文章编号:1000-5404(2008)10-0917-04

论著

不同剂量厄贝沙坦对兔主动脉粥样硬化中环氧合酶2的影响

李骊华,雷 寒 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

摘 要:目的 检测环氧合酶-2(COX-2)在兔主动脉粥样硬化(AS)中的表达,探讨血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)-1型受体拮抗剂厄贝沙坦(Irbesartan, Irb)对COX-2表达的影响及其可能的抗AS效应。**方法** 健康雄性新西兰兔30只,按随机数字表法分为对照组、高胆固醇组(HC)、小剂量Irb(Sirb)组(10 mg·kg^{-1}·d^{-1})、中剂量Irb(Mirb)组(20 mg·kg^{-1}·d^{-1})和大剂量Irb(Lirb)组(30 mg·kg^{-1}·d^{-1}),每组6只。喂养14周后,取各组兔主动脉,行AS斑块面积及主动脉内膜/中膜值测定,采用RT-PCR、免疫组化和Western blot法分别检测主动脉AS斑块中COX-2 mRNA和蛋白的表达。**结果** Lirb和Mirb组AS斑块面积均较HC组显著缩小[分别为(14.84±2.51)%和(33.77±3.53)%比(61.74±4.33)%, $P<0.01$]。Lirb和Mirb组内膜/中膜值较HC组明显减小[分别为(0.11±0.07)和(0.50±0.08)比(0.92±0.07), $P<0.01$]。HC组COX-2 mRNA的表达较对照组显著增强[(1.01±0.04)比(0.024±0.01), $P<0.01$];Lirb和Mirb干预后COX-2 mRNA的表达量明显下降[分别为(0.24±0.03)和(0.47±0.05), $P<0.01$]。14周时HC组主动脉AS斑块中COX-2蛋白表达明显增强,Mirb和Lirb干预后显著降低[免疫组化分别是(0.81±0.06)比(0.47±0.10)和(0.14±0.02)($P<0.01$),Western blot分别是(1.10±0.05)比(0.89±0.02)和(0.51±0.04)($P<0.01$)]。**结论** COX-2参与AS的发生和发展,中剂量和大剂量Irb均能降低AS斑块中COX-2的表达而抗AS,Irb对AS的有益作用可能是通过抑制COX-2表达实现的。

关键词: 动脉粥样硬化; 环氧合酶-2; 厄贝沙坦
中图法分类号: R446.6;R543.5;R972 **文献标识码:** A

Effect of Irbesartan on cyclooxygenase-2 in aortic atherosclerotic lesion in rabbits

LI Li-hua, LEI Han (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effect of angiotensin Ⅱ type 1 receptor antagonist Irbesartan on the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit model of atherosclerosis. **Methods** Thirty male New Zealand rabbits were randomly divided into five groups: normal control group, high cholesterol group (Group HC), 10 mg·kg^{-1}·d^{-1} Irbesartan group (Group S), 20 mg·kg^{-1}·d^{-1} Irbesartan group (Group M), 30 mg·kg^{-1}·d^{-1} Irbesartan group (Group H). Except the control group, the other four groups were fed with high cholesterol diet to induce atherosclerosis for 14 weeks. Then, the size of aortic atherosclerotic lesions and the ratio of aortic tunica intima to media were measured. RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting were used for COX-2 mRNA and protein levels respectively. **Results** Compared with Group HC, atherosclerotic lesion size was markedly reduced in Groups M and H ($P<0.01$). Compared with Group HC, the ratio of aortic tunica intima to media was significantly reduced in Groups H and M ($P<0.01$). COX-2 mRNA expression was significantly higher in Group HC than that of control group, groups H and M ($P<0.01$). COX-2 protein was higher in Group HC than that in Groups M and H ($P<0.01$). **Conclusion** COX-2 participates in the genesis and development of atherosclerosis. Irbesartan at certain dosage can decrease the expression of COX-2.

Key words: atherosclerosis; cyclooxygenase-2; Irbesartan

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种炎症性疾病,炎症参与了AS斑块的形成和进展。环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)是前列腺素(组织源性炎症介质)合成的限速酶,其表达受多种促炎因子的诱导。研究证实人类冠状动脉粥样斑块可见COX-2的广泛表达[1],COX-2能促进AS[2]。

在人的动脉粥样斑块及单核细胞中可以检测到血

基金项目:重庆医科大学科研课题(2007013)
Supported by the Research Funds of the Chongqing Medical University (2007013)
作者简介:李骊华,女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)89012010, E-mail: lilihua926@163.com
通信作者:雷 寒,电话:(023)89012010
收稿日期:2007-12-13;修回日期:2008-01-08

管紧张素Ⅱ(AngⅡ),并且 AT_1R 表达上调[3],提示AngⅡ与早期AS血管炎症反应相关。本研究通过高胆固醇饮食建立兔AS模型,并用AngⅡ-1型受体(angiotensinⅡ type 1 receptor, AT_1R)阻断剂厄贝沙坦(Irbesartan,Irb)干预,观察其对AS病变及COX-2表达的影响,从而探讨不同剂量厄贝沙坦的抗AS作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

30只3~4月龄健康雄性新西兰大白兔,体质量2.0~2.5 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。称体质量和采耳缘静脉血后用随机数字表法分为5组,每组6只:①正常对照组(NC),喂以普通饲料;②高胆固醇组(HC),喂以高脂饲料(胆固醇:猪油:普通饲料=1:5:94);③大剂量Irb组(Lirb),喂以高脂饲料和Irb 30 mg·kg^{-1}·d^{-1};④中剂量Irb组(Mirb),喂以高脂饲料和Irb 20 mg·kg^{-1}·d^{-1};⑤小剂量Irb组(Sirb),喂以高脂饲料和Irb 10 mg·kg^{-1}·d^{-1}。每只兔摄入饲料约50 mg·kg^{-1}·d^{-1}。Irb(赛诺菲安万特民生公司)溶于0.5%羧甲基纤维素钠中按1 ml/kg灌胃,1次/d,持续14周,14周末复测体质量和采血后处死动物。Irb剂量选择参照"人与实验动物药物剂量的换算方法"[4]。

1.2 血脂检测

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)用日立7170A全自动生化分析仪进行自动检测。

1.3 血浆AngⅡ水平测定

AngⅡ测定采用放射免疫法,按试剂盒说明书操作(北京原子高科股份有限公司)。

1.4 标本处理

麻醉状态下(速眠新0.2~0.4 ml/kg),将主动脉从根部分离至肾动脉开口处离断,纵行剖开主动脉,取主动脉根部至主动脉弓部迅速冻存于液氮罐中,以备行COX-2 mRNA和Western blot检测。另取主动脉远端2.0 cm纵向剖为2份,1份做冰冻切片,部分存于-80 ℃,以备COX-2免疫组化分析;另1份置于4%多聚甲醛液中固定24 h,石蜡包埋,切片,HE染色观察。

1.5 组织形态学观察

1.5.1 主动脉斑块的病变分级 用北航CM-2000B生物医学图像分析系统分析主动脉大体标本内膜AS斑块面积大小(即斑块面积占主动脉总面积的百分比)。

主动脉斑块的病变分级[5]:0级:无病变;Ⅰ级:病变占1%~25%;Ⅱ级:病变占26%~50%;Ⅲ级:病变占51%~75%;Ⅳ级:病变占76%~100%。

1.5.2 内膜/中膜值 HE染色,光镜观察内膜、中膜的病理变化,采用北航CM-2000B生物医学图像分析系统进行分析,每个标本分析2张切片,每个组有6个标本,计算内膜/中膜平均值。

1.6 免疫组织化学法检测AS斑块中COX-2水平

兔抗兔COX-2多克隆抗体(一抗,Cayman公司)及生物素标记山羊抗兔IgG(二抗,中杉公司)提供。S-P法实验步骤严格按试剂说明书进行。DAB显色阳性结果为细胞质呈棕黄色,将棕黄色区域采用北航CM-2000B生物医学图像分析系统进行面密度值统计分析,每个标本分析3张切片,每个组有6个标本,计算平均值。

1.7 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测主动脉COX-2 mRNA的表达

将主动脉冻存块在液氮中碾磨成粉状,严格按试剂盒说明书(Qiagen公司)要求提取总RNA。经0.8%琼脂糖凝胶电泳证实RNA的完整性后,用紫外分光光度计定量并检测RNA纯度。按逆转录试剂盒(TaKaRa公司)要求,将总RNA逆转录成cDNA。特异性引物序列来自GenBank,由上海Invitrogen公司合成。COX-2的上下游引物序列分别为:5′-AACGAGTACCG-CAAACGC-3′和5′-GCTGAGGATCTGGGACGT-3′,产物大小为370 bp;内参照(GAPDH)上下游引物序列分别为:5′-CTTCG-GCATTGTGGAGGG-3′和5′-GCCATGTGGACCATGAGGT-3′,产物大小为495 bp。PCR扩增条件为:94 ℃预变性2 min后,94 ℃变性30 s→50 ℃退火30 s→72 ℃延伸40 s,共38个循环,72 ℃延伸5 min。PCR产物采用1.2%琼脂糖凝胶电泳,在扫描分析仪上进行产物半定量分析,以COX-2的相对吸光度表示,COX-2的相对吸光度=COX-2吸光度/GAPDH吸光度。

1.8 Western blot检测COX-2蛋白表达

称取约100 mg的组织加入蛋白裂解液(1 ml RIPA和10 μl PMSF),在冰浴中匀浆,至组织完全裂解。组织匀浆后4 ℃离心,以20 000×g离心30 min,留取上清弃沉淀,上清即所含要测定的细胞质蛋白。上清液中的蛋白浓度经BCA法定量。聚丙烯酰胺变性凝胶分离蛋白(上样量为50 μg总蛋白),电转膜法将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂奶粉封闭2 h,分别加一抗(兔抗兔COX-2多克隆抗体,Cayman公司),1:200,4 ℃孵育过夜,加二抗(辣根酶标记山羊抗兔IgG,中杉公司),1:5 000,37 ℃孵育2 h,化学发光试剂显色,PVDF膜放入凝胶扫描成像系统分析蛋白质的表达量,以COX-2的相对吸光度表示,COX-2的相对吸光度=COX-2吸光度/β-actin吸光度。

1.9 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SAS 8.1统计软件,两组间资料的比较用t检验,多组间比较用方差分析,组间两两比较用q检验。

2 结果

2.1 各组兔血脂水平比较

所有实验兔入选时(0周)各项血脂指标无统计学差异($P>0.05$)。4组高胆固醇饮食兔(HC、Sirb、Mirb和Lirb)在喂养14周时TC、LDL-C、TG均明显高于NC组($P<0.01$),但HC组与Sirb、Mirb和Lirb 3组各项血脂指标均无统计学差异($P>0.05$),表明厄贝沙坦不影响血脂水平。

2.2 各组血浆AngⅡ水平比较

HC组血浆AngⅡ水平[(2.41±0.64) μg/L]与NC组[(2.17±0.66) μg/L]比较无统计学差异($P>0.05$),Sirb、Mirb和Lirb 3组AngⅡ水平[分别为(5.81±0.88)、(7.52±1.71)、

(10.09 ± 2.20) μg/L]均明显增高($P < 0.01$),3 组间差异均有显著性($P < 0.01$)。

2.3　主动脉 AS 斑块面积大小及病变分级

结果显示 NC 组无 AS 斑块,而 HC 组 AS 斑块明显。不同剂量 Irb 组斑块面积呈现剂量依赖性减小,以 Lirb 组 AS 面积最小,与 HC、Sirb 和 Mirb 组比较差异显著($P < 0.01$)。见表 1、图 1。

表 1　主动脉 AS 斑块面积百分比、病变分级及主动脉内膜/中膜值($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	AS 斑块面积百分比(%)	主动脉斑块的病变分级	内膜/中膜值
NC 组	0	0 级	0.03 ± 0.01
HC 组	61.74 ± 4.33	Ⅲ级	0.92 ± 0.07[a]
Sirb 组	57.97 ± 3.03	Ⅲ级	0.88 ± 0.07
Mirb 组	33.77 ± 3.53[bc]	Ⅱ级	0.50 ± 0.08[bc]
Lirb 组	14.84 ± 2.51[bcd]	Ⅰ级	0.11 ± 0.07[bcd]

a: $P < 0.01$,与 NC 组比较; b: $P < 0.01$,与 HC 组比较; c: $P < 0.01$,与 Sirb 组比较; d: $P < 0.01$,与 Mirb 组比较

2.4　主动脉内膜与中膜厚度比

NC 组动脉壁完好,内膜光滑,内皮细胞完整,内弹性膜连续。高胆固醇饮食各组有不同程度的内膜增厚及较多的泡沫细胞,内弹性膜被破坏;内膜表面有增生的纤维结缔组织“帽”,其下可见粉染的无定形物质(细胞外脂质和坏死细胞),见图 1。HC 组内膜与中膜厚度比值较 NC 组显著增加($P < 0.01$),大、中剂量 Irb 干预后其比值显著减少($P < 0.01$),见表 1。

2.5　AS 斑块处 COX-2 蛋白的表达

14 周时 HC 组 AS 斑块中 COX-2 蛋白表达(0.81 ± 0.06)较 NC 组(0)明显增强,Lirb 和 Mirb 组 COX-2 表达[(0.14 ± 0.02)和(0.47 ± 0.10)]较 HC 组明显降低($P < 0.01$),但 Sirb 组(0.76 ± 0.04)降低不明显($P > 0.05$);Lirb 组与 Sirb 和 Mirb 组差异显著($P < 0.01$),见图 2。

2.6　AS 斑块处 COX-2 mRNA 的表达

HC 组 COX-2 mRNA 的表达较 NC 组显著增强($P < 0.01$),Lirb 和 Mirb 组 COX-2 mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$)。各组间比较,COX-2 mRNA 的表达量在 Lirb 组低于 Mirb 组($P < 0.01$),在 Mirb 组又低于 Sirb 组($P < 0.01$),见表 2、图 3。

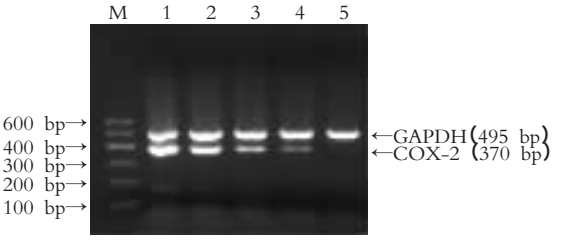
2.7　Western blot 检测主动脉 AS 斑块 COX-2 蛋白的表达

HC 组 COX-2 蛋白的表达较 NC 组显著增强($P < 0.01$),Lirb 和 Mirb 组 COX-2 蛋白的表达较 HC 组明显降低($P < 0.01$)。各组间比较,COX-2 蛋白的表达量在 Lirb 组低于 Mirb 组($P < 0.01$),在 Mirb 组又低于 Sirb 组($P < 0.01$),见表 2、图 4。

表 2　COX-2 mRNA 及蛋白的表达($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

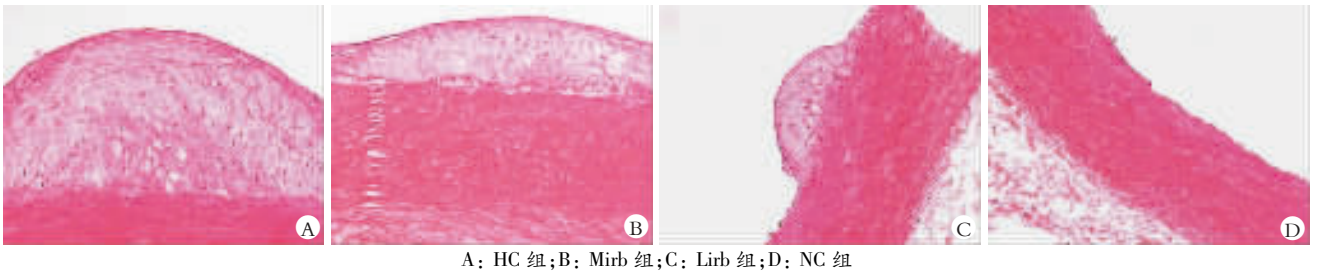
组别	COX-2/GAPDH	COX-2/β-actin
NC 组	0.02 ± 0.01	0.14 ± 0.04
HC 组	1.01 ± 0.04[a]	1.10 ± 0.05[a]
Sirb 组	0.97 ± 0.05	1.07 ± 0.02
Mirb 组	0.47 ± 0.05[bc]	0.89 ± 0.02[bc]
Lirb 组	0.24 ± 0.03[bcd]	0.51 ± 0.04[bcd]

a: $P < 0.01$,与 NC 组比较; b: $P < 0.01$,与 HC 组比较; c: $P < 0.01$,与 Sirb 组比较; d: $P < 0.01$,与 Mirb 组比较



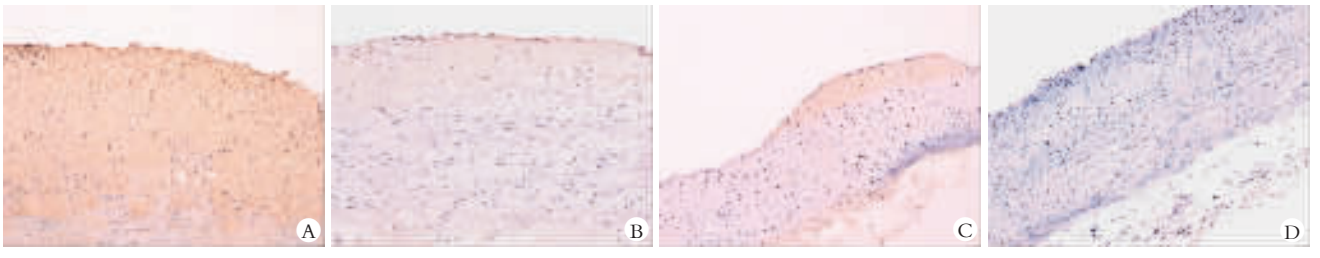
M:标准; 1: HC 组; 2: Sirb 组; 3: Mirb 组; 4: Lirb 组; 5: NC 组

图 3　主动脉 AS 斑块处 COX-2 RT-PCR 电泳图



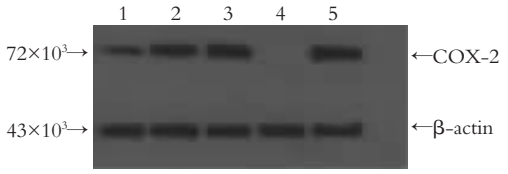
A: HC 组;B: Mirb 组;C: Lirb 组;D: NC 组

图 1　各组主动脉内膜与中膜厚度比观察　(HE × 100)



A: HC 组;B: Mirb 组;C: Lirb 组;D: NC 组

图 2　各组 AS 斑块处 COX-2 蛋白的免疫组化观察　(S-P × 100)



1：Lirb 组；2：Mirb 组；3：Sirb 组；4：NC 组；5：HC 组

图4 主动脉 AS 斑块处 COX-2 蛋白的表达

3 讨论

本研究显示，应用中剂量和大剂量 Irb 干预后，AS 斑块面积及内膜与中膜厚度比值均明显降低，表明 Irb 有抗 AS 的作用，且中剂量即产生有效作用。Irb 不影响血脂水平，其抑制 AS 斑块形成的机制可能与阻断 AngⅡ的作用及下调 COX-2 表达相关（基因和蛋白）。

临床研究证实了 RAS 系统在 AS 中的作用[6]。除循环中 AngⅡ外，AS 斑块处的内皮细胞、巨噬细胞及血管平滑肌细胞均可分泌 AngⅡ，AngⅡ作用于血管壁细胞和细胞外基质，改变了炎性因子、趋化因子、黏附分子的表达，导致内皮功能紊乱，促进脂质沉积、炎症反应，最终导致 AS 的形成[7]。这些作用均通过 AT_1R 及其相关的信号传导系统实现。本研究中 Irb 各组血浆 AngⅡ水平均较正常对照组明显升高，是 AT_1R 被结合后负反馈引起血浆 AngⅡ增多所致。因此，Irb 不可逆地与 AT_1R 结合，阻断了绝大多数 AngⅡ的作用，从而减缓 AS 进程。另一方面，反馈性增高的 AngⅡ与 AngⅡ-2 型受体（AT_2R）作用，但 AT_2R 的分布及功能尚不清楚，有待于进一步研究。此外，过多的 AngⅡ还可转化为血管紧张素[1-7]，具有部分拮抗 AT_1R 的作用[8]。

COX-2 是花生四烯酸合成前列腺素过程的限速酶，正常情况下人体内表达极少，当纤维母细胞、血管平滑肌、内皮细胞或单核/巨噬细胞等暴露于内毒素、脂多糖或炎症因子时，即诱导产生大量 COX-2。COX-2 介导产生的前列腺素通过多途径促进 AS 的发生发展，包括增加血管通透性、促进单核细胞黏附、诱导巨噬细胞化学趋化性和迁移、刺激炎症因子产生，活化基质金属蛋白酶增加 AS 斑块不稳定性[9-11]。Burleigh 等[2]采用选择性 COX-2 抑制剂治疗西方饮食后的低密度脂蛋白受体（low density lipoprotein receptor，LDLR）缺陷雄性鼠，AS 程度降低 25% ~50%。该研究还将 LDLR 缺陷鼠进行有野生型巨噬细胞 COX-2 或无巨噬细胞 COX-2 的胎肝细胞移植，结果显示，后者 AS 明显减轻，为巨噬细胞 COX-2 表达有促进 AS 的作用提供了遗传学证据。本研究显示，COX-2 在 AS 斑块中表达（基因和蛋白水平）增强，进一步表明 COX-2 与 AS 的病理生理过程相关。

本研究发现中剂量和大剂量 Irb 在阻断 AngⅡ作用同时，明显降低主动脉 AS 中 COX-2 的表达水平。提示 Irb 可能通过抑制 AngⅡ而抑制 COX-2 的表达，抑制 AS 炎症反应，从而抑制高脂血症兔 AS 病变的进展。因此 Irb 除了抗高血压和心力衰竭外，还可能是防治 AS 的重要手段。有关 Irb 对 COX-2 调控的机制有待进一步的研究明确。

参考文献：

[1] 李洪涛，陈 倩，吴宗贵，等. 诱导型环氧合酶在人冠状动脉粥样硬化组织中的表达分布[J]. 中国动脉硬化杂志，2004，12(5)：533－536.

[2] Burleigh M E，Babaev V R，Oates J A，*et al*. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice[J]. Circulation，2002，105(15)：1816－1823.

[3] Yang B C，Phillips M I，Mohuczy D，*et al*. Increased angiotensin Ⅱ type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，1998，18(9)：1433－1439.

[4] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京：中国中医药出版社，1997：143.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈 修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，2002：1204－1205.

[6] Navalkar S，Parthasarathy S，Santanam N，*et al*. Irbesartan，an angiotensin type 1 receptor inhibitor，regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol，2001，37(2)：440－444.

[7] Suzuki Y，Ruiz-Orteqa M，Lorenzo O，*et al*. Inflammation and angiotensin Ⅱ[J]. Int J Biochem Cell Biol，2003，35 (6)：881－900.

[8] 李敏侠，刘必成. 血管紧张素Ⅱ和微炎症反应[J]. 国际泌尿系统杂志，2006，26(1)：139－143.

[9] Altman R. Acute coronary disease Athero-Inflammation：Therapeutic approach[J]. Thromb J，2003，1(1)：2.

[10] Paramo J A，Rodriguez J A，Beloqui O，*et al*. Monocyte cyclooxygenase-2 activity：a new therapeutic target for atherosclerosis? [J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord，2005，5(4)：303－311.

[11] Cipollone F，Prontera C，Pini B，*et al*. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability[J]. Circulatlon，2001，104(8)：921－927.

（编辑 王小寒）