

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0709-04

• 实验研究 •

球囊损伤大鼠主动脉内皮后血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体的表达及瑞舒伐他汀的干预作用

刘平, 李永红, 苟瑜琳, 蔡尚郎

(青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003)

[关键词] 瑞舒伐他汀; 球囊损伤; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体

[摘要] 目的 通过观察血管内皮损伤后血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体表达的变化及瑞舒伐他汀对其表达的影响, 探讨血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体在再狭窄中的作用。方法 建立球囊损伤大鼠主动脉内皮模型, 并将大鼠随机分为对照组、手术组和瑞舒伐他汀组, 每组分别于术后 14 天、28 天取主动脉组织, 并行 HE 染色观察血管内皮厚度的变化, 用逆转录聚合酶链反应检测主动脉组织血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体 mRNA 的表达, 免疫组织化学法检测主动脉组织血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体蛋白的表达。结果 大鼠主动脉球囊损伤术后 14 天及 28 天血管内皮较对照组显著增厚 ($P < 0.01$), 瑞舒伐他汀治疗 14 天及 28 天大鼠主动脉内膜增生较手术组明显减轻。术后 14 天及 28 天, 手术组血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体 mRNA 和蛋白表达较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 瑞舒伐他汀组血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体 mRNA 和蛋白表达较手术组增加 ($P < 0.05$)。结论 瑞舒伐他汀可抑制大鼠主动脉内皮损伤后的血管增生, 并上调血管内皮血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 型受体的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Angiotensin $\text{Ang} \text{II}$ Type 2 Receptor and the Effects of Rosuvastatin on it After Vascular Balloon Injury in Rats

LIU Ping, LI Yonghong, MAN Yu-Lin, and CAI Shang-Lang

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China)

[KEY WORDS] Rosuvastatin, Balloon Injury, Angiotensin $\text{Ang} \text{II}$ Type 2 Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of angiotensin $\text{Ang} \text{II}$ type 2 receptor (AT_2) and the effect of rosuvastatin on it after vascular balloon injury in rats. **Methods** Rat models of aortic endothelial denudation were established by 2F balloon catheters. Rats were randomly allocated into three groups: control group, vascular balloon injury group and rosuvastatin treatment group. The expression of AT_2 mRNA and protein were investigated at day 14 and 28 after injury by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and immunohistochemistry method, respectively.

Results Significant intimal thickening was observed at 14 days and 28 days after injury. Rosuvastatin significantly prevented intimal thickening at 14 days and 28 days after balloon injury. The expression of AT_2 mRNA and protein increased significantly at 14 days and 28 days after injury ($P < 0.05$), and they increased obviously after rosuvastatin treatment ($P < 0.05$).

Conclusion The expression of AT_2 mRNA and protein increased significantly after endothelial injury, and rosuvastatin upregulated the expression of AT_2 .

大量的临床观察发现, 服用他汀类药物的冠心病患者冠状动脉事件发生率明显低于根据血脂水平降低程度所做的预测值, 提示他汀类药物具有调脂以外的有益作用。越来越多的临床实验已经证实了其改善内皮功能^[1]、抑制血小板聚集、抑制炎症反应^[2]、稳定斑块^[3]等调脂外作用, 但目前关于其对血管重构作用的研究相对较少, 尚无确切结论。已

有研究发现他汀类药物能够抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAS) 激活, 并可通过作用于 RAS 系统的主要活性肽血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ ($\text{Ang} \text{II}$), 明显降低 $\text{Ang} \text{II}$ 诱导的血压升高^[4]等相关心血管效应。 $\text{Ang} \text{II}$ 在心血管系统中主要通过其受体 AT_1 、 AT_2 发挥生物学作用。迄今许多研究已经证实了他汀类能够下调 AT_1 表达, 减少 AT_1 介导的细胞增殖、组织修复, 从而抑制新生血管增生, 而他汀类药物作用于 AT_2 的研究还少有报道。本研究通过研究血管损伤后 AT_2 的表达及瑞舒伐他汀对其表达的影响, 从分子水平对他汀类药物抑制血管重构的机制进行探讨, 为再狭窄的预防提供新的研究思路。

[收稿日期] 2010-05-17 [修回日期] 2010-09-07

[基金项目] 青岛市科学技术局资助 (02-2-kjyn-25)

[作者简介] 刘平, 硕士研究生。苟瑜琳, 硕士研究生。通讯作者李永红, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, E-mail: liyonghong-66@163.com。

1 材料和方法

1.1 实验分组

选取雄性 Wistar 大鼠 52 只, 体重 300~350 g, 购自青岛市药物检验所, 随机分为三组: 对照组 16 只、手术组 18 只及瑞舒伐他汀组 18 只。手术组应用 10% 水合氯醛麻醉后, 自大鼠左颈总动脉插入自制的 2F 球囊导管, 送入腹主动脉下端, 将球囊内注入生理盐水 0.1 mL, 使球囊充盈, 抽拉导管, 使动脉内皮剥脱完全, 完成主动脉内皮损伤术; 治疗组手术方法同手术组, 并于术前 1 天至术后 28 天给予 3 mg/(kg·d) 瑞舒伐他汀 (阿斯利康公司提供) 灌胃; 对照组除不插入球囊导管外, 其余操作同手术组。

1.2 标本采集

各组分别于术后 14 天及 28 天取主动脉组织。应用 10% 水合氯醛麻醉后, 75% 酒精浸泡 5 s, 在超净工作台内, 无菌条件下取其主动脉血管段约 4~5 cm, 在近主动脉端剪去 5 mm 投入甲醛中固定, 石蜡包埋, 并行 HE 染色。

1.3 RT-PCR 检测血管 AT₂ mRNA 的表达

取主动脉血管组织 50 mg 提取组织总 RNA, 取 1 μL 总 RNA 逆转录成 cDNA。引物设计: AT₂ (536 bp) 上游引物 5'-TGA GTC CGC ATT TAA CTG C-3', 下游引物 5'-ACC ACT GAG CAT ATT TCT CGG G-3'; GAPDH (317 bp) 上游引物 5'-ACC ACT GAG CAT CAT ATT TCT CGG G-3', 下游引物 5'-CAG GGT ACA TGG TGG TGC C-3'。反应条件: 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 共 35 个循环。反应完成后, 取 8 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂凝胶上进行电泳分析, 在 CHEM I GEN US2 凝胶成像分析系统下观察并拍摄电泳图像。测定各条带的灰度值, 以大鼠的 GAPDH 表达量为基准, 计算 AT₂ mRNA /GAPDH mRNA, 以表示 AT₂ mRNA 的相对表达量。

1.4 免疫组织化学法检测血管 AT₂ 蛋白的表达

切片经 3% 甲醇 H₂O₂ 封闭液室温孵育 10~15

min, 1% BSA-0.5% Triton X-100 室温 30 min, 正常羊血清封闭孵育 15 min, 一抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司) AT₂ (1:150) 37℃ 孵育 1 h 再 4℃ 过夜, 生物素标记的二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 工作液 37℃ 孵育 30 min, 辣根酶标记链酶卵白素二抗工作液 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封片; 每张切片光学显微镜在高倍镜下用 Simple PCI 图形分析系统随机选择血管的 5 个区域测 AT₂ 表达水平。

1.5 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验完成情况

手术组和瑞舒伐他汀组各有 2 只大鼠死于手术过程及术后感染, 术后存活 48 只。各组分别于术后 14 天及 28 天取主动脉组织, 每个时间点均检测 8 只大鼠。

2.2 组织学检查

术后 14 天及 28 天手术组可见血管内皮明显增厚 ($P < 0.01$); 瑞舒伐他汀治疗 14 天及 28 天后血管增生程度较手术组明显降低 ($P < 0.01$; 图 1 和 2 及表 1)。

表 1 球囊损伤血管内皮后血管内膜、中膜厚度的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	部 位	术后 14 天	术后 28 天
对照组	内膜	21.89 ± 2.11	24.48 ± 1.69
	中膜	204.12 ± 7.89	203.38 ± 8.44
手术组	内膜	85.71 ± 5.23 ^a	105.47 ± 6.30 ^a
	中膜	261.15 ± 11.95 ^a	260.66 ± 11.57 ^a
瑞舒伐他汀组	内膜	49.74 ± 4.89 ^b	65.60 ± 4.16 ^b
	中膜	228.67 ± 7.54	231.30 ± 9.49

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与手术组比较。

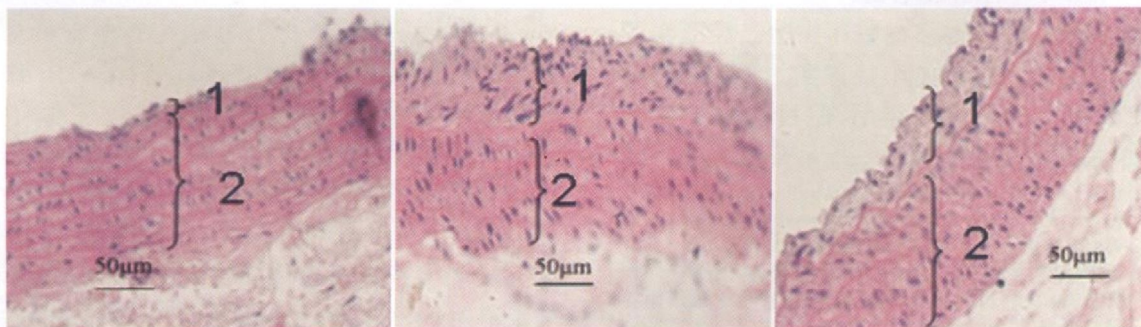


图 1 术后 14 天主动脉 HE 染色 ($\times 200$, $n=8$) 从左至右分别为对照组、手术组、瑞舒伐他汀组, 其中 1 所指为血管内膜, 2 所指为血管中膜。

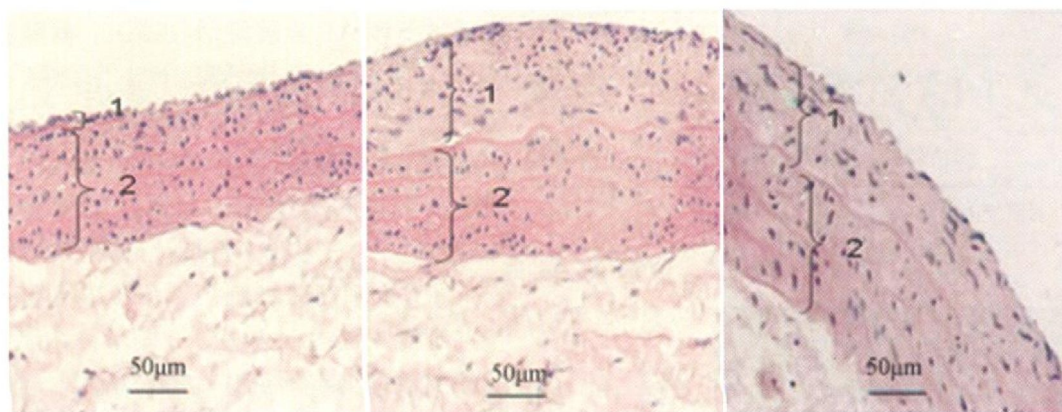


图 2 术后 28 天主动脉 HE 染色 ($\times 200$, $n=8$) 从左至右分别为对照组、手术组、瑞舒伐他汀组, 其中 1 所指为血管内膜, 2 所指为血管中膜。

2.3 血管组织 AT_2 蛋白的表达

术后 14 天及 28 天, 手术组 AT_2 蛋白的表达与对照组相比明显升高 ($P < 0.05$); 瑞舒伐他汀治疗

14 天及 28 天后 AT_2 蛋白的表达与手术组相比明显升高 ($P < 0.05$, 图 3 和 4)。

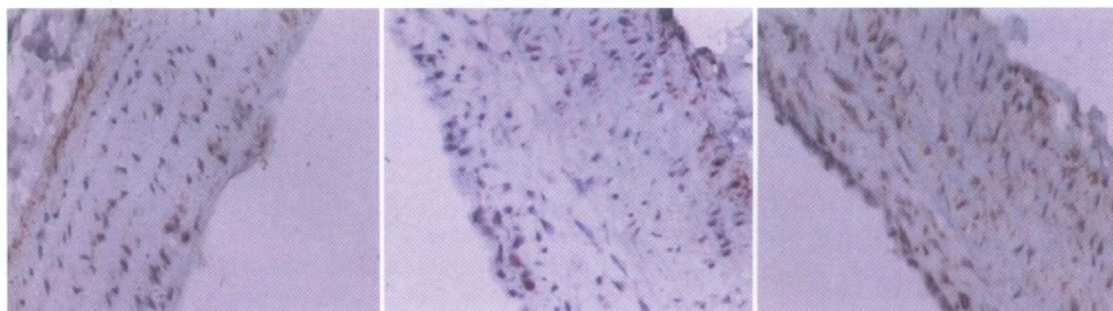


图 3 术后 14 天主动脉 AT_2 蛋白的表达 ($\times 200$) 从左至右分别为对照组、手术组、瑞舒伐他汀组。

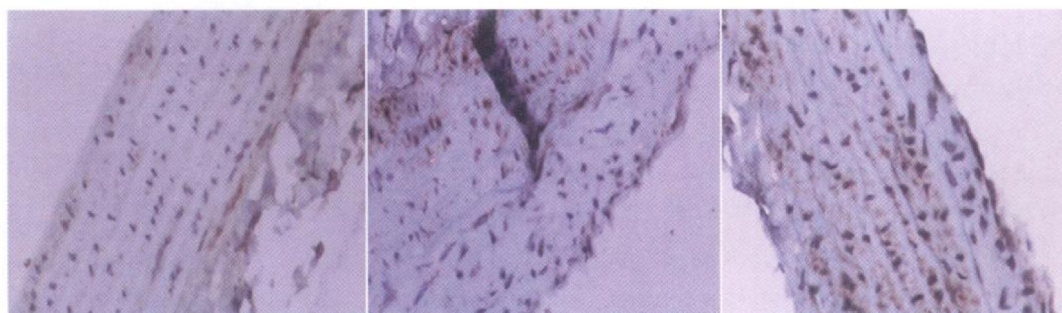


图 4 术后 28 天主动脉 AT_2 蛋白的表达 ($\times 200$) 从左至右分别为对照组、手术组、瑞舒伐他汀组。

2.4 血管组织 AT_2 mRNA 的表达

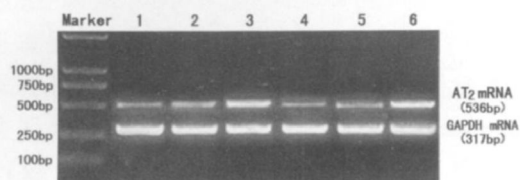
术后 14 天及 28 天, 手术组 AT_2 mRNA 的表达与对照组相比明显升高 ($P < 0.05$); 瑞舒伐他汀治

疗 14 天及 28 天后 AT_2 mRNA 的表达与手术组相比明显升高 ($P < 0.05$, 图 5 和表 2)。

表 2 AT₂ mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分组	术后 14 天	术后 28 天
对照组	0.139 ± 0.02	0.132 ± 0.02
手术组	0.57 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.02 ^a
瑞舒伐他汀组	0.72 ± 0.10 ^{ab}	0.42 ± 0.05 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与手术组比较。

图 5 主动脉组织 AT₂ mRNA 表达的琼脂糖凝胶电泳图像

1-3 为术后 14 天的对照组、手术组、瑞舒伐他汀组, 4-6 为术后 28 天的对照组、手术组、瑞舒伐他汀组。

3 讨论

PCI 术是目前公认的治疗冠心病的有效手段, 但由血管负性重构引起的 PCI 术后再狭窄发生率居高不下, 严重限制了目前冠心病治疗的进展。他汀类药物作为目前唯一能够降低心脑血管病死率的调脂药, 应用于 PCI 术主要依靠其改善内皮、稳定斑块、抑制炎症反应等作用。本研究通过观察瑞舒伐他汀治疗对大鼠主动脉血管内皮损伤后新生血管增生的影响, 并与未治疗组比较, 证实他汀类药物除了上述作用外, 还能抑制血管增生, 减轻血管重构, 从而可能预防再狭窄的发生。

血管重构的主要病理机制是血管平滑肌细胞 (VSMC) 大量增殖及向内膜迁移。以往大量研究证实 RAS 激活引起 VSMC 肥厚、增殖, 是介导血管重塑的重要过程。根据已有的研究显示, 他汀类抑制血管重构的机制可能为: 抑制 VSMC 的增殖与迁移^[5]; ④诱导 VSMC 凋亡; ④抑制血管内皮生长因子 (VEGF)^[6]。以上这些研究提示, 他汀类可能主要通过作用于 RAS 参与血管重构的发生。

目前他汀类药物下调 AT₁ 的研究已经很多。早期 Nakening 等证实他汀类药物不但可以下调 AT₁ 的表达, 还可以降低 AT₁ 的密度; 王安才等^[4]通过研究

阿托伐他汀对自发性高血压影响时发现, 他汀类可能通过下调 AT₁ 显著降低收缩压。而随着对 AT₂ 不断深入的认识, 发现 AT₂ 介导的生物学作用多与 AT₁ 相拮抗^[7], 具有对抗细胞增长和心肌肥厚及促进细胞分化、凋亡、扩张血管、降低血压等作用。同时有研究证实 AT₂ 基因在体转染可显著抑制新生内膜增生^[8], 还发现 AT₂ 拮抗剂 PD123319 能明显减弱 AngⅡ 促平滑肌细胞 PCNA 表达的效应, 而 AT₁ 拮抗剂则能阻断这种效应^[9], 提示 AT₂ 能够拮抗 AT₁ 的增殖效应。本研究中, 术后 14 天及 28 天手术组血管 AT₂ 的表达显著高于对照组, 而应用瑞舒伐他汀治疗后 AT₂ 的表达进一步升高。进一步提示他汀类可能通过上调 AT₂ 而发挥抑制血管重构作用。

关于他汀类药物对 AT₂ 的调节机制, 尚需要更深入地研究探讨。本研究证实了他汀类药物的抑制血管重构作用, 并通过其对 AT₂ 表达的影响研究其作用机制, 从分子水平为术后再狭窄的预防提供新的研究思路。

[参考文献]

- [1] Nakata S, Tsutsui M, Shinokawa H, et al. Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-κB pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 92-98
- [2] Seljeflot I, Tonsaet S, Hjemann I, et al. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease [J]. *Atherosclerosis* 2002; 162 (1): 179-185
- [3] Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins [J]. *Am J Cardiol* 2003; 91 (4A): 4-8
- [4] 王安才, 成蓓, 谢小亮, 等. 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠心室重构的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 2004; 9 (8): 880-884
- [5] Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Acta Med Indones* 2007; 39: 86-93
- [6] Iwai M, Chen R, Li Z, et al. Deletion of angiotensin type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation* 2005; 112: 636-643
- [7] 孟永, 李芳. 血管紧张素Ⅱ型受体在心脏保护方面的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2007; 28 (6): 921-924
- [8] 唐兵, 何国祥. AT₂R 基因在体转染抑制大鼠颈动脉新生内膜增生 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007; 23 (2): 297-302
- [9] Ichiki T, Takeda K, Tokunou H, et al. Downregulation of angiotensin type 2 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 (12): 1896-901

(此文编辑 文玉珊)