

# 前列腺素 E1 对兔动脉粥样硬化易损斑块内新生血管的影响

郑雪<sup>1</sup>, 白万军<sup>2</sup>, 周聊生<sup>3</sup>, 李宏建<sup>4</sup>

(1. 山东大学药学院, 山东省济南市 250012; 2. 河北省人民医院临床药学部, 河北省石家庄市 050051;  
3. 山东省千佛山医院老年病科, 山东省济南市 250014; 4. 山东省千佛山医院药学部, 山东省济南市 250014)

[关键词] 前列腺素 E1; 易损斑块; 新生血管; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子

[摘要] **目的** 建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型, 选择辛伐他汀为阳性对照药物, 观察前列腺素 E1 对斑块易损指数及斑块内新生血管的影响。**方法** 将 30 只新西兰兔随机分为模型组、前列腺素 E1 组、辛伐他汀组, 每组 10 只, 建立易损斑块模型, 并进行药物干预。腹主动脉切片进行形态学及斑块内出血观察; 计算斑块易损指数; 免疫组化观察斑块内相关因子表达; 逆转录聚合酶链反应检测相关因子 mRNA 表达水平。**结果** 与模型组相比, 前列腺素 E1 组斑块易损指数显著降低 ( $1.23 \pm 0.23$  比  $2.84 \pm 0.59$ ,  $P < 0.05$ ), 血小板内皮细胞黏附分子 1 的表达明显减少 ( $0.153 \pm 0.031$  比  $0.381 \pm 0.062$ ,  $P < 0.05$ ), 斑块内出血现象明显减轻; 并且能够显著降低斑块内缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 、血管内皮生长因子蛋白表达 ( $0.252 \pm 0.032$  比  $0.439 \pm 0.044$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.396 \pm 0.026$  比  $0.673 \pm 0.084$ ,  $P < 0.01$ ) 及 mRNA 水平 ( $0.706 \pm 0.032$  比  $1.183 \pm 0.134$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.121 \pm 0.019$  比  $0.468 \pm 0.022$ ,  $P < 0.05$ ); 前列腺素 E1 组和辛伐他汀组斑块内缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的蛋白表达及 mRNA 水平具有显著性差异 ( $0.252 \pm 0.032$  比  $0.163 \pm 0.018$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.706 \pm 0.032$  比  $0.763 \pm 0.018$ ,  $P < 0.05$ )。**结论** 前列腺素 E1 能够抑制斑块内新生血管的生成, 具有稳定易损斑块的作用, 其可能机制与辛伐他汀有所不同, 是通过抑制斑块内缺氧诱导因子 1 $\alpha$  的激活进而下调血管内皮生长因子表达发挥作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Prostaglandin E1 on Angiogenesis in Atherosclerotic Vulnerable Plaques in Rabbits

ZHENG Xue<sup>1</sup>, BAI Wan-Jun<sup>2</sup>, ZHOU Liao-Sheng<sup>3</sup>, and LI Hong-Jian<sup>4</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 3. Geriatric Department, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan, Shandong 250014, China; 4. Department of Pharmacy, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan, Shandong 250014, China)

[KEY WORDS] Prostaglandin E1; Vulnerable Plaque; Angiogenesis; Hypoxia-inducible Factor -1 $\alpha$ ; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To establish the rabbit model of atherosclerotic vulnerable plaques, and study the effects of prostaglandin E1 on the angiogenesis which is induced by atherosclerosis. **Method** 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups (model group, prostaglandin E1 group, and simvastatin group), each group has 10 rabbits.

The rabbit model of atherosclerotic vulnerable plaques were established, and the rabbits were given drugs to affect the disease. The abdominal aorta were processed and examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. The angiogenesis and hemorrhage in plaques was detected. The vulnerability index was counted. Immunohistochemical staining was performed to detect the expressions of related factors. And the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was done to observe the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA.

**Results** Compared with the model group, the expression levels of vulnerability index and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in the prostaglandin E1 group were less ( $1.23 \pm 0.20$  vs  $2.84 \pm 0.59$ ,  $P < 0.05$ ;  $1.23 \pm 0.20$  vs  $2.84 \pm$

[收稿日期] 2011-08-17

[作者简介] 郑雪, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化药物干预, E-mail 为 zhengxue0629@163.com。白万军, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化药物干预, E-mail 为 tielang3215@yahoo.com.cn。通讯作者李宏建, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 lihongjian16@163。

0.59,  $P < 0.05$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGF were lower in plaques ( $0.252 \pm 0.032$  vs  $0.439 \pm 0.044$ ,  $P < 0.01$ ;  $0.396 \pm 0.026$  vs  $0.673 \pm 0.084$ ,  $P < 0.01$ ). The expression levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA and VEGF mRNA were lower in plaques too ( $0.706 \pm 0.030$  vs  $1.183 \pm 0.134$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.121 \pm 0.019$  vs  $0.468 \pm 0.022$ ,  $P < 0.05$ ). However, the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\alpha$  mRNA between the prostaglandin E1 group and simvastatin group are different ( $0.252 \pm 0.032$  vs  $0.163 \pm 0.018$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.706 \pm 0.030$  vs  $0.763 \pm 0.018$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Prostaglandin E1 inhibits angiogenesis of atherosclerotic vulnerable plaque, and it works by reducing the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF.

易损斑块破裂出血是导致急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的重要原因,而越来越多的证据表明易损斑块内出现新生血管是斑块不稳定直至破裂的重要因素<sup>[1]</sup>。抑制新生血管的生成现已成为治疗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的新手段。目前已有研究证明,辛伐他汀可以通过下调动脉粥样硬化斑块中环氧化酶2及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达及活性<sup>[2]</sup>、减少血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和第八因子相关抗原(factor VIII related antigen, FVIII RAg)的表达<sup>[3]</sup>等多种途径抑制新生血管的形成。但由于该类药物存在肝损伤及横纹肌溶解等严重不良反应,一定程度上限制了其在临床上的应用。

前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1) 具有扩张外周和冠状动脉血管、抑制血小板聚集、抗动脉粥样脂质斑块形成的作用,是一种高效、安全的生物活性物质,临床应用广泛。近年来研究发现,PGE1 还具有明显的抗炎和抗氧化应激作用。Ishikawa 等<sup>[4]</sup>发现,PGE1 能够显著抑制单核细胞分泌肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)。Fang 等<sup>[5]</sup>研究发现,PGE1 能够抑制内皮细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,提高内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达,促进 NO 的释放。本实验室目前已证实前列腺素 E1 可通过抑制斑块内巨噬细胞的累积及炎症因子分泌发挥稳定易损斑块的作用<sup>[6]</sup>,但新生血管与易损斑块的关系未被述及。因此本研究仍通过家兔动脉粥样硬化易损斑块模型,以辛伐他汀作为阳性对照药物,来探究前列腺素 E1 对易损斑块内新生血管的影响并初步讨论作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组及造模

本研究借鉴 Phinikaridou 等<sup>[7]</sup>的建模方法。普通级雄性 2 月龄新西兰白兔 30 只,体重  $2.2 \pm 0.2$

kg,随机分成 3 组:模型组、前列腺素 E1 组、辛伐他汀组,每组 10 只。普通饲料适应性喂养后开始造模。3 组兔给予高脂饲料(1%胆固醇)喂养,每天 120 g。2 周后按照文献方法<sup>[8]</sup>,所有兔行腹主动脉球囊导管损伤术,术后继续高脂饲料喂养。第 9 周开始进行药物干预:前列腺素 E1 组耳缘静脉给药 [ $0.6 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ](药品为北京泰德制药有限公司产品);辛伐他汀组灌胃给药 [ $5 \text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ](药品为杭州默沙东制药有限公司产品)。同时各组均改为普通饮食,继续喂养 4 周。在第 13 周末处死动物前 48、24 h,两次给予药物触发,即腹膜下注射蛇毒( $0.15 \text{mg}/\text{kg}$ ),30 min 后,耳缘静脉注射组胺( $0.02 \text{mg}/\text{kg}$ ),诱发斑块破裂。

### 1.2 病理标本的留取及易损指数计算

将兔用 3% 戊巴比妥钠( $30 \text{mg}/\text{kg}$ )麻醉后固定于手术台,取出球囊拉伤过的腹主动脉血管,纵向剪开,用生理盐水冲洗后,一部分置于组织冻存管,液氮保存,用于分子生物学检测;一部分置于 10% 中性福尔马林固定,制备石蜡标本和冰冻标本,分别进行 HE 和天狼猩红染色;剩余部分用 OCT 包埋制备冰冻切片,进行油红 O 染色。免疫组化检测巨噬细胞(RAM11)和平滑肌细胞( $\alpha$ -SAM-actin)表达。免疫组化染色方法步骤:脱蜡水化;3% 双氧水封闭 10 min;微波枸橼酸热修复  $92 \sim 98^\circ\text{C}$  15 min;5% 山羊血清封闭液封闭  $37^\circ\text{C}$  20 min;滴加一抗 RAM11(1:500)(武汉博士德生物工程有限公司)、 $\alpha$ -SMA-actin(1:200)(武汉博士德生物工程有限公司), $4^\circ\text{C}$  过夜;复温 20 min,滴加二抗(武汉博士德生物工程有限公司), $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min;滴加链霉素亲霉素酶复合体(streptavidin-biotin complex, SABC), $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min;DAB(北京中杉金桥生物技术有限公司)显色,复染,分化,返蓝;中性树脂胶封片。利用 Image Pro Plus 6.0 图形分析系统随机选择切片的 5 个区域进行测量。

计算斑块的易损指数。定义<sup>[9]</sup>为:易损指数 = (RAM11 + 油红 O) 染色阳性百分比 / ( $\alpha$ -SAM-actin + 天狼猩红) 染色阳性百分比的比值。各染色阳性百分比分别以染色阳性面积占总斑块面积的百分

比表示。每个切片选取两处作为测量区并计算其均值,均在相同条件下测量。

### 1.3 腹主动脉缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 、血管内皮生长因子、血小板内皮细胞黏附分子 1 的免疫组化检测

血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) (即 CD31)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 及 VEGF 的免疫组化染色方法步骤参照“1.2”项。一抗: VEGF (1:100) (武汉博士德生物工程有限公司)、HIF-1 $\alpha$  (1:100) (武汉博士德生物工程有限公司)、CD31 (1:50) (美国 Abcam 公司); 二抗 (武汉博士德生物工程有限公司)。CD31 染色部位结果出现棕黄色或棕褐色,用平均光密度进行统计分析。HIF-1 $\alpha$  染色后,以细胞核被染成棕黄色或棕褐色为阳性结果,用阳性细胞数进行统计分析。VEGF 染色后胞质呈棕黄色或棕褐色作为阳性结果,用平均光密度进行统计分析。

### 1.4 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 、血管内皮生长因子 mRNA 的逆转录聚合酶链反应检测

提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参,做半定量分析。GAPDH: 上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG, 下游 5'-AGGGC-CATCCACAGTCTTC; VEGF: 上游 5'-CGGCGTCT-CAGTGGTGTT, 下游 5'-CCTTGTGAATCCTCGTTATGGT; HIF-1 $\alpha$ : 上游 5'-CAGTGCAAAGACAGTGTG-GAAG, 下游 5'-CCCTGTATGGTGGTGATGTTGT。目的基因与内标基因分别在两个管中进行扩增。GAPDH 反应条件: 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。VEGF 反应条件: 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 45 s, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。HIF-1 $\alpha$  反应条件: 93 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 32 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 反应产物 6  $\mu$ L 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min, 拍照留取图像, 以扩增目的片段与 GAPDH 的灰度比值表示所扩增的目

的基因片段的相对表达水平。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料两组间比较采用配对  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 斑块易损指数比较

实验中模型组死亡 2 只, PGE1 组、辛伐他汀组各死亡 1 只。RAM11 染色阳性代表斑块内的巨噬细胞, 油红 O 染色阳性代表斑块内的脂质,  $\alpha$ -SMA-actin 染色阳性代表斑块内的平滑肌细胞, 天狼猩红染色阳性代表斑块内的胶原 (图 1)。模型组、PGE1 组、辛伐他汀组斑块易损指数分别为 2.84%  $\pm$  0.59%、1.23%  $\pm$  0.23%、1.04%  $\pm$  0.22%。PGE1 组、辛伐他汀组与模型组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), PGE1 组、辛伐他汀组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。

### 2.2 斑块内新生血管形态学观察及斑块内出血观察

根据 CD31 染色结果, 阳性区域染成黄褐色, 可见连续或不连续的小管腔, 即新生血管 (图 2)。这些新生血管均为毛细血管, 管腔大小不等, 性状不规则, 管壁薄, 多由单个或数个内皮细胞构成, 分布不均匀, 多见于斑块肩部和基底部。模型组斑块内有大量阳性表达, 新生血管密度最高, 平均密度为 0.381  $\pm$  0.062。辛伐他汀组与 PGE1 组斑块内新生血管密度分别为 0.153  $\pm$  0.031、0.146  $\pm$  0.027, 与模型组比较表达量均减少 ( $P < 0.01$ ); PGE1、辛伐他汀组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。

模型组发现 8 只兔斑块内均多处出现红细胞, 红细胞散在或成簇存在, 多位于斑块脂质池内或是靠近纤维帽, 少量分布在斑块基底部。PGE1 组及辛伐他汀组均斑块内出现散在红细胞, 数量和分布范围都远低于模型组 (图 3)。新生血管管腔内存在红细胞, 提示斑块内出血。

表 1. 各组兔腹主动脉新生血管形成、斑块内出血及易损指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Expression of CD31 and hemorrhage and vulnerability index in the plaques of rabbits in three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	CD31 平均光密度	斑块内出血	血栓形成	易损指数
模型组	8	0.381 $\pm$ 0.062	8	2	2.84% $\pm$ 0.59%
PGE1 组	9	0.153 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>	2	0	1.23% $\pm$ 0.23% <sup>a</sup>
辛伐他汀组	9	0.146 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>	2	0	1.04% $\pm$ 0.22% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较。



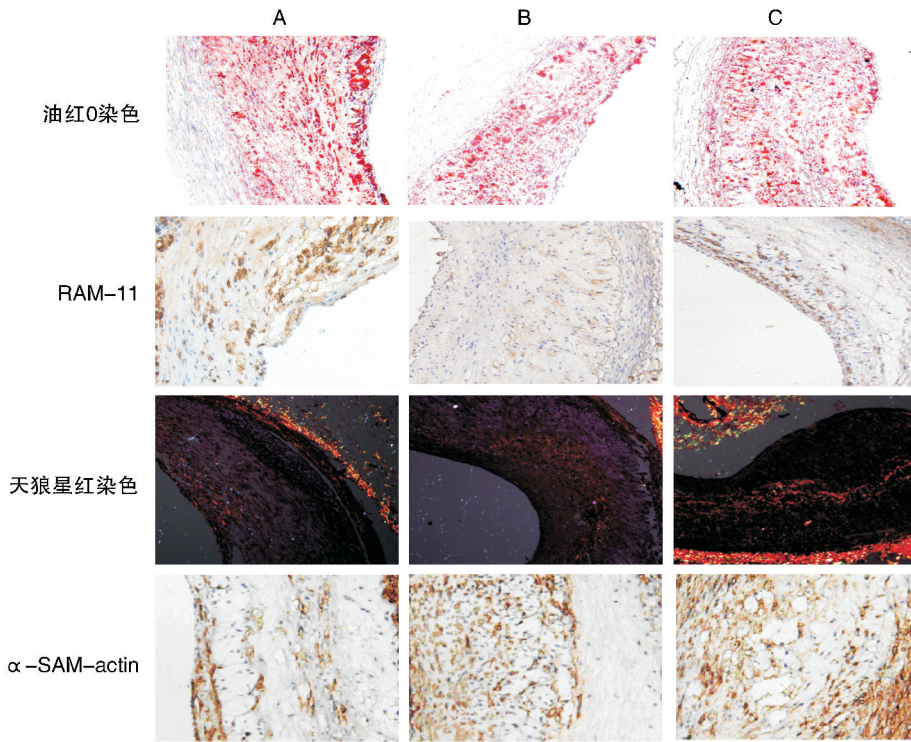


图 1. 斑块组成成分染色 (油红 O 染色、RAM11、 $\alpha$ -SAM-actin, 200  $\times$ ; 天狼星红染色, 100  $\times$ ) A 为模型组, B 为 PGE1 组, C 为辛伐他汀组。

Figure 1. Expression of plaque composition of rabbits in the three groups

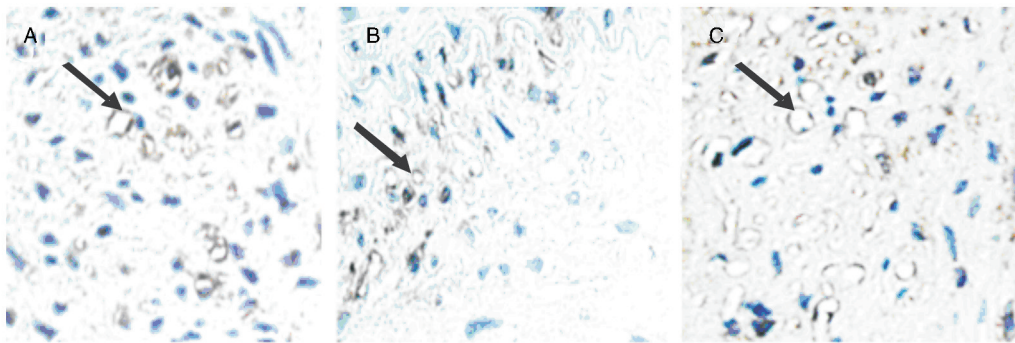


图 2. CD31 免疫组化染色 (400  $\times$ ) A 为模型组, B 为 PGE1 组, C 为辛伐他汀组。

Figure 2. Expression of CD31 of rabbits in the three groups

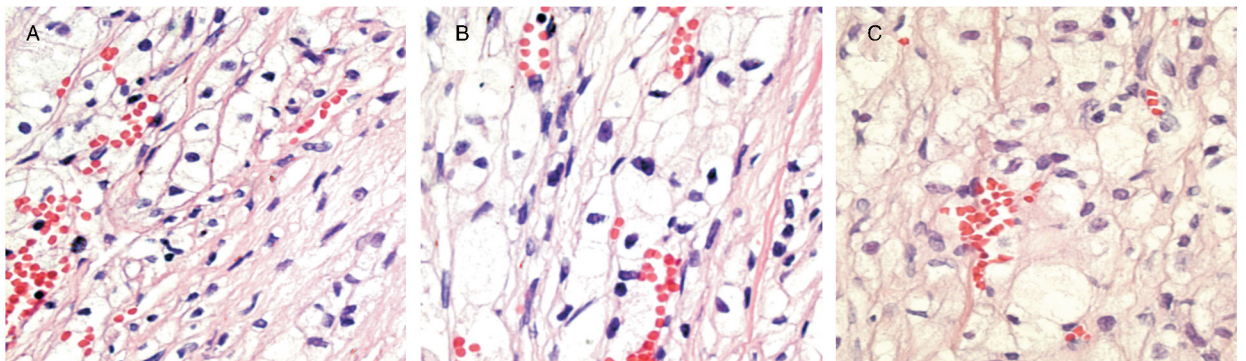


图 3. 各组动物斑块内出血现象比较 (400  $\times$ ) A 为模型组, B 为 PGE1 组, C 为辛伐他汀组。

Figure 3. Hemorrhage in the plaques of rabbits in the three groups

### 2.3 腹主动脉免疫组化结果

腹主动脉 HIF-1 $\alpha$  主要表达于细胞胞核,部分胞质中也有少量表达。模型组胞核表达强烈,胞质也有所表达(图 4)。与模型组比较,PGE1、辛伐他汀组斑块中 HIF-1 $\alpha$  的表达量均有所减少( $P < 0.01$ );PGE1、辛伐他汀组间有显著性差异( $P < 0.05$ )。VEGF:在粥样斑块肩部、基底部分、纤维帽、血管中膜、

外膜均有分布;不仅在巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞胞浆分布,还分在细胞间质和无定形物质(图 5)。模型组表达强烈,PGE1、辛伐他汀组斑块中 VEGF 的表达量较模型组均有所减少( $P < 0.01$ );PGE1、辛伐他汀组间差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ;表 2)。

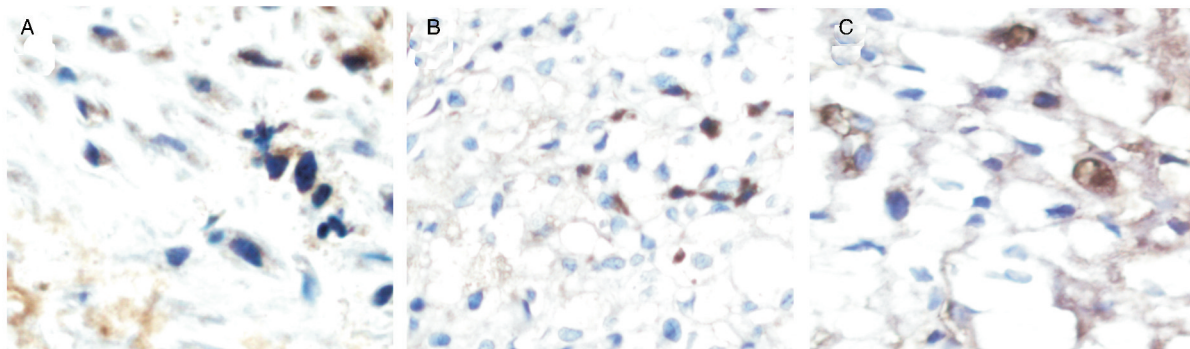


图 4. HIF-1 $\alpha$  免疫组化染色(200 $\times$ ) A 为模型组,B 为 PGE1 组,C 为辛伐他汀组。

Figure 4. Expression of HIF-1 $\alpha$  of rabbits in the three groups

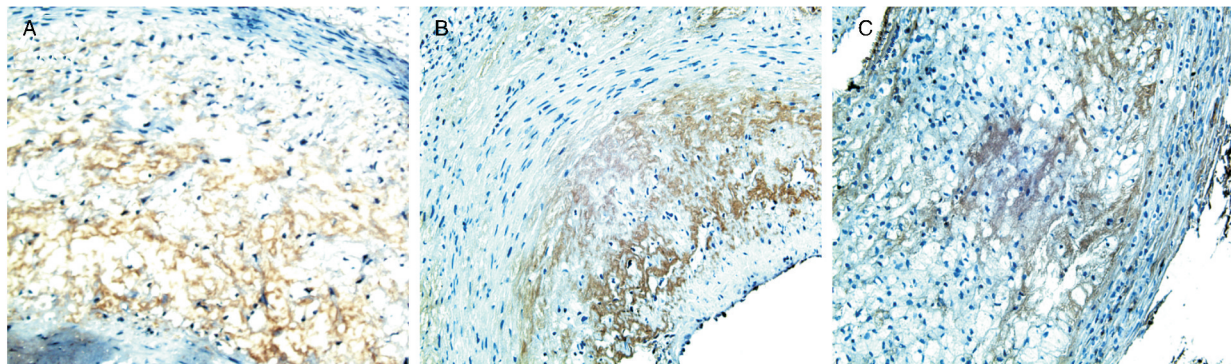


图 5. VEGF 免疫组化染色(200 $\times$ ) A 为模型组,B 为 PGE1 组,C 为辛伐他汀组。

Figure 5. Expression of VEGF of rabbits in the three groups

表 2. 各组兔腹主动脉 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 免疫组化结果( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in plaques of rabbits in the three groups( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	HIF-1 $\alpha$ 阳性 细胞核比例	VEGF 平均 光密度
模型组	8	0.439 $\pm$ 0.044	0.673 $\pm$ 0.084
PGE1 组	9	0.252 $\pm$ 0.032 <sup>ab</sup>	0.396 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>
辛伐他汀组	9	0.163 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.327 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与辛伐他汀组比较。

### 2.4 分子生物学检测

3 组实验动物表达情况:PGE1 组、辛伐他汀组与模型组比较,对 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达起到明显干预作用,表达量出现一定程度的降低( $P < 0.05$ );但

PGE1 组、辛伐他汀组在 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量上有显著差异( $P > 0.05$ ),而在 VEGF mRNA 相对表达量上则不具有显著性差异( $P < 0.05$ ;图 6 和表 3)。

表 3. 各组兔腹主动脉 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 相对表达量( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA in plaques of rabbits in three groups( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	HIF-1 $\alpha$	VEGF
模型组	8	1.183 $\pm$ 0.134	0.468 $\pm$ 0.022
PGE1 组	9	0.706 $\pm$ 0.032 <sup>ab</sup>	0.121 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>
辛伐他汀组	9	0.763 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.116 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与模型组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与辛伐他汀组比较。



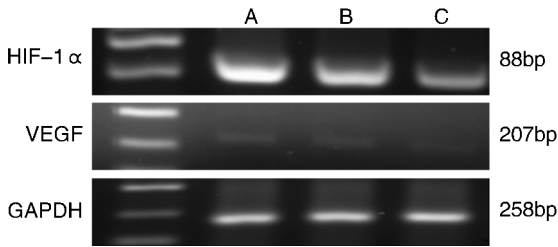


图 6. 各组兔腹主动脉 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  的 RT-PCR A 为模型组, B 为 PGE1 组, C 为辛伐他汀组。

Figure 6. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA in plaques of rabbits in the three groups

### 3 讨论

新生血管本身结构不完整, 内皮细胞连接不紧密, 内皮下缺乏基底膜, 管壁无平滑肌细胞, 具有通透性高和脆性大的特点, 易于炎性分子和脂质浸润<sup>[10]</sup>。这些作用最终导致基质降解, 纤维帽变薄, 进一步加大斑块破裂出血的风险<sup>[11]</sup>。新生血管的形态, 不论肉眼或者镜下都无法直接观察到。通常采用的方法是用一些特殊的内皮标记物来反映新生血管的形态及数量。在微血管形成的研究中, 常用的内皮细胞标记包括 CD31、CD34、vWF 因子<sup>[12,13]</sup>。CD31 是由血管内皮细胞分泌的一种糖蛋白, 正常动脉内膜被一层 CD31 阳性的血管内皮细胞包绕, 新生血管是由血管内皮细胞增殖迁移而来, 因此可以通过 CD31 识别内皮细胞, 检测微血管密度。

实验中观察到多只动物斑块内出现红细胞, 多散在分布于脂质核心中, 也有聚集在较薄的纤维帽附近或分布于纤维帽中, 或者分布于内膜较下层靠近中膜的位置。大的脂质核心以及薄的纤维帽是易损斑块的特征<sup>[14,15]</sup>, 新生血管在易损斑块中出现频率较高。模型组有 4 只动物红细胞集中分布于脂质核心, 2 只分布于纤维帽附近(易损指数 = 2.98%、3.02%), 2 只分布于基底部(易损指数 = 2.82%、2.86%), 且分布部位红细胞数目较多; 而 PGE1 组斑块出血的 2 只动物中, 一只主要分布在脂质核心(易损指数 = 1.31%)中, 一只分布于斑块基底部(易损指数 = 1.24%), 红细胞聚集的数量较模型组少得多; 辛伐他汀组表现出与 PGE1 组相似的现象(易损指数 = 1.08%、1.02%)。发生出血的斑块, 多具有大的脂质核心、薄的纤维帽, 这样的斑块更易于破裂<sup>[16]</sup>, 易损指数也越大, 尤其是出血发生在肩部时。实验中证实出血现象越严重的斑块, 易损指数越高。而用辛伐他汀和 PGE1 干预后, 斑块内出血的位置和范围均较

模型组有明显好转。红细胞可以通过这种不成熟的微血管渗漏到斑块内, 释放血红蛋白, 引起铁沉积, 激活巨噬细胞, 加重斑块内的炎症反应, 产生抵抗新生血管成熟的作用<sup>[16]</sup>。

实验中新生血管的检出用 CD31 进行标记。通过我们的实验结果可以看到进行药物干预后新生血管的生成得到明显的抑制, 并且辛伐他汀和 PGE1 的最终作用效果基本相同。他汀类药物除了明显的降脂作用外, 还存在显著的抗氧化应激损伤, 抑制炎症反应等“多效性”的作用。Wilson 等<sup>[17]</sup>证实, 辛伐他汀可以减少基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及 MMP-9 的分泌, 减少 VEGF 表达, 最终减少新生滋养血管形成。但是还不能确定 PGE1 抑制新生血管表达的机制与辛伐他汀是否相同, 或者辛伐他汀还有没有别的途径来影响新生血管表达。

本研究中, PGE1 组、辛伐他汀组 HIF-1 $\alpha$  表达水平不同, 但 VEGF 表达水平相同, 最终抑制血管新生的能力相当。血管新生受 HIF-1 的调控。HIF-1 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成, 在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$  处于稳定状态并与 HIF-1 $\beta$  亚基结合, 形成二聚体, 正向调节 HIF 依赖途径和多靶点基因, 包括一氮合酶和血管源性血管内皮细胞因子 A<sup>[18]</sup>。VEGF 是血管内皮细胞特异性最强的有丝分裂原, 能特异性作用于血管内皮细胞, VEGF 与激酶受体 (kinase insert domain-containing receptor, KDR) 和血管内皮生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1) (即 Flt-1) 结合后刺激内皮细胞分裂、增殖和迁移, 以芽孢方式加速形成新生血管。将 VEGFR-1 抗体应用于载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 基因缺陷小鼠, 可减少斑块发展, 提高斑块的稳定性<sup>[19]</sup>。综合实验结果, 可知 PGE1 与辛伐他汀均可降低斑块内 HIF-1 $\alpha$  的表达, 但两者降低的程度不同; 在降低斑块内 VEGF 表达方面发挥了相同或相近的作用。PGE1 降低 VEGF 表达, 发挥了抑制血管新生的作用, 该作用与 HIF-1 $\alpha$  的表达降低有关。而辛伐他汀虽然也引起了 VEGF 表达的降低, 发挥了同等程度的抑制血管新生的作用, 但这种作用并不依赖 HIF-1 $\alpha$  的表达降低, 应该还存在其他的作用途径。

为进一步明确作用机制, 我们从分子生物学方面进行探究。逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 显示: PGE1 组、辛伐他汀组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平不同, 但 VEGF mRNA 表达水平近似相同, 在基因表达水平呈现出与蛋白表达平行的现象。可以认为 PGE1 通

过减弱 HIF-1 $\alpha$  基因激活,进而下调 VEGF 的表达,减轻易损斑块血管新生及斑块内出血;而辛伐他汀通过抑制 HIF-1 $\alpha$  基因激活以外的作用,同样降低了 VEGF 的表达,减少斑块内新生血管的生成和减弱斑块内出血。在机制研究方面,曾试图应用 PGE1 受体拮抗剂作为对照,但查阅文献后未发现关于该方面研究的权威报道,因不能明确 PGE1 的特异性受体种类,无法选择适宜的受体拮抗剂,而大量文献报道了辛伐他汀的抑制新生血管作用,故本研究进行了 PGE1 与辛伐他汀作用机制的比较。

综上所述,我们的研究证明,出血越严重的斑块,易损指数越大,越倾向于破裂,且发生部位与斑块易损部位吻合;PGE1 可以通过抑制斑块内新生血管的生成达到稳定斑块的目的,主要机制与抑制 HIF-1 $\alpha$  基因激活,进而下调 VEGF 的表达有关。该机制与辛伐他汀减少易损斑块内新生血管数量的机制存在差别。PGE1 可以作为他汀类的补充,用于临床上动脉粥样硬化的治疗。

#### [参考文献]

[1] Mause SF, Weber C. Immature plaque microvessels as entry portals for leukocytes and erythrocytes in atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(17): 1 528-531.

[2] Marika M, Zampolli A, Scoditti E, et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells; anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 311-320.

[3] 张璐,蒋跃绒,薛梅,等.辛伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块稳定性及斑块内血管新生的影响[J]. *中国科学*, 2009, 54(15): 2 228-232.

[4] Ishikawa O, Kubota Y, Miyachi Y. Prostaglandin E1 suppresses tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 production by lipopolysaccharides-stimulated mononuclear cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 344(1): 95-98.

[5] Fang WT, Li HJ, Zhou LS. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxid [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(4): 485-492.

[6] 白万军,周聊生,李宏建.前列腺素 E1 对兔动脉粥样硬化易损斑块的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(2): 115-120.

[7] Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, et al. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(5): 787-97.

[8] 陈文强,张运,季晓平,等.球囊拉伤致家兔动脉粥样硬化斑块破裂及血栓形成[J]. *中国动脉硬化杂志*,

2005, 12(2): 151-154.

[9] Chen WQ, Zhong L, Zhang L, et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156(6): 941-951.

[10] Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions; relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(17): 1 517-527.

[11] Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor R. Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 45(1): 155-159.

[12] 朱立新,耿小平,范上达.多种血管新生指标在肝细胞肝癌中的表达及敏感性比较[J]. *中华消化外科*, 2003, 2(3): 153-157.

[13] Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma [J]. *Cell Oncol*, 2007, 29(1): 59-66.

[14] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(5): 1 262-275.

[15] Cheruvu PK, Finn AV, Gardner C, et al. Frequency and distribution of thin-cap fibroatheroma and ruptured plaques in human coronary arteries: a pathologic study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(10): 940-949.

[16] Imoto K, Hiro T, Fujii T, et al. Longitudinal structural determinants of atherosclerotic plaque vulnerability: a computational analysis of stress distribution using vessel models and three-dimensional intravascular ultrasound imaging [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(8): 1 507-515.

[17] Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering [J]. *Circulation*, 2002, 105(4): 415-418.

[18] North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors [J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(1): 1-14.

[19] Luttun A, Tiwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt-1 [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 831-840.

(此文编辑 曾学清)