

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0637-04

· 实验研究 ·

# 瑞舒伐他汀对兔动脉内皮损伤后转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

刘长青, 尚小明, 纪征, 卢峰, 李霞, 赵庆霞, 张春来, 孙淑娴

(河北医科大学唐山临床医学院 唐山市工人医院心内一科, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 瑞舒伐他汀; 转化生长因子  $\beta 1$ ; 内皮损伤; 再狭窄; 冠心病

[摘要] 目的 探讨瑞舒伐他汀对兔腹主动脉球囊损伤后转化生长因子  $\beta 1$  表达的影响。方法 新西兰兔 20 只随机分为瑞舒伐他汀组和模型组, 两组均应用球囊损伤腹主动脉方法建立兔血管内皮损伤模型, 术后 6 周行腹主动脉造影后采用免疫组织化学法和逆转录聚合酶链反应技术对兔腹主动脉壁转化生长因子  $\beta 1$  表达的情况进行观察。结果 瑞舒伐他汀组血管狭窄程度 (31.41%  $\pm$  7.08%)、血管狭窄段最小内径 (1.74  $\pm$  0.25 mm) 明显优于模型组 (分别为 55.25%  $\pm$  10.23% 和 1.32  $\pm$  0.33 mm), 两组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 瑞舒伐他汀组转化生长因子  $\beta 1$  平均吸光度 (0.41  $\pm$  0.12)、阳性细胞面积 (31.37%  $\pm$  4.42%) 均低于模型组 (0.57  $\pm$  0.17 和 40.58%  $\pm$  7.45%,  $P < 0.05$ ), 损伤血管中转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 表达 (22.37  $\pm$  4.42) 较模型组 (42.47  $\pm$  5.41) 明显减弱 ( $P < 0.05$ )。结论 瑞舒伐他汀对内皮损伤后的血管病变有保护作用, 其机制可能是部分通过下调转化生长因子  $\beta 1$  的表达, 减轻血管球囊损伤后再狭窄。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effect of Rosuvastatin on Expression of Transforming Growth Factor $\beta 1$ in Dorsal Aorta of Rabbits After Balloon Injury

LIU Chang-Qing SHANG Xiao-Ming JI Zheng LU Feng LIXia ZHAO Qing-Xia ZHANG Chun-Lai and SUN Shu-Xian

(Department of Cardiology, the Tangshan Worker's Hospital of Hebei Medical University, Tangshan, Shandong 063000 China)

[KEY WORDS] Rosuvastatin; Transforming Growth Factor  $\beta 1$ ; Balloon Injury; Restenosis; Coronary Heart Disease

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effect of rosuvastatin on restenosis and the expression of transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) in abdominal aorta of rabbits after balloon injury. **Methods** Two groups of 10 male New Zealand rabbits received either rosuvastatin or no rosuvastatin after balloon injury. We did abdominal aorta angiography and observed the expression of TGF- $\beta 1$  with immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) six weeks later. **Results** The average stenosis degree (31.41%  $\pm$  7.08%) and the smallest inner diameters (1.74  $\pm$  0.25 mm) were better in rosuvastatin-treated group than that of the model group (55.25%  $\pm$  10.23% and 1.32  $\pm$  0.33).

The average absorbency and the area of positive of TGF- $\beta 1$  were dramatically lower in rosuvastatin-treated group than that of the model group (0.41  $\pm$  0.12 vs 0.57  $\pm$  0.17, 31.37%  $\pm$  4.42% vs 40.58%  $\pm$  7.45%); The quantity of amplification products (22.37  $\pm$  4.42) was lower than that of the model group (42.47  $\pm$  5.41), there were significant differences between the two groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Rosuvastatin can improve the restenosis and decrease the expression of TGF- $\beta 1$  in rabbits after balloon injury.

经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary PTCA) 是目前临床治疗冠心病的

主要方法之一, 但术后 30% ~ 50% 的再狭窄率严重影响了其远期疗效和临床应用, 他汀类药物具有调

[收稿日期] 2011-02-21

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目 (20100158)

[作者简介] 刘长青, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病介入治疗, E-mail为 lcq1974@sohu.com。通讯作者尚小明, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗。纪征, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病介入治疗, E-mail为 jizheng999@163.com。

脂、抗炎、改善血管内皮功能、抑制平滑肌细胞增殖、维持粥样斑块的稳定性等多种作用<sup>[1,2]</sup>,因此,其在预防 PTCA 术后再狭窄中可能有益。本研究通过构建家兔血管成形术后血管内膜损伤模型,观察瑞舒伐他汀对血管成形术后转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 表达的影响,探讨瑞舒伐他汀预防血管成形术后支架再狭窄的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

美国 Cordis 公司的普通球囊导管 3.5 mm  $\times$  15 mm, 0.3556 mm  $\times$  195 cm ATW 指引钢丝和球囊扩张压力泵等,德国 Siments 心血管造影机等。瑞舒伐他汀钙(商品名可定,由阿斯利康公司惠赠)硫酸氢氯吡格雷片(深圳信立泰药业有限公司);乙酰水杨酸肠溶片(徐州广平制药有限公司);鼠抗兔 TGF- $\beta 1$  一抗(美国 Santa Cruze 公司)。

### 1.2 动物模型的建立

健康雄性新西兰兔 20 只(解放军总医院实验动物研究所),体重 3.0~3.5 kg 适应喂养 2 周后制作球囊损伤模型。25% 乌拉坦按 1 g/kg 体重经耳缘静脉注射麻醉,约 3~5 min 麻醉生效后,剪开右股部皮毛及筋膜,分离右股动脉。同时自耳缘静脉注射肝素钠(100 U/kg)。结扎分离出右股动脉远端,约 2 min 后近段股动脉充盈变粗,使用血管夹夹闭动脉近段,眼科剪在充盈血管上剪开一楔形缺口,送入带有 3.5 mm  $\times$  18 mm 球囊的导丝,导丝前端探出球囊约 10 cm,送入过程中松开血管夹,送到位后及时夹闭。送入深度以球囊中导丝从尾端分出部位为准,约送入球囊 30 cm,以 12 个大气压充盈球囊,拉动球囊至阻力明显增大处,拉出约 20 cm,抽负压,如此反复 3 次,撤出球囊导丝,结扎血管,缝合皮下及皮肤。术后补充生理盐水 250 mL,肌注青霉素 80 万 U。

### 1.3 实验分组及血生化指标检测

术后随机分成模型组和瑞舒伐他汀组各 10 只,两组均予阿斯匹林 25 mg/d 氯比格雷 25 mg/d 灌胃,瑞舒伐他汀组加用瑞舒伐他汀钙 1 mg/(kg $\cdot$ d),分组喂养 6 周后从耳缘静脉采集静脉血 5 mL,离心后(离心速度 2000 r/min)取 0.15 mL 血清,采用酶法测定总胆固醇(total cholesterol TC)、甘油三酯(triglyceride TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol

LDLC)以及肝肾功能、血糖、同型半胱氨酸(homocysteine Hcy)。

### 1.4 腹主动脉造影

两组 20 只兔于喂养 6 周后经颈动脉行腹主动脉造影。25% 乌拉坦麻醉后(方法同前)固定动物于平台,沿颈部环状软骨处正中切口剪毛,常规皮肤消毒,分离右颈动脉,结扎动脉远端,用动脉夹阻断近端血流,在动脉壁上剪一小口,逆行送入导丝至背大动脉胸段后,沿导丝送入 4F 造影管至主动脉,碘必乐 370 造影剂 8 mL 行主动脉造影。

### 1.5 免疫组织化学法检测转化生长因子 $\beta 1$ 表达

造影后气栓法处死各组实验兔,截取损伤的腹主动脉壁,标本经 10% 中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,间断均匀切片(厚度 5  $\mu$ m),参照试剂盒说明书(SP法)行 TGF- $\beta 1$  检测。采用 MPIAS500 型图像分析仪进行图像分析,分别测量阳性面积比(阳性反应面积/测量窗面积)和阳性积分吸光度。

### 1.6 逆转录聚合酶链反应法检测转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 表达

取部分截取的腹主动脉壁,按说明书抽提总 RNA,测定 RNA 纯度、浓度后进行 RT-PCR。引物由 Primer Premier 5.1 软件设计,上海申友生物公司合成。TGF- $\beta 1$  上游引物为 5'-CAAGGACCTGGGCTG-GAA-3',下游引物为 5'-GCCACGATCATGTTGGA-3',扩增产物长度 247 bp 内参  $\beta$ -actin 上游引物为 5'-AGGAAGGAGGGCTGGAACA-3',下游引物为 5'-CCCATCTACGAGGGCTACGC-3',扩增产物长度 311 bp。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 59 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环,再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。完成扩增后取扩增产物 8  $\mu$ L, 20% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下拍照,采用 UVP 型凝胶密度扫描仪对 TGF- $\beta 1$ 、 $\beta$ -actin 扩增产物的电泳带进行密度扫描,计算两者相对比值。

### 1.7 统计学处理

经定量或半定量处理后的实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS13.0 统计分析软件对实验数据进行统计学分析。采用两组间独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 血生化指标水平

两组家兔相比肝功能、肾功能、Hcy 及 HDLC 差异无显著性 ( $P > 0.05$ ); 在血脂方面瑞舒伐他汀组 TC、TG 及 LDLC 明显低于模型组,差异有统计学意

义 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 两组家兔血生化结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1. Result of blood biochemical analysis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

生化指标	模型组	瑞舒伐他汀组
尿素氮 (mmol/L)	6.70 ± 1.91	5.50 ± 1.74
肌酐 (μmol/L)	54.80 ± 9.38	36.90 ± 8.43
谷丙转氨酶 (U/L)	35.90 ± 8.06	35.60 ± 9.09
谷草转氨酶 (U/L)	43.70 ± 9.98	39.70 ± 6.64
总胆红素 (μmol/L)	4.70 ± 0.62	3.40 ± 0.68
TC (mmol/L)	1.20 ± 0.45	0.80 ± 0.45 <sup>a</sup>
TG (mmol/L)	1.30 ± 0.32	0.90 ± 0.22 <sup>a</sup>
LDLC (mmol/L)	0.60 ± 0.11	0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>
HDLc (mmol/L)	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.08
Hcy (mmol/L)	27.80 ± 4.03	21.20 ± 8.07

a为  $P < 0.05$  与模型组比较。

## 2.2 腹主动脉造影结果

两组 20 只家兔均成功行腹主动脉造影, 见腹主动脉远段分出髂动脉前 2 cm 左右血管内膜不光滑, 血管腔明显狭窄 30% ~ 50% (图 1)。瑞舒伐他汀组血管狭窄段最小内径 ( $1.74 \pm 0.25$  mm) 明显较模型组 ( $1.32 \pm 0.33$  mm) 大, 狭窄程度 ( $31.41\% \pm 7.08\%$ ) 明显较模型组 ( $55.25\% \pm 10.23\%$ ) 轻, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而两组管腔狭窄长度 ( $10.53 \pm 1.44$  mm 比  $9.86 \pm 1.93$  mm)、参照血管内径 ( $2.97 \pm 0.05$  mm 比  $2.95 \pm 0.06$  mm) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

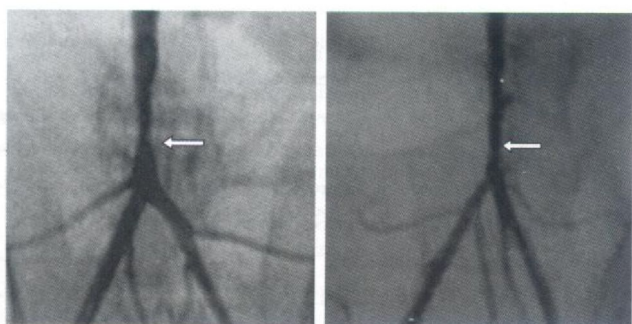


图 1 兔腹主动脉造影结果 左为瑞舒伐他汀组, 右为模型组。

Figure 1. The abdominal aorta angiography of rabbits after balloon injury

## 2.3 免疫组织化学检测 TGF-β1 表达

两组兔损伤的腹主动脉内膜及中膜内均有染色为棕褐色的 TGF-β1 蛋白表达, 瑞舒伐他汀组平均吸光度 ( $0.41 \pm 0.12$ ) 及 TGF-β1 阳性细胞面积百分

比 ( $31.37\% \pm 4.42\%$ ) 均明显低于模型组 ( $0.57 \pm 0.17$  和  $40.58\% \pm 7.45\%$ ,  $P < 0.05$ , 图 2)。



图 2 兔腹主动脉转化生长因子 β1 免疫组织化学结果 ( $\times 200$ ) 左为瑞舒伐他汀组, 右为模型组。

Figure 2. Immunohistochemistry staining of TGF-β1 in abdominal aorta

## 2.4 转化生长因子 β1 mRNA 表达水平

两组兔损伤的腹主动脉壁中均有 247 bp TGF-β1 和 311 bp β-actin 的扩增产物。瑞舒伐他汀组 TGF-β1 mRNA 表达 ( $22.37 \pm 4.42$ ) 较模型组 ( $42.47 \pm 5.41$ ) 减少 47.3%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

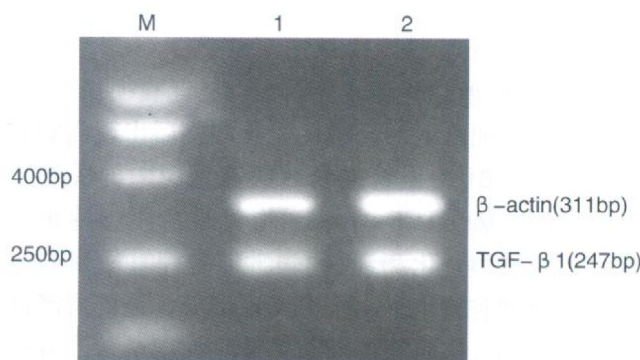


图 3. RT-PCR 检测兔腹主动脉壁转化生长因子 β1 mRNA 表达 M 为 Marker 1 为瑞舒伐他汀组, 2 为模型组。

Figure 3. The mRNA's expression of TGF-β1 by RT-PCR in rabbits' abdominal aorta wall

## 3 讨论

他汀类是 3-羟基-3-甲基戊二酸辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶的抑制剂。由于 HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成的限速酶, 血浆胆固醇增高与动脉粥样硬化之间有明确的相关性, 他汀类用于冠状动脉病变的一级和二级预防中, 有效地降低了心血管事件的发生率和病死率<sup>[1]</sup>。这些令人欣慰的结果不能完全用调脂作用本身来解释。除了降脂作用外, 他汀类发挥几

种所谓的多效作用包括改善内皮功能、抑制炎症反应、抗血栓、稳定斑块、抗氧化、减少组织因子表达、抑制平滑肌细胞和系膜细胞的增殖及细胞外基质的分泌、免疫调理、降低胰岛素抵抗等<sup>[2]</sup>,大多数的这种效果可能由于抑制了 HMG-CoA 还原酶活性。3-甲(基)3,5-二羟(基)戊酸是反应的产物,它不仅是胆固醇的前体,也是许多维持正常细胞功能的类异戊二烯的前体。因此他汀类抑制了  $\beta$ -羟- $\beta$ -甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶活性,相对缺乏甲羟戊酸引起的产生大量降胆固醇外的作用。这些非调脂作用可能具有更重要的临床意义。瑞舒伐他汀是这类药中最新推向市场的药物,已经在改善血脂、降 LDLC 方面达标,并同其它他汀类药物比较在安全性方面显示出明显的效果<sup>[3,4]</sup>。实验和临床研究显示瑞舒伐他汀在改善内皮功能<sup>[5]</sup>、降低氧化型低密度脂蛋白、抗炎<sup>[6,7]</sup>、稳定斑块<sup>[8]</sup>、降低梗死面积<sup>[9]</sup>以及在血管重塑、纤溶、心肌和部分神经系统中可能有益<sup>[10]</sup>。支架内再狭窄与血管平滑肌细胞增殖所致的血管新生内膜增生关系密切。支架植入后局部的炎症刺激是引起内膜增生的重要因素,减轻局部炎症将有可能降低支架置入术后血管内膜增生的程度<sup>[11]</sup>。有报道<sup>[12]</sup>瑞舒伐他汀在独立于降脂外通过减轻 ApoE\* 3 转基因小鼠中炎症因子延缓动脉硬化进展,我们通过构建家兔腹主动脉球囊损伤模型,发现瑞舒伐他汀能明显减轻血管损伤后出现的管腔狭窄。TGF- $\beta$ 1 是血管损伤后病理反应中的关键分子,动脉损伤后 TGF- $\beta$ 1 刺激血管平滑肌细胞由合成型向增殖型转化和迁移,刺激细胞外基质蛋白表达和导致管腔狭窄。本研究发现瑞舒伐他汀可降低 TGF- $\beta$ 1 水平,从而间接抑制平滑肌细胞增殖。有报道瑞舒伐他汀单独或与血管紧张素  $\text{①}$ 1 型受体(AT1R)阻滞剂坎地沙坦合用降低基质金属蛋白酶 1(MMP-1)、MMP-2 和 MMP-9 表达,增强斑块的稳定性<sup>[6]</sup>,这与 TGF- $\beta$ 1 调控 MMP-9 表达有关,这与我们的结果相一致。提示瑞舒伐他汀在治疗、预防支架再狭窄中可能有更大的发展空间。

两组家兔肝肾功能及 Hcy 相比无统计学差异,说明 1 mg/(kg·d)瑞舒伐他汀对家兔来说相对安全,且已经明显降低血脂,但我们注意到瑞舒伐他汀组中肌酐及尿素氮有升高的趋势,需进一步在临床中密切观察。我们没有采用高脂动物模型,损伤的是正常血管而非动脉硬化血管,主要是考虑到观察瑞舒伐他汀降脂之外的抗炎作用,但也给我们的结果带来了局限。我们的实验得出了相对有益的结果,

但瑞舒伐他汀作为新上市不久的超级他汀,其多效性及降脂效果是否可以减少心脑血管疾病的发生率和死亡率还需要进一步临床试验观察。

#### [参考文献]

- [1] Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90056 participants in 14 randomised trials of statins [J]. *Lancet* 2005; 366: 1267-278.
- [2] Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol [J]. *Am J Cardiol* 2005; 96: 24F-33F.
- [3] Lablanche M, Leone A, Merkely B, et al. Comparison of the efficacy of rosuvastatin versus atorvastatin in reducing apolipoprotein B/apolipoprotein A-1 ratio in patients with acute coronary syndrome: results of the CENTAURUS study [J]. *Arch Cardiovasc Dis* 2010; 103(3): 160-169.
- [4] Nicholls SJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer M, et al. Meta-analysis of comparative efficacy of increasing dose of atorvastatin versus rosuvastatin versus simvastatin on lowering levels of atherogenic lipids (from VOYAGER) [J]. *Am J Cardiol* 2010; 105(1): 69-76.
- [5] 刘平,李永红,尚瑜琳,等.球囊损伤大鼠主动脉内皮后血管紧张素  $\text{②}$ 型受体的表达及瑞舒伐他汀的干预作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010; 18(9): 709-712.
- [6] Simon L, Gianazza E, Gelosa P, et al. Rosuvastatin, but not simvastatin, provides end-organ protection in stroke-prone rats by anti-inflammatory effects [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 598-603.
- [7] 徐建欧,陈小芬,卢益中.瑞舒伐他汀对不稳定型心绞痛患者高敏 C 反应蛋白的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2010; 30(5): 1195-1196.
- [8] Chen J, Li D, Schaefer RF, et al. Inhibitory effect of candesartan and rosuvastatin on CD40 and MMPs expression in apo-E knockout mice: novel insights into the role of RAS and dyslipidemia in atherogenesis [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 446-452.
- [9] Veronica DA, Martin D, Lukas E, et al. Rosuvastatin given during reperfusion decreases infarct size and inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in normocholesterolemia and hypercholesterolemia rabbits [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 53: 137-144.
- [10] Michael SK, Haralampous M, Moses SE. An overview of the extralipid effects of rosuvastatin [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeutics* 2008; 13: 157-174.
- [11] 张丽丽,戴秋艳.辛伐他汀对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; 16(12): 943-947.
- [12] Robert K, Hans MG, Jef JE, et al. Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol lowering effect in ApoE\* 3-leiden transgenic mice: evidence for anti-inflammatory effects of rosuvastatin [J]. *Circulation* 2003; 108: 368-374.

(此文编辑 许雪梅)