** (2): 248-253.
- [13] 张道友, 杨沿浪, 陈卫东. 血管紧张素受体阻断剂对慢性肾病患者尿蛋白、脂质代谢及炎症因子的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **16** (6): 476-478.

(此文编辑 文玉珊)