

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0665-04

• 实验研究 •

动脉粥样硬化早期家兔血管丝裂素活化蛋白激酶表达及氯沙坦的干预作用

李爱民, 何作云, 周小波, 覃军, 黄岚, 宋耀明, 祝善俊

(第三军医大学新桥医院心血管内科, 重庆市 400037)

[关键词] 病理学与病理生理学; 氯沙坦对血管丝裂素活化蛋白激酶表达的影响; 免疫细胞化学; 丝裂素活化蛋白激酶; 动脉粥样硬化; 氯沙坦; 家兔

[摘要] 为探讨血管紧张素 AT_1 受体拮抗剂对加速性动脉粥样硬化早期家兔血管增生及丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达的影响,以家兔加速性动脉粥样硬化早期模型为研究对象,采用组织学、免疫细胞化学和生物化学方法评价加速性动脉粥样硬化早期家兔血管组织学、增殖细胞核抗原及丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达和组织胆固醇含量的改变以及口服氯沙坦的干预效应。结果发现,动脉粥样硬化组血管内膜与中膜厚度比值、内膜增殖细胞核抗原阳性细胞数及丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达均显著增加,氯沙坦干预组内膜与中膜厚度比值较动脉粥样硬化组显著下降,增殖细胞核抗原阳性细胞数明显减少,血管壁丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达水平明显下降(P 均 < 0.001),主动脉组织胆固醇含量明显降低($P < 0.05$)。结果提示,服用氯沙坦可明显减轻加速性动脉粥样硬化病变血管内膜增生,抑制血管损伤时血管壁丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达,减少胆固醇在血管壁沉积,从而可能在预防动脉粥样硬化发生中起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Losartan on Expression of Mitogen Activated Protein Kinases and Vessel Proliferation in a Rabbit Model of Early Accelerated Atherosclerosis

LI Ai-Min, HE Zu-Yun, ZHOU Xiao-Bo, QIN Jun, HUANG Lan, SONG Yao-Ming, and ZHU Shan-Jun

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Mitogen Activated Protein Kinase; Losartan; Rabbits; Proliferation Cell Nuclear Antigen; Ratio of Vascular Intimal to Medial Thickness

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Losartan on expression of mitogen activated protein kinases (MAPK) and vessel proliferation in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. **Methods** Aortic cholesterol content, expression of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and MAPK protein were detected by enzymatic analysis and immunohistochemistry.

Results The ratio of vascular intimal to medial thickness, numbers of positive PCNA cells, and expression of MAPK protein in As group significantly increased compared with control group. There was a significant decrease in the ratio of vascular intimal to medial thickness, numbers of positive PCNA cells and expression of MAPK protein ($P < 0.001$) in the Losartan pretreated group.

Aortic cholesterol content in the Losartan pretreated group was significantly decreased compared with As group ($P < 0.05$).

Conclusion Losartan inhibits vascular MAPK expression, intimal proliferation and decreases cholesterol deposit in vascular walls which may play an important role in prevention of atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)早期的主要病理改变是血管内皮损伤、血源性单核细胞迁移至内皮下及血管中膜平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)增殖与向内膜下迁移。丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)是细胞增殖反应过程中信号转导的共同通路与中心环节。研究发现血管紧张素 AT_1 (angiotensin AT_1)可增强

血管 SMC 内 MAPK 活性及促进 SMC 迁移^[1]。血管增生时 MAPK 活性增强^[2],而 Ang AT_1 受体拮抗剂可抑制血管损伤后新生内膜的形成^[3,4],但 Ang AT_1 受体拮抗剂对在体血管 MAPK 表达影响的报道尚少见。本文采用氯沙坦喂饲家兔,观察 Ang AT_1 受体拮抗剂氯沙坦对加速性 As 早期血管内膜增生、主动脉胆固醇含量及 MAPK 蛋白表达的影响,以探讨肾素-血管紧张素系统在 As 发生中的作用及其机制。

[收稿日期] 2003-10-15

[修回日期] 2004-08-10

[作者简介] 李爱民,医学博士,副教授,副主任医师,主要研究方向为冠心病与心力衰竭,E-mail 为 lam1032003@yahoo.com.cn。何作云,硕士,教授,主任医师,博士研究生导师,主要研究方向为冠心病与高血压。周小波,博士研究生,讲师,主治医师,主要研究方向为冠心病与心肌梗死。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康雄性日本长耳白兔 32 只,体重 2.2~

2.5 kg, 由第三军医大学实验动物中心提供。随机将动物分成正常对照组、血管损伤组和氯沙坦干预组, 每组 8 只动物。氯沙坦干预组动物于损伤血管前 48 h 开始予以氯沙坦 10 mg/(kg·d), 由 MSD 公司惠赠。血管损伤组和氯沙坦干预组均于血管损伤术后即予以含 2% 胆固醇及 3% 猪油的高脂饮食, 正常对照组给予普通饮食。术后饲养 1 个月。为观察氯沙坦对平均动脉压的影响, 另选择 8 只雄性健康家兔作使用氯沙坦前后的对照。

1.2 早期动脉粥样硬化模型复制^[4]

以工业氮气导入股动脉以损伤血管内皮。各组动物于手术前或喂食高胆固醇饮食前及宰杀动物前分别抽取静脉血 5 mL, 用于血浆 Ang Ⅱ测定。术后 1 个月抽取静脉血后行血管取材, 液氮冻存留作冰冻切片行 MAPK 免疫细胞化学分析。另一侧血管用 10% 中性缓冲福尔马林—磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 固定, 石蜡包埋, 用于增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 免疫细胞化学及常规 HE 与弹性纤维染色用。采用放射免疫法测定血浆 Ang Ⅱ。取胸主动脉测定组织胆固醇含量, 采用酶法测定血清及组织胆固醇含量。

1.3 血管增殖细胞核抗原表达检测

采用免疫细胞化学 ABC 法, PCNA 试剂盒购自武汉博士德公司, 微波炉修复抗原, 操作按公司提供的说明书进行。标本每间隔 5 mm 作连续切片, 每个标本选择病变最为明显处的切片, 高倍镜下计数每张切片血管内膜及中膜内层 PCNA 阳性细胞数,

每个标本计数 5 张切片, 以每张切片的 PCNA 阳性细胞数来表示增殖状态。

1.4 丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达检测

采用 SP 法。SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品, MAPK 多克隆抗体购自 Sigma 公司, -25℃ 下冰冻恒冷切片, 4% 多聚甲醛—磷酸缓冲液固定、漂洗, 分别先后加入 1:200 的 MAPK 多克隆抗体、1:100 生物素化羊抗兔 IgG 和 1:100 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, DAB 显色, 自来水冲洗终止反应。每张切片随机选取 10 个视野, 在同一外部条件 (同一光源下与放大倍数)、同一灰度范围内 (50~250), 用 Tiger 920 型图像分析仪及其软件测定切片 MAPK 平均吸光度值。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析比较组间差异的显著性。

2 结果

2.1 血管组织学改变

正常对照组血管内皮结构完整, 中膜 SMC 排列整齐 (图 1A, Figure 1A)。血管损伤组可见股动脉内膜厚度明显增宽, 最明显处厚度几乎与中膜相近, 新生内膜中 SMC 密集, 排列紊乱 (图 1B, Figure 1B)。氯沙坦干预组虽可见内膜增生及 SMC 迁移, 但程度较血管损伤组明显减轻 (图 1C, Figure 1C), 且内膜与中膜厚度比值明显降低。



图 1. 兔股动脉 HE 染色 ($\times 120$)

Figure 1. The inhibitory effect of Losartan on proliferation in femoral artery of rabbits

2.2 血浆血管紧张素 Ⅱ含量及血压变化

与正常对照组 (195.7 ± 37.90 ng/L) 比较, 血管损伤组 (236.5 ± 46.4 ng/L) 及氯沙坦干预组 (290.4 ± 48.4 ng/L) Ang Ⅱ明显增高 ($P < 0.05$)。氯沙坦干预组血浆 Ang Ⅱ水平较血管损伤组进一步升高 ($P < 0.05$)。应用氯沙坦前颈动脉平均压为 78.6 ± 2.6 mm Hg, 用药 1 个月后为 76.5 ± 2.5 mm Hg, 前后比

较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.3 血清及组织胆固醇含量

血管损伤组血清胆固醇明显高于正常对照组 ($P < 0.001$)。非高胆固醇饮食家兔单独应用氯沙坦前后血清胆固醇无明显改变。氯沙坦干预组血清胆固醇与血管损伤组比较无明显改变 ($P > 0.05$)。血管损伤组主动脉胆固醇含量明显高于正常对照组

($P < 0.05$), 而氯沙坦干预组主动脉胆固醇含量较血管损伤组明显降低($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

表 1. 氯沙坦对加速性动脉粥样硬化早期家兔血清及主动脉胆固醇含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1. Effects of Losartan on serum and aortic cholesterol contents in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis

分 组	血清胆固醇 (mmol/L)	主动脉组织胆固醇 (mg/g)
正常对照组	2.35 \pm 0.25	1.32 \pm 0.12
血管损伤组	24.74 \pm 3.90 ^b	1.47 \pm 0.15 ^a
氯沙坦干预组	24.15 \pm 3.74 ^b	1.33 \pm 0.13 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.001$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与血管损伤组比较。

2.4 血管增殖细胞核抗原的表达

血管损伤组每张切片 PCNA 阳性细胞数为 232 \pm 25 个(图 2B, Figure 2B), 明显高于氯沙坦干预组(每张切片 78 \pm 13 个; 图 2C, Figure 2C), 正常对照组未见 PCNA 表达(图 2A, Figure 2A)。

2.5 血管组织丝裂素活化蛋白激酶蛋白的表达

正常对照组可见低水平的 MAPK 蛋白表达(图 3A, Figure 3A); 血管损伤组血管壁表达 MAPK 明显增多, 表达部位以新生内膜及中膜内层为主, 外膜仅有少量表达(图 3B, Figure 3B); 氯沙坦干预组 MAPK 表达信号明显低于血管损伤组(图 3C, Figure 3C)。血管损伤组与正常对照组比较明显增高, 而氯沙坦干预组又显著低于血管损伤组($P < 0.001$; 表 2, Table 2)。

表 2. 氯沙坦对血管丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达平均吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effect of Losartan on expression of MAPK protein

分 组	平均吸光度值
正常对照组	0.013 \pm 0.004
血管损伤组	0.056 \pm 0.007 ^a
氯沙坦干预组	0.023 \pm 0.005 ^{ab}

a: $P < 0.001$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.001$, 与血管损伤组比较。

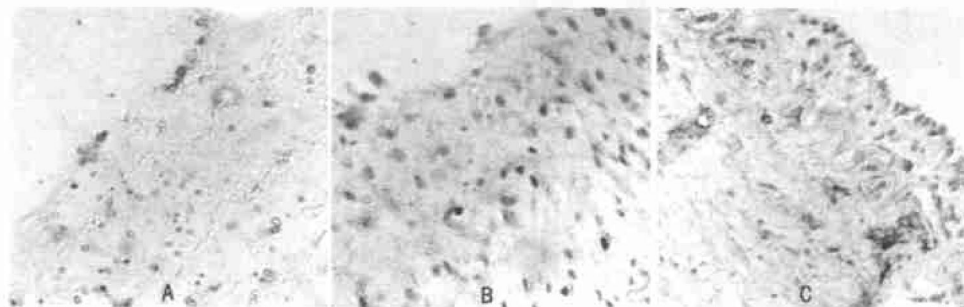


图 2. 各组增殖细胞核抗原表达的变化 ($\times 400$)

Figure 2. Effect of Losartan on expression of PCNA

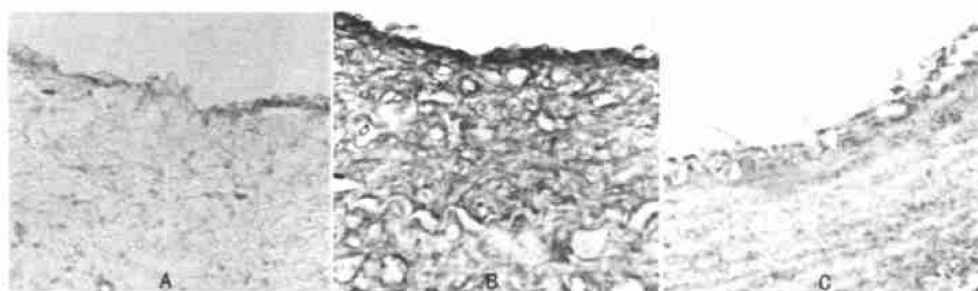


图 3. 各组丝裂素活化蛋白激酶染色变化 ($\times 400$)

Figure 3. Effect of Losartan on expression of MAPK protein in rabbit femoral arteries

3 讨论

损伤反应学说认为, 血管内皮受损是 As 发生的始动环节, 其后早期即有中膜 SMC 增殖及向内皮下

迁移, 导致内膜及中膜结构与功能改变。本实验观察到加速性 As 早期家兔股动脉内皮损伤后新生内膜形成, 其厚度明显增加, 内膜中增殖的 SMC 密集, 排列紊乱, 新生内膜与中膜厚度之比明显增加, 血管

腔呈偏心性狭窄。氯沙坦干预则可明显抑制损伤血管新生内膜的形成,使新生内膜与中膜比值降低,提示氯沙坦在体条件下可抑制早期 As 时血管 SMC 增殖。本实验发现早期 As 时血管壁新内膜与中膜内层 PCNA 阳性细胞数明显增多,而氯沙坦治疗则显著减少血管病变中 PCNA 的表达。PCNA 作为细胞增殖的指标可敏感地反映细胞的增殖活性,PCNA 表达减少意味着细胞增殖活性下降。结合既往血管紧张素转换酶抑制剂预防 As 的研究结果,提示肾素-血管紧张素系统参与了 As 的发生发展过程,而氯沙坦与 SMC 膜上的 AT_1 受体结合,通过拮抗 $Ang \text{ II}$ 的生物学效应而抑制 SMC 迁移与增殖,从而减轻 As 病变的形成。本研究还观察到氯沙坦干预后血浆 $Ang \text{ II}$ 水平进一步增高,这可能是 AT_1 受体受抑制后生物反馈的结果,并不加重 $Ang \text{ II}$ 对机体的损伤。

本研究发现血管损伤后血管壁 MAPK 蛋白表达明显增强,主要定位于内膜与中膜内层,这与 As 病变中内皮细胞、巨噬细胞及增殖 SMC 的分布一致,提示这些表达的 MAPK 可能源于这些细胞。氯沙坦干预组血管 MAPK 表达明显减少,这与国外学者的研究结果相似^[5],提示 MAPK 活性增强可能与 As 时血管 SMC 增殖有关,而应用血管紧张素受体拮抗剂抗可通过减少 MAPK 的生成从而抑制 As 形成。关于 As 发生过程中 MAPK 表达增加的机制目前尚不清楚。有线索表明 Ca^{2+} 、PKC、ox-LDL 及 ox-VLDL 可能介导了 MAPK 表达的过程^[6,7],因为 Ca^{2+} 络合剂、PKC 抑制剂均可抑制血管 SMC 内 MAPK 活性的增高。 $Ang \text{ II}$ 通过细胞膜上的 AT_1 受体介导,经 Ca^{2+} 、PKC 等信号传递与放大,促进原癌基因表达,进而诱

导 MAPK 的形成^[8-10]。

综上所述,氯沙坦可抑制血管 PCNA 及 MAPK 蛋白表达,减轻加速性家兔股动脉早期 As 血管内膜增生,减少胆固醇在血管壁沉积,从而在防治早期 As 的发生与发展中起重要作用。

[参考文献]

- [1] Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKS. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20** (3): 117-122
- [2] 何昆仑, 盖粤, 黄大显, 刘乃奎, 唐朝枢. 小型猪冠状动脉球囊扩张术后 MAPKs 活性及 c-fos mRNA 增加. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (6): 546-549
- [3] Virone-Oddos A, Desangle V, Provost D, Cazes M, Caussade F, Cloarec A. In vitro and in vivo effects of UP269-6, a new potent orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Br J Pharmacol*, 1997, **120** (3): 488-494
- [4] 孙艺红, 黄永麟, 张瑞英, 荆珊. Irbesartan 对动脉粥样硬化血管细胞粘附分子 1 mRNA 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 401-404
- [5] Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz OM, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- κB activation, monocyte chemoattractant protein 1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 1997, **95** (6): 1 532-1 541
- [6] Liu B, Fisher M, Groves P. Downregulation of the ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits intimal hyperplasia in a porcine model of coronary balloon angioplasty. *Cardiovasc Res*, 2002, **54** (3): 640-648
- [7] Yang ZH, Madanova A, Kozai T, Joch H, Aebi U, Luscher TF. Felodipine inhibits nuclear translocation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and human smooth muscle cell growth. *Cardiovasc Res*, 2002, **53** (1): 227-231
- [8] Kurihara M, Chait A, Cader A, Berk BC. Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinase in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 1997, **17** (1): 141-148
- [9] Adams LP, Franklin MT, Raff GJ, Hathaway DR. Activation of mitogen-activated protein kinase in porcine carotid artery. *Circ Res*, 1995, **76** (1): 183-190
- [10] 廖端芳, Berk BC, 关永源. P85 磷酸肌醇-3 激酶-蛋白激酶 C- ζ 复合物对血管紧张素 II 激活平滑肌细胞 P70 核蛋白体 S6 激酶的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 193-198

(此文编辑 文玉珊)