

氯沙坦对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠氧化应激及动脉粥样硬化斑块稳定性的影响

何继强¹, 刘晓惠¹, 王绿娅², 秦彦文², 杜兰萍², 方薇³, 王伟³, 武迎³

(首都医科大学附属北京安贞医院 1. 心内科, 3. 病理科;
2. 北京市心肺血管疾病研究所动脉粥样硬化研究室, 北京市 100029)

[关键词] 病理学; 氯沙坦影响小鼠主动脉粥样斑块稳定性; HE 染色; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠; 氧化应激; 动脉粥样斑块; 氯沙坦

[摘要] 目的 观察血管紧张素 II 型受体拮抗剂氯沙坦对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠氧化应激及主动脉粥样斑块中血管平滑肌细胞、巨噬细胞数量影响, 探讨氯沙坦稳定斑块的作用及可能机制。方法 27 只 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠随机等分三组: 对照组、氯沙坦低剂量组 [5 mg/(kg·d)] 及氯沙坦高剂量组 [25 mg/(kg·d)], 20 周后处死动物。常规生物化学法测定血清一氧化氮含量、超氧化物歧化酶活性、丙二醛及血脂水平; 采用 HE 染色法观察小鼠主动脉粥样硬化病变形成; 免疫组织化学法分析粥样斑块中血管平滑肌细胞和巨噬细胞数量。结果 三组间血脂水平无显著性差异; 与对照组相比, 氯沙坦低、高剂量组血清一氧化氮水平和超氧化物歧化酶活性均明显升高 ($P < 0.01$)、丙二醛水平显著减低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 且氯沙坦低剂量和高剂量组间也有明显差异 ($P < 0.01$); 氯沙坦干预后动脉粥样斑块纤维帽厚, 脂质核心小; 氯沙坦治疗组斑块中平滑肌细胞数量显著增加 ($P < 0.01$)、巨噬细胞数量明显降低 ($P < 0.01$), 且氯沙坦高剂量组较较低剂量组作用更明显 ($P < 0.01$)。结论 氯沙坦在不影响血脂水平情况下, 可通过减轻载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠氧化应激, 增加斑块中平滑肌细胞数量, 降低巨噬细胞数量, 可能起到稳定粥样斑块作用, 且随剂量增加作用增强。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

The Effects of Losartan on Oxidative Stress and Stability of Atheromatous Plaque in Apolipoprotein E Gene-Deficient Mice

HE Ji-Qiang¹, LIU Xiao-Hui¹, WANG Lu-Ya², QIN Yan-Wen², DU Lan-Ping², FANG Wei³, WANG Wei³, and WU Ying³
(1. Department of Cardiology, 3. Department of Pathology, Beijing Anzhen Hospital; 2. Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E Gene-Deficient Mice; Oxidative Stress; Atheromatous Plaque; Losartan; Vascular Smooth Muscle Cell; Macrophage

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of losartan on oxidative stress and the contents of vascular smooth muscle cells (VSMC) and macrophages in aortic atheromatous plaques of apolipoprotein E gene-deficient (Apo E^{-/-}) mice. **Methods** Twenty seven Apo E^{-/-} mice were randomly divided into three groups: control group, low dose losartan group [5 mg/(kg·d)] and high dose losartan group [25 mg/(kg·d)]. The period of administration was 20 weeks. Serum nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and serum lipids were measured by routine biochemical method. Aortic paraffin slice were prepared for histomorphological observation. The contents of VSMC and macrophages were detected by immunohistochemical method. **Results** There were no significant difference in serum lipids among three groups. Comparing with the control group, serum NO levels of the two treatment groups were significantly increased ($P < 0.01$), the activity of SOD was notably enhanced ($P < 0.01$), content of MDA was markedly decreased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). There were also significant differences between the two treatment groups ($P < 0.01$). The atheromatous plaques of the two treatment groups contained some thick fibrous caps and little lipid cores. The contents of VSMC in the two treatment groups were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). On the contrary, macrophages were notably lower than that of control group ($P < 0.01$). Meanwhile, there were also significant differences between the two treatment groups ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). **Conclusions** Without affecting the serum lipids, losartan can attenuate oxidative stress in Apo E^{-/-} mice and stabilize atheromatous plaque by means of increasing the content of VSMC and reducing macrophages.

[收稿日期] 2005-06-21 [修回日期] 2006-03-10

[作者简介] 何继强, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础和临床诊治, E-mail 为 Hejqiang@sina.com.cn。刘晓惠, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病和心脏电生理研究与诊治。王绿娅, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化病理生理学。

大量研究发现, 肾素-血管紧张素系统和氧化应激参与了动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的形成和发展过程^[1,2]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是一个较强氧化应激的激动剂, 通过与其 1 型受

体结合抑制血管内皮细胞一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成和活性,产生过量氧自由基,使体内 NO-氧自由基之间平衡倾向于氧化应激状态^[3]。临床研究表明,在人粥样硬化的冠状动脉组织中 Ang Ⅱ及其 1 型受体水平明显增高,且 Ang Ⅱ参与动脉粥样斑块破裂过程,用 Ang Ⅱ型受体拮抗剂氯沙坦可降低不稳定型心绞痛、心肌梗死的发生率及死亡率,具体机制尚不清楚,推测其中一个重要原因可能与其稳定粥样斑块有关^[4,6]。许多研究证实,斑块中平滑肌细胞和巨噬细胞在斑块的稳定性方面发挥重要作用。本实验通过观察氯沙坦对载脂蛋白 E 基因缺陷 (apolipoprotein E gene deficiency, ApoE^{-/-}) 小鼠氧化应激及动脉粥样斑块中平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 和巨噬细胞数量的影响,初步探讨氯沙坦稳定斑块的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

8 周龄雄性载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠 27 只,体重 20.4±2.3 g(购自北京大学医学部动物实验中心),随机分为三组:对照组、氯沙坦低剂量组[5 mg/(kg·d)]及氯沙坦高剂量组[25 mg/(kg·d)](氯沙坦由美国默沙东公司馈赠)每组 9 只。选择这两种剂量是参考国外相关文献,该剂量对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠安全,但对 As 的影响结果报道不一致。治疗组以相应药物灌胃,对照组等量生理盐水灌胃,各组均以普通饮食饲养,饮水不限,实验时间 20 周。饲养第 3 周,对照组 1 只小鼠死亡,死亡原因可能与脑水肿有关。

1.2 样品采集

处死前 12 h 禁食禁饮,1% 戊巴比妥 0.5~1.0 mL 腹腔麻醉,无菌条件下眼眶取血,离心后待测。

1.3 血脂测定

用意大利 SABA-18 全自动生化分析仪测定血清脂质代谢指标。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)采用酶法测定,试剂为北京中山生物工程技术有限公司产品,用 Friedwald 公式计算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平。每次测定时,加测质控血清。

1.4 血清一氧化氮、丙二醛水平及超氧化物歧化酶活性测定

用硝酸还原酶法测定 NO₃⁻ 和 NO₂⁻ 总量代表 NO 含量,黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(su-

peroxide dismutase, SOD) 活性,硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量,试剂为南京建成生物工程研究所产品,均按试剂盒说明书操作。

1.5 病理形态学观察

用 1% 戊巴比妥 0.5~1.0 mL 腹腔麻醉后,左胸切口,经左心室用生理盐水灌洗,至损伤的右心耳流出液清亮为止。经主动脉灌注 4% 多聚甲醛固定,取心脏及主动脉根部,常规脱水,石蜡包埋,从主动脉根部起始制成 5 μm 厚度连续切片,作苏木素伊红染色。用 OLYMPUS BX40 显微镜进行形态学观察。

1.6 免疫组织化学检测

取含粥样斑块的石蜡切片,用二甲苯脱脂和梯度乙醇脱水;3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,蒸馏水洗 3 次;微波修复抗原:将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0),微波炉加热,96℃~98℃,强火 3 min,低火维持 10 min,自然冷却至室温。PBS(pH7.2~7.4)洗涤 1~2 次;滴加 10% 正常羊血清封闭液,室温 20 min,甩干;滴加兔抗 SMA 多克隆抗体(1:400 稀释)、兔抗 CD68 多克隆抗体(1:200 稀释),4℃过夜。PBS 洗涤 2 min×3 次;滴加生物素化羊抗小鼠 IgG,室温 30 min。PBS 洗涤 2 min×3 次;滴加试剂 SABC,室温 30 min。PBS 洗涤 5 min×4 次;DAB 显色,室温 3~5 min,自来水终止显色反应;苏木素轻度复染胞核 8 s;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,镜下观察。平滑肌细胞和巨噬细胞阳性着色均表现为胞质染成浅黄色、棕黄色或棕褐色。每只动物取 3 张切片,每张切片取 10 个视野,以每一高倍镜视野下阳性表达的细胞占总细胞的百分比为衡量标准。兔抗 SMA 多克隆抗体、兔抗 CD68 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,用北京航空航天大学图像中心研制的 CIMA 多功能真彩色病理图像分析系统软件。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS10.0 统计软件。采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 氯沙坦对血脂的影响

氯沙坦对载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠血清 TC、TG、HDLC 及 LDLC 无明显影响,三组间也无显著性差异(表 1)。

2.2 氯沙坦对一氧化氮、丙二醛和超氧化物歧化酶的影响

与对照组相比,氯沙坦低、高剂量组均能显著升

高 NO 和 SOD 水平 ($P < 0.01$), 同时降低丙二醛水平 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 且两治疗组之间也有明显差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1. 氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠血脂的影响 (mg/L)

| 指标 | 对照组 ($n = 8$) | 氯沙坦低剂量组 ($n = 9$) | 氯沙坦高剂量组 ($n = 9$) |
|------|--------------------|------------------------|------------------------|
| TC | 4 430.2 ± 68.2 | 4 560.6 ± 70.1 | 4 470.7 ± 69.7 |
| TG | 1 861.5 ± 30.2 | 1 774.6 ± 32.4 | 1 801.4 ± 33.2 |
| HDLc | 1 230.6 ± 22.5 | 1 201.7 ± 28.6 | 1 141.2 ± 30.7 |
| LDLC | 2 612.4 ± 56.2 | 3 421.5 ± 70.1 | 3 601.7 ± 66.8 |

2.3 病理形态学改变

三组小鼠主动脉管腔均可见典型的纤维斑块及

粥样斑块形成, 但对照组管壁弥漫性增厚, 斑块体积较大, 融合成片, 管腔较狭窄, 形成的粥样斑块多纤维帽薄, 脂质核心大, 符合易损斑块形态学特点; 而氯沙坦治疗组斑块病变较局限, 管腔狭窄程度较轻, 形成的粥样斑块多纤维帽厚, 脂质核心小, 斑块趋于稳定(图 1)。

表 2. 氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠一氧化氮、丙二醛和超氧化物歧化酶的影响

| 分 组 | n | NO (mmol/L) | SOD (ku/L) | 丙二醛 (mmol/L) |
|---------|-----|----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 8 | 1.92 ± 1.42 | 250.34 ± 7.28 | 30.44 ± 11.01 |
| 氯沙坦低剂量组 | 9 | 9.45 ± 2.01 ^b | 297.12 ± 6.38 ^b | 13.46 ± 4.08 ^a |
| 氯沙坦高剂量组 | 9 | 16.78 ± 2.94 ^{bc} | 350.44 ± 11.75 ^{bc} | 7.66 ± 2.13 ^{bc} |

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与氯沙坦低剂量组比较。

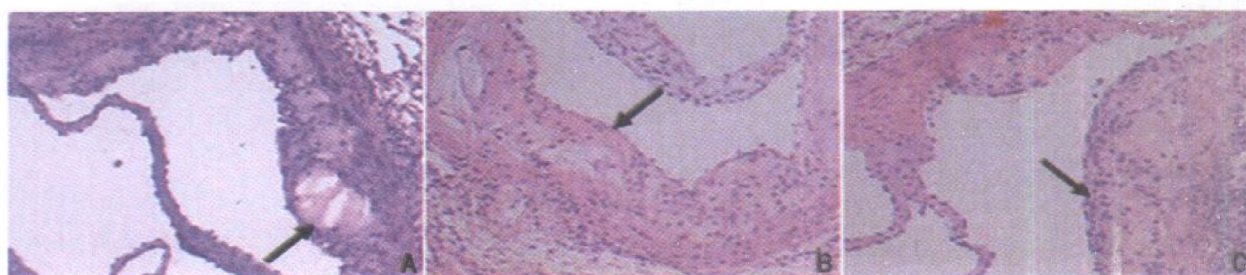


图 1. 载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉根部病变形态学观察 ($\times 100$)

A 为对照组, B 为氯沙坦低剂量组, C 为氯沙坦高剂量组。

2.4 免疫组织化学改变

与对照组相比, 氯沙坦组主动脉斑块内 VSMC 数量显著增加 ($P < 0.01$), 且高剂量组较低剂量组明显增多 ($P < 0.01$)。氯沙坦组斑块内巨噬细胞数量较对照组显著减少 ($P < 0.01$), 且高剂量组较低剂量组明显减少 ($P < 0.05$; 图 2、3 和表 3)。

表 3. 氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉斑块血管平滑肌细胞和巨噬细胞数量的影响

| 分 组 | n | VSMC | 巨噬细胞 |
|---------|-----|------------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 8 | 15.02% ± 1.60% | 22.37% ± 2.16% |
| 氯沙坦低剂量组 | 9 | 21.18% ± 0.70% ^a | 15.10% ± 0.70% ^a |
| 氯沙坦高剂量组 | 9 | 25.53% ± 1.67% ^{ac} | 13.99% ± 0.98% ^{ab} |

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与氯沙坦低剂量组比较。



图 2. 氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样斑块内血管平滑肌细胞数量的影响 ($\times 400$)

A 为对照组, B 为氯沙坦低剂量组, C 为氯沙坦高剂量组。

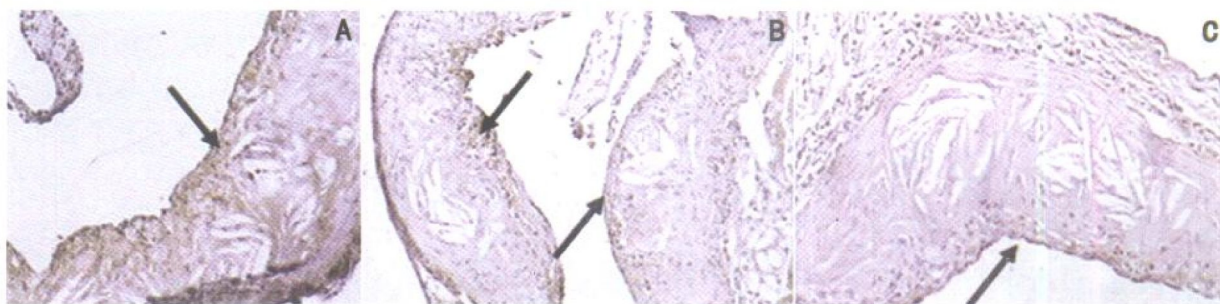


图3. 氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠主动脉粥样斑块内巨噬细胞数量的影响 ($\times 400$) A 为对照组, B 为氯沙坦低剂量组, C 为氯沙坦高剂量组。

3 讨论

研究表明氧化应激也是导致心血管系统结构、功能异常的重要原因之一^[2], As 作为一个慢性炎症性病变, 由血管氧化应激始动并加剧。氧化应激是指由于氧自由基过量生成和/或细胞内抗氧化防御系统受损, 导致氧自由基及其相关代谢产物过量聚集, 从而对细胞产生多种毒性作用的病理状态^[7]。本研究选择 NO、SOD 和丙二醛来作为评价氯沙坦对载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠氧化应激影响的指标。NO 是由血管内皮细胞分泌的血管活性分子, 能够舒张血管, 抑制炎症细胞与内皮细胞的粘附, 同时可抑制氧自由基生成, 是阻止 As 发生、发展的重要内皮保护因子。SOD 为酶性抗氧化物质, 能清除超氧阴离子, 保护细胞免受损伤, 通过测定 SOD 活性的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。丙二醛是脂质过氧化代谢产物, 测定丙二醛水平可间接反映出细胞受氧自由基损伤的程度。Hornig 等^[8] 研究表明, 氯沙坦可增加冠心病患者血浆 NO 生物利用度, 降低氧化应激, 改善内皮功能。泉银霞等^[9] 研究发现, 氯沙坦可显著降低冠心病患者血浆氧化修饰 LDL 与丙二醛水平。本研究结果表明, 在不影响血脂水平情况下, 氯沙坦能显著升高 NO 水平和 SOD 活性, 使体内抗氧化防御能力增强; 减低丙二醛水平, 使氧化能力减弱, 从而减轻小鼠氧化应激。

易损斑块表面的糜烂、腐蚀、溃疡性病变或破裂及随后血栓形成是急性冠状动脉综合征的主要原因^[10]。因此, 如何采取有效手段稳定易损斑块成为近年来冠心病研究的重要方向。目前关于他汀类药物对粥样斑块稳定性影响的研究较多^[11], 而 Ang ET 型受体拮抗剂主要应用高血压、心力衰竭的治疗, 至于对动脉粥样斑块稳定性方面的研究较少。最近临床研究证实^[5,6], Ang ET 及其受体可在发生急性冠状动脉综合征之前升高, 表明 Ang ET 参与动脉粥样斑

块破裂过程, 用氯沙坦治疗可降低心血管疾病患者急性冠状动脉综合征发生率, 具体机制尚不清楚, 推测其中一个重要原因可能与其稳定易损斑块有关。易损斑块的特点是^[10,12]: 大的脂核, 薄的纤维帽中胶原和 VSMC 较少, 较多的炎性细胞(主要是巨噬细胞)浸润及细胞外基质减少等。本研究结果发现, 氯沙坦干预后主动脉粥样斑块病变较局限, 管腔狭窄程度较轻, 且形成的粥样斑块纤维帽厚, 脂质核心小, 斑块趋于稳定。

研究表明, 斑块纤维帽变薄是斑块破裂的内在主要原因^[13]。VSMC 是构成纤维帽的重要成分, 同时可合成细胞外基质, 因此, 增加易损斑块中 VSMC 数量, 可增加纤维帽的厚度和强度, 对稳定斑块起到一定的作用。本研究结果发现, 氯沙坦干预后小鼠主动脉粥样斑块中 VSMC 数量显著增多, 增加了斑块稳定性。谈红等^[14] 研究发现, 氯沙坦可促进斑块中 VSMC 凋亡增加, 导致 VSMC 数量减少, 与本研究结果相矛盾, 分析原因可能在于谈红等研究目的是了解氯沙坦对 As 形成早期的影响, 而本研究主要着眼于氯沙坦对 As 后期粥样斑块中 VSMC 影响, 因为在 As 发展不同时期, Ang ET 对 VSMC 影响不同^[15]。

斑块中巨噬细胞在粥样斑块的稳定性方面同样发挥重要作用。一方面, 巨噬细胞能够产生活性氧中间产物, 损伤内皮细胞, 同时, 巨噬细胞分泌大量活性基质金属蛋白酶, 降解斑块中的胶原和细胞外基质, 使纤维帽变薄, 斑块易损性增加; 另一方面, 斑块内巨噬细胞可促进 VSMC 凋亡使其数量减少, 增加了斑块不稳定性^[16]。本研究发现, 氯沙坦可使小鼠主动脉粥样斑块中巨噬细胞数量显著减少, 可能起到稳定斑块作用。

本研还比较不同剂量氯沙坦对氧化应激和动脉粥样斑块的影响情况。结果显示, 高剂量氯沙坦减轻氧化应激和增加斑块中 VSMC 数量、减少巨噬细

胞数量的作用比低剂量更强。

另外,本研究结果发现,氯沙坦在不影响血脂水平情况下,减轻载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠氧化应激,同时可增加斑块中 VSMC 数量,减少巨噬细胞数量,推测氯沙坦可能有稳定动脉粥样斑块的作用,且该作用与调节血脂作用无关,但需进一步研究明确。

综上所述,本实验初步探讨氯沙坦通过减轻氧化应激和增加斑块中 VSMC 数量、减少巨噬细胞数量而可能起到稳定斑块的作用,为该类药物在临床上应用于急性冠状动脉综合征治疗提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 何继强,王绿娅,刘晓惠. 血管紧张素 α 与动脉粥样硬化形成的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (3): 360-362
- [2] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidant stress in cardiovascular diseases[J]. *J Hypertens*, 2000, **18** (6): 655-673
- [3] Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin α in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1 845-851
- [4] Gross CM, Gerbaulet S, Quensel C, Kramer J, Mittelmeier HO, Luft FC, et al. Angiotensin α type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis[J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, **97** (4): 327-333
- [5] Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG, et al. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,

2003, **23**: 440-446

- [6] Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAL randomized trial[J]. *Lancet*, 2002, **360**: 752-760
- [7] Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress[J]. *Clin Cardiol*, 1997, **20** (suppl ③): 11-17
- [8] Hornig B, Landmesser U, Kohler C, Ahlersmann D, Spiekermann S, Christoph A, et al. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin α type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: Role of superoxide dismutase[J]. *Circulation*, 2001, **103**: 799-805
- [9] 晁银霞. 氯沙坦对冠心病患者血浆氧化修饰低密度脂蛋白的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2004, **13** (6): 329-331
- [10] Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definition and risk assessment strategies: part I and part •[J]. *Circulation*, 2003, **108**: 1 664-672
- [11] 张敏,陈桢月,陆国平,吴春芳. 辛伐他汀对内皮细胞株 ECV-304 细胞分化抗原 40 诱导表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11** (3): 234-237
- [12] 周俊,陆国平. 动脉粥样硬化斑块的临床检测[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (2): 178-182
- [13] Shak PK. Role of inflammation and metalloproteinases in disruption and thrombosis[J]. *Vas Med*, 1998, **3** (3): 199-206
- [14] 谈红,潘其兴,魏敏,赵爱贞,曾林. 氯沙坦和卡托普利对兔动脉粥样斑块形成的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, **24** (4): 421-24
- [15] Woodside KJ, Hernandez A, Smith FW, Xue XY, Hu M, Daller JA, et al. Differential gene expression in primary and recurrent carotid stenosis[J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2003, **302**: 509-514
- [16] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, **3** (1): 63-68

(此责任编辑 文玉珊)