

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0034-04

普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉粥样硬化形成及主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达的影响

张新超, 徐成斌, 王申五

(北京大学第二临床学院人民医院, 北京市 100044)

[关键词] 载脂蛋白 E 缺陷; 动脉粥样硬化; 血管细胞粘附分子-1; 羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂; 小鼠

[摘要] 为观察普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉粥样斑块形成的影响及主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达的影响, 将载脂蛋白 E 缺陷小鼠分为普伐他汀组(每天 10 mg/kg)、辛伐他汀组(每天 5 mg/kg)和阳性对照组(等量生理盐水), 从主动脉血管根部连续切片, 常规 HE 染色, 计算机图像扫描, 分析主动脉粥样硬化斑块的面积和斑块占管腔面积等; 采用免疫组织化学及 Western 杂交方法测定主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达。结果发现, 除降胆固醇作用外, 普伐他汀和辛伐他汀皆延缓斑块形成, 与对照载脂蛋白 E 缺陷小鼠比, 用药组小鼠的主动脉粥样斑块明显缩小; 普伐他汀和辛伐他汀还明显抑制载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁血管细胞粘附分子-1 的表达; 其中 2 药对 14 和 24 周龄小鼠主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达的抑制作用强于 34 周龄小鼠。结果提示, 普伐他汀和辛伐他汀可延缓或缩小载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉粥样斑块的形成, 抑制或下调主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达, 其效果与降胆固醇作用不成比例, 可能是独立于调脂作用以外的抗动脉粥样硬化机制。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Pravastatin and Simvastatin on Atherogenesis and Expression of VCAM-1 on Aortic Intima in ApoE-Deficient Mice

ZHANG Xin-Chao, XU Cheng-Bin, and WANG Shen-Wu

(People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China)

[MeSH] Apolipoproteins E Deficient; Atherosclerosis; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Hydroxymethylglutaryl CoA Reductase Inhibitor; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of fluvastatin and simvastatin on atherogenesis and expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) on aortic intima in ApoE-deficient mice in order to investigate the non-lipid mechanisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on anti-atherosclerosis. **Methods** Under the general feeding, pravastatin (every day 10 mg/kg) and simvastatin (every day 5 mg/kg) were injected into the stomach of ApoE-deficient mice for 4 weeks. The areas of atherosclerotic plaques, and ratio of plaque area to aortic luminal area were detected by histochemistry technique. The expression of VCAM-1 on aortic intima in ApoE-deficient mice was detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Compared with controls, both of pravastatin and simvastatin could delay plaque formation in ApoE-deficient mice and diminish plaque size, and could inhibit VCAM-1 expression on aortic intima, which were inconsistent with their cholesterol-lowering effect. The inhibition of VCAM-1 expression by pravastatin or simvastatin in mice of 10 or 20 weeks old was slightly stronger than that in 30 weeks old mice. There was no significant difference in inhibition of plaque information between pravastatin and simvastatin in view of the dosages used in this study. **Conclusions** The inhibitory effect of pravastatin and simvastatin on atherogenesis of sclerotic lesions may crucially contribute to the clinical benefits of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease. The inhibition of VCAM-1 expression by pravastatin or simvastatin on aortic intima in ApoE-deficient mice may play an important role in the reduction of VCAM-1-dependent monocytes adhesion to endothelium and reflect a new mechanism of statins on anti-atherosclerosis, which is probably independent of lipid regulation.

内皮细胞源性的血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 在介导单核细胞与

血管内皮细胞粘附及其相互作用方面起极其重要的作用, 应用药理途径降低动脉粥样硬化相关细胞粘附分子的表达或功能可阻抑或减慢动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生^[1]。3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂即他汀类药的大规模临床试验已证实, 他汀类药除能有效降低胆固醇外, 还可使斑块消

[收到日期] 2001-06-24

[修回日期] 2001-12-15

[作者简介] 张新超, 男, 1962 年出生, 医学博士, 副主任医师, 现从事急诊医学专业, 主要研究方向为高脂血症、冠心病、心力衰竭基础与临床以及多普勒超声评估房、室间隔缺损的肺、体循环血流动力学, 现在卫生部北京医院急诊科工作(邮编 100730)。

退,进而减少冠心病临床事件的发生及降低心血管病死亡率^[2,3]。我们在研究了他汀类药抑制离体血管内皮细胞表达粘附分子及抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移的基础上^[4,6],利用载脂蛋白 E (apoprotein E) 缺陷小鼠在体观察普伐他汀 (pravastatin, Pra) 和辛伐他汀 (simvastatin, Sim) 对主动脉粥样斑块形成的影响及主动脉壁 VCAM-1 表达的影响,以期进一步探讨他汀类药可能的非调脂抗 As 机制。

1 材料与方法

1.1 分组与取材

选 10~15 周龄 C57BL 小鼠 8 只,雌雄不限,4 只普伐他汀 (Pra) 灌胃,每天 5 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量各 2 只;4 只辛伐他汀 (Sim) 灌胃,每天 2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 剂量各 2 只;灌胃液量为 0.1 mL/10 g 体重。观察 1 周,未发现本实验所给药物浓度对 C57BL 小鼠正常生长有任何不良影响。

载脂蛋白 E 缺陷小鼠 36 只 (雄性,购自北京大学医学部实验动物中心) 分为 14 周龄、24 周龄和 34 周龄 3 个时段,每个周龄段 12 只,又分为 3 组:普伐他汀组 (普拉固,中美上海施贵宝制药有限公司) 4 只,每天 10 mg/kg 灌胃;辛伐他汀组 (舒降之,默沙东中国有限公司) 4 只,每天 5 mg/kg 灌胃,灌胃液量为 0.1 mL/10 g 体重;阳性对照组 4 只,灌等量生理盐水。给药时间 4 周,普通饮食饲养。

14 周龄、24 周龄和 34 周龄时,1% 戊巴比妥 0.5 ~ 1.0 mL 腹腔麻醉小鼠,无菌条件下心脏取血,常规生物化学法测血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC),取主动脉根部血管及胸主动脉置 10% 甲醛固定后病理切片行免疫组织化学检查,腹主动脉段用于 Western 杂交分析。

1.2 常规组织化学检查

主动脉 (窦) 根部连续横断切片,每间隔 5 张取 1 张,HE 染色。切片用 Leica Q550 IW 图像分析仪 Qwin 图像分析处理软件作形态测量分析,每只小鼠血管取 6 张连续切片的均值进行统计学分析。测量值包括血管管腔面积 (LA)、斑块面积 (PA) 和斑块面积与管腔面积之比 (PA/LA)。

1.3 免疫组织化学检查

切片常规脱蜡、脱水,封闭内源性过氧化物酶,微波修复抗原,10% 正常山羊血清封闭。VCAM-1 羊抗多克隆抗体 (Santa Cruz 公司) 的工作液浓度为 20 mg/L;生物素标记 (Biotinylated) 二抗工作液 (Zymed 公司) 1:1 稀释;辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 (HRP-

Streptavidin) 三抗工作液 (Zymed 公司) 1:1 稀释。DAB 显色,苏木素复染,盐酸分色;脱水,封片。计算机图像扫描定量分析 VCAM-1 表达的强弱 (以灰度值表示,每只小鼠血管取 4 张切片的均值)。

1.4 Western 杂交分析

参照文献 [7] 进行。羊抗 VCAM-1 多克隆抗体工作液浓度为 20 mg/L;辣根过氧化物酶标记的抗羊 IgG (1.0 g/L, Vector 公司) 1:100 稀释。部分主要试剂系 Sigma 公司、Fluka 公司或华美公司产品。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 普伐他汀和辛伐他汀降低载脂蛋白 E 缺陷小鼠血浆总胆固醇

从表 1 (Table 1) 可见,载脂蛋白 E 缺陷小鼠血浆 TC 明显升高;普伐他汀和辛伐他汀可显著降低其血浆 TC ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且对 24 周龄和 34 周龄小鼠较高基础 TC 值的降低比例更大,普伐他汀和辛伐他汀之间无显著性差异。

表 1. 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠血浆总胆固醇 (g/L) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)。

Table 1. Reduction of pravastatin and simvastatin on serum TC in ApoE deficient mice (g/L) ($\bar{x} \pm s$).

Weeks	Control group	Pra group	Sim group
14	43.8 \pm 1.7	37.0 \pm 1.6 ^a	35.9 \pm 2.5 ^a
24	52.9 \pm 1.9	38.6 \pm 3.0 ^b	37.3 \pm 1.5 ^b
34	58.5 \pm 2.4	39.6 \pm 2.3 ^b	38.0 \pm 3.7 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉粥样硬化病变形成的影响

14 周龄对照组 2 只载脂蛋白 E 缺陷小鼠可见明显的脂纹病变,2 只正常;而用药组检测血管均未发现明显病变。从表 2 (Table 2) 可见,24 周龄时 3 只对照鼠有斑块形成 (3/4), 而普伐他汀和辛伐他汀组各有 2 只出现小斑块 (2/4)。34 周龄时 4 只对照小鼠与普伐他汀和辛伐他汀组小鼠皆见斑块形成。但与对照组比较,用药组小鼠的主动脉粥样斑块面积及其占管腔面积均明显缩小,其中 2 药对 14 与 24 周龄时动脉粥样斑块形成的抑制作用更为显著,此与其降胆固醇作用无线性关联。此外,就本研究所用药

量, 2 药之间的作用无显著性差异。

表 2. 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉粥样斑块形成的影响。

Table 2. Influence of pravastatin or simvastatin on the atherogenesis in ApoE- deficient mice.

Groups (n)	LA(μm^2)	PA(μm^2)	PA/LA(%)
34 weeks			
Control(4)	386936 \pm 41201	161786 \pm 38041	42
Pra(4)	372291 \pm 30914	99128 \pm 13600 ^a	26 ^a
Sim(4)	397415 \pm 4333	110460 \pm 18927 ^a	28 ^a
24 weeks			
Control(3)	200182 \pm 22710	37873 \pm 3450	19
Pra(2)	188552	11137	6
Sim(2)	191009	10924	6

a: $P < 0.01$, compared with control group.

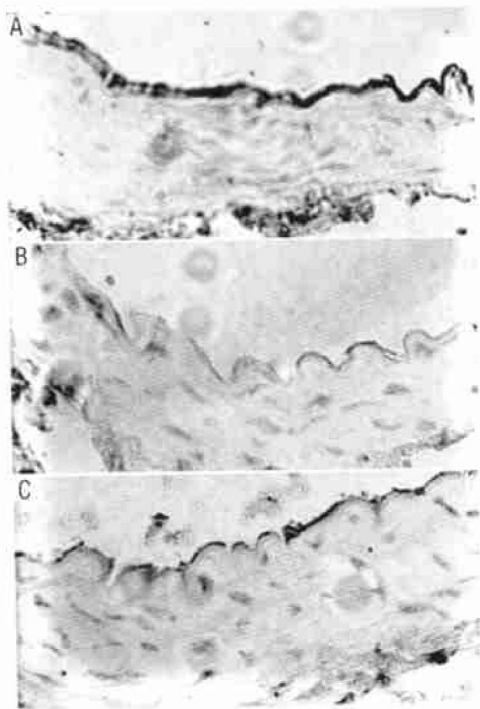


图 1. 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁表达血管细胞粘附分子 1 的影响(免疫组织化学, $\times 200$)。

Figure 1. VCAM-1 expression in aortic wall of 14-week ApoE-deficient mice (immunohistochemistry, $\times 200$). A: High expression in control ApoE-deficient mice; B: Inhibitory effect of pravastatin; C: Inhibitory effect of simvastatin.

2.3 普伐他汀和辛伐他汀对载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁血管细胞粘附分子-1 表达的影响

2.3.1 免疫组织化学结果 从图 1(Figure 1) 可见, 载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁高表达 VCAM-1, 经计算机图像灰度扫描分析, 三个周龄段之间无明

显差异($P > 0.05$)。普伐他汀和辛伐他汀皆可抑制或下调载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁 VCAM-1 的表达($P < 0.05$)。

图像扫描分析显示普伐他汀和辛伐他汀对 14 和 24 周龄鼠主动脉壁 VCAM-1 表达的抑制作用略强于 34 周龄鼠者(图 2, Figure 2), 其抑制(下调)率分别为: 14 周龄 37.45% 和 40.67%, 24 周龄 35.68% 和 33.18%, 34 周龄 21.62% 和 24.87%。

抑制率 = (阳性对照灰度值 - 试验灰度值) / 阳性对照灰度值。

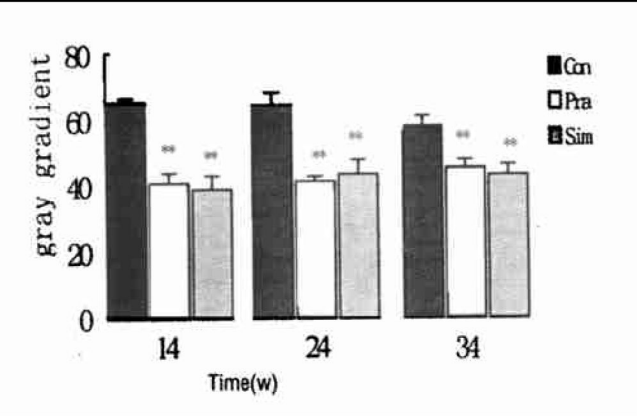


图 2. 普伐他汀和辛伐他汀抑制载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁血管细胞粘附分子 1 表达的图像灰度扫描分析。

Figure 2. VCAM-1 expression in aortic wall of ApoE-deficient mice and inhibitory effect of pravastatin or simvastatin (gray gradient scanning analysis). * : $P < 0.05$

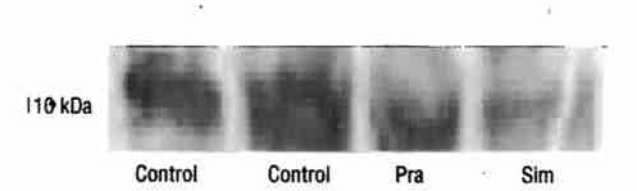


图 3. 普伐他汀和辛伐他汀抑制血管细胞粘附分子 1 表达的 Western 杂交结果。

Figure 3. Inhibitory effect of pravastatin or simvastatin on VCAM-1 expression in aortic wall of ApoE-deficient mice (Western blotting).

2.3.2 Western 杂交结果 由图 3(Figure 3) 可见, 载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁明显表达 VCAM-1, 普伐他汀和辛伐他汀皆可抑制或下调 VCAM-1 的表达。

3 讨论

1992 年利用基因敲除技术成功地复制出载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠^[8,9], 该鼠目前已成为探讨动脉粥样硬化发生、发展的细胞与分子机制和研究治疗手

段的极佳实验动物模型^[10]。已有研究报告,载脂蛋白 E 缺陷小鼠在 5~6 周龄时主要是单核细胞趋附于损伤的内皮细胞处,8~10 周龄出现脂纹,15~20 周龄后逐渐出现纤维斑块,病变部位以主动脉根最为明显,其次为胸主动脉^[11]。本研究采用普伐他汀和辛伐他汀干预,14 周龄载脂蛋白 E 缺陷小鼠的主动脉皆未显示明显异常形态,而 24 周龄段,普伐他汀组和辛伐他汀组各有 2 只(2/4)出现小斑块,且较之对照组用药组小鼠的主动脉粥样斑块面积及斑块占主动脉管腔面积均有减小,提示普伐他汀和辛伐他汀可延缓动脉粥样硬化病变的形成和减慢病变发展,尤其对斑块形成的早期可能有更大的抑制作用,提示临床早期治疗高脂血症对预防和减少心血管事件有更重要的意义。本研究同时发现,14 周龄载脂蛋白 E 缺陷小鼠主动脉壁血管细胞粘附分子-1 的表达即明显增高,而 24~34 周龄鼠的动脉内膜依然高表达 VCAM-1,可能与单核细胞趋附于损伤的内皮细胞(在病变形成早期)以及单核-巨噬细胞浸入斑块(在病变进展期),致病灶活动、纤维斑块不稳定有关^[12]。

本研究还显示,普伐他汀和辛伐他汀对较大周龄载脂蛋白 E 缺陷小鼠较高的血浆 TC 有更显著的降低影响,此与其抑制小周龄鼠早期斑块形成可能有更大作用,因而,他汀类药物的抗动脉粥样硬化机制显然不能以调脂这一主要作用来解释。普伐他汀和辛伐他汀可明显抑制或下调主动脉壁 VCAM-1 表达,其中对 14 和 24 周龄鼠主动脉壁 VCAM-1 表达的抑制作用略强于 34 周龄鼠者,该作用与其降胆固醇效应也无线性相关,却与抑制早期斑块形成的效果相一致。鉴于单核细胞与血管内皮细胞粘附并迁入内皮是动脉粥样硬化形成的一个早期关键事件,我们认为,从 VCAM-1 介导血单核细胞与内皮细胞粘附及其相互作用的角度,他汀类药抑制或下调 VCAM-1 表达可能是该药又一非调脂抗动脉粥样硬化的机制。最近的一项动物实验显示,HMG-CoA 还原酶抑制剂可减少内膜和中膜的巨噬细胞,有益于防止动脉粥样硬化并使斑块趋于稳定^[13]。

高胆固醇血症时,体内超氧化物歧化酶活性降低,氧自由基生成增多,易于发生脂质过氧化,产生脂质过氧化物,这些脂质过氧化物对 LDL 氧化修饰形成 ox-LDL。已有研究证实,载脂蛋白 E 缺陷小鼠也是脂蛋白氧化的良好模型^[14],ox-LDL 可激活血管

内皮细胞核转录因子(NF- κ B)、诱导或上调细胞间粘附分子-1 表达。而最近的几项研究显示,HMG-CoA 还原酶抑制剂可改善 LDL 总的抗氧化能力^[2]。据此推测,载脂蛋白 E 缺陷自发性动脉粥样硬化小鼠主动脉壁 VCAM-1 表达的诱导因素有直接来自于 LDL 的氧化修饰,而普伐他汀和辛伐他汀抑制或下调 VCAM-1 表达可能与其抗氧化性能有关。此外,就本研究所用量,普伐他汀和辛伐他汀的降胆固醇作用及抑制 VCAM-1 表达的作用无明显差异。

总之,HMG-CoA 还原酶抑制剂可抑制动脉粥样硬化斑块形成,降低主动脉壁 VCAM-1 表达,该作用独立于降胆固醇之外,其终效应可能对阻抑 As 病变的发生、发展以及使 As 斑块趋于稳定有一定益处,进而部分解释了他汀类药临床试验所获得的心血管事件及心血管病死亡率的减低。

[参考文献]

- [1] Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1 517-520
- [2] Rosenson BR, Tangney CC. Antiatherogenic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA*, 1998, **279**: 1 643-650
- [3] 张新超,徐成斌. 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂非调脂抗动脉粥样硬化作用. *中国循环杂志*, 2000, **15**: 249-250
- [4] 张新超,徐成斌,高 岚. 氟伐他汀和辛伐他汀对人脐静脉内皮细胞血管细胞粘附分子-1 表达的影响. *中华心血管病杂志*, 2001, **29**: 111-114
- [5] 张新超,徐成斌,张 彤. ox-LDL 和普伐他汀对人脐静脉内皮细胞细胞间粘附分子-1 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 229-232
- [6] 张新超,张 彤,徐成斌,等. 辛伐他汀和西立伐他汀对体外培养血管平滑肌细胞增殖及迁移的影响. *北京大学学报(医学版)*, 2001, **33**: 344-346
- [7] 金冬雁,黎孟枫(译). 分子克隆实验指南,第二版. 科学出版社,1998
- [8] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992, **71**: 343-353
- [9] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992, **258**: 468-471
- [10] Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med*, 1997, **242**: 99-109
- [11] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 133-140
- [12] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 842-851
- [13] Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31**: 684-691
- [14] Calara F, Dimayuga P, Niemann A, et al. An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 884-893

(此文编辑 朱雯霞)