论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1774-04

西洛他唑抑制颈总动脉球囊损伤后大鼠血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1表达

苏华科,宋耀明,郭文昀 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 观察大鼠颈总动脉球囊损伤后血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1,LOX-1)的表达及西洛他唑对其表达的影响,探索西洛他唑抑制内膜增生的机制。**方法** 24只健康雄性SD大鼠按完全随机分组法分成假手术组、模型组、西洛他唑组($n=8$)。观察球囊损伤后内膜增生情况并计算内膜、中膜面积比值,检测血清MDA含量,RT-PCR法和免疫组化法分别检测各组球囊损伤后大鼠颈总动脉血管壁组织中LOX-1 mRNA和蛋白的表达。**结果** 西洛他唑组内膜/中膜面积比值(IA/MA)、LOX-1 mRNA及蛋白表达水平、血清MDA含量显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 西洛他唑可显著抑制内膜增生,抑制LOX-1表达及其介导的氧化应激,这可能是西洛他唑抑制内膜增生的机制之一。

关键词: 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1;西洛他唑;球囊损伤;再狭窄
中图法分类号: R394.3;R543.4;R972.9 **文献标识码:** A

Cilostazol suppresses expression of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 after balloon injury in rats

SU Hua-ke, SONG Yao-ming, GUO Wen-yun (Institute of Cardiovascular Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in a rat model after balloon arterial injury and investigate the effect of cilostazol on the mRNA and protein expressions of LOX-1. **Methods** Twenty-four male SPF SD rats were randomly divided into 3 groups ($n=8$ for each group), sham operation group, balloon arterial injury group and cilostazol treatment group. For the rats from balloon arterial injury group and cilostazol treatment group, the left common carotid artery were injuried by a balloon catheter. The expression of LOX-1 mRNA and protein in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury were examined by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. The contents of MDA in blood serum was examined by TBA. **Results** LOX-1 mRNA and protein were expressed in the neointimal hyperplasia after balloon arterial injury but not in the sham-operation group. The expression level of LOX-1 was significantly lower in the cilostazol treatment group than that in the model group ($P<0.05$). The content of MDA in the blood was also significantly lower in the cilostazol treatment group than in model group ($P<0.05$). **Conclusion** LOX-1 is highly expressed in neointimal hyperplasia after balloon arterial injury and cilostazol significantly inhibits the neointimal hyperplasia by suppressing the expression level of LOX-1 and the contents of MDA in blood serum.

Key words: lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1; cilostazol; balloon injury; restenosis

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention,PCI)术后再狭窄限制了PCI的广泛应用。药物洗脱支架通过抑制内膜的增生在防治PCI术后再狭窄方面起着积极作用,但再狭窄的发病率仍然在8.9%左右。不少学者致力于研究PCI术后再狭窄的药物治疗,选择性Ⅲ型磷酸二酯酶抑制剂西洛他唑就是代表药物之一。临床试验证实,其在防治PCI术后再狭窄方面疗效显著[1]。

作者简介:苏华科,男,江西省余江县人,硕士研究生,主治医师,主要从事冠心病基础与临床方面的研究。E-mail: shkyisheng@163.com
通信作者:宋耀明,电话:(023)68755314,E-mail:sym553142002@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-06-01;修回日期:2009-07-01

氧化低密度脂蛋白的新型受体,血凝素样氧化低密度脂蛋受体-1(lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1,LOX-1)及其介导的氧化应激不仅在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥重要作用,在 PCI 术后再狭窄的形成过程中亦起重要作用,是 PCI 术后再狭窄的重要受体之一,抑制 LOX-1 的表达可显著抑制内膜增生[2,3]。西洛他唑防治再狭窄的机制是否同 LOX-1 表达有关,目前尚不清楚。本研究通过建立大鼠颈总动脉球囊损伤后再狭窄动物模型,观察西洛他唑对内膜增生的抑制及对血管壁组织 LOX-1 表达、血清丙二醛(MDA)含量的影响,探讨西洛他唑抑制内膜增生的机制,为西洛他唑防治再狭窄提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及器材

西洛他唑片(商品名赛活灵,重庆华森制药有限公司,批号:061201090),MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),免疫组化 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、兔抗山羊二抗(武汉博士德公司),山羊多克隆抗 LOX-1 抗体(美国 Santa Cruz, sc-11653),Trizol Reagent、Premix *Taq*(天根生物科技公司),M-MuLV Reverse Transcriptase(上海东阳纺生物制剂公司),DEPC(焦碳酸二乙酯,Bioasia 公司),LOX-1 及 GAPDH 引物(由北京奥科生物工程技术公司合成),Fogarty 球囊导管[直径 0.66 mm(2F),美国 Baxter 公司]。

1.2　动物及分组

清洁级雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 300 ~ 350 g,由第三军医大学实验动物中心提供。动物生产许可证号:SCXK(J)2002-007;动物使用许可证号:SYXK(J)2002-029。24 只大鼠按完全随机分组法分成 3 组:假手术组、模型组、西洛他唑组,每组 8 只。

1.3　方法

1.3.1　大鼠颈总动脉球囊损伤模型建立　　模型组及西洛他唑组大鼠照参考 Tulis[4] 建立球囊损伤模型。主要步骤简述如下:2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,同时腹腔注射 4 万 U 庆大霉素,尾静脉注射 100 U/kg 肝素钠;将大鼠仰卧固定,碘伏消毒。沿中线逐层切开,暴露并钝性分离颈总动脉 1.5 ~ 2 cm,确认颈内外动脉,钝性分离颈外动脉 2 cm,颈内动脉 1 cm。将颈外动脉远心端结扎,动脉夹阻断颈总动脉远心端及颈内动脉血流。颈外动脉结扎处近心端做一横切口,在显微镜手术用镊子引导下,将 2.0 F 球囊导管插入颈总动脉 4 cm,扩张球囊,球囊体积当量为 0.2 ml,来回抽送 3 次,造成颈总动脉损伤,使球囊恢复原状后撤出导管。结扎动脉切口近心端,松开动脉夹,恢复左侧颈总动脉血流,用生理盐水灌洗手术切口,逐层缝合。术后再次腹腔注射庆大霉素4 万 U。假手术组不做左侧颈总动脉球囊损伤,其他同球囊损伤模型建立方法。西洛他唑组于术前 1 周给予西洛他唑 20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,术后模型组及假手术组给予等量药物溶剂。

1.3.2　标本采集　　各组大鼠于术后 2 周麻醉,心脏穿刺取血 3 ml,分离血清,-70 ℃冰箱保存备用。取左侧颈总动脉,剥离周围结缔组织,一分为二,一段 4% 多聚甲醛固定后做石蜡切片,另一端于液氮中速冻后转 -70 ℃冰箱保存备用。

1.3.3　血管壁组织形态学观察　　血管标本经 4% 多聚甲醛固定、脱水,石蜡包埋、切片,每个标本取 3 张切片行 HE 染色,光学显微镜下观察内膜增生情况,用计算机图像分析系统检测内膜面积、中膜面积并计算其比值(IA/MA)。

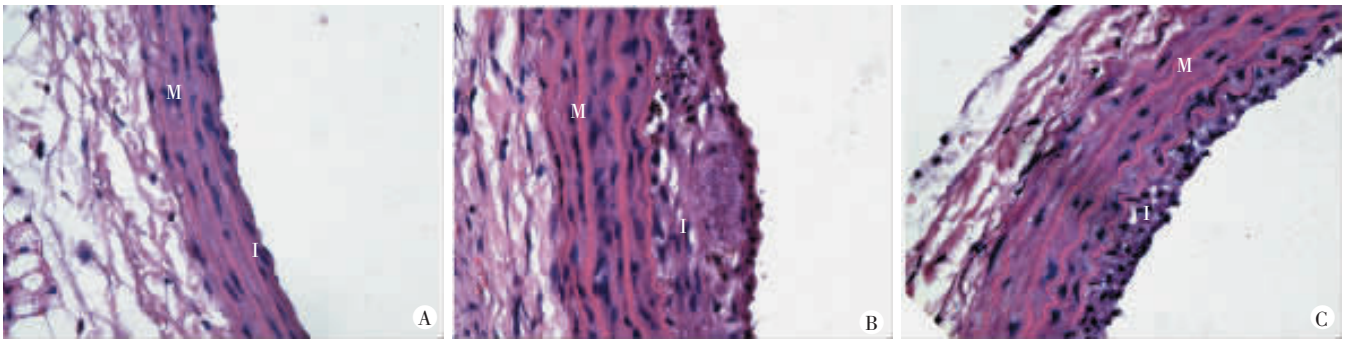
1.3.4　免疫组化检测组织中 LOX-1 蛋白表达　　大鼠颈总动脉石蜡切片经脱蜡、至水后,微波抗原修复。3% H_2O_2 15 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min)。10% 正常兔血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 20 min,倾去血清。滴加 40 μl 一抗(1∶50),4 ℃过夜;PBS 洗 3 次(每次 5 min);滴加 40 μl 生物素标记二抗(1∶100,生物素化兔抗羊 IgG),37 ℃孵育 30 min;PBS 洗 3 次(每次 5 min);滴加 40 μl SABC(1∶100),37 ℃室温孵育 20 min;PBS 洗 3 次(每次 5 min);加 DAB 显色 3 ~ 5 min,观察结果(LOX-1 阳性染色呈现棕黄色)。然后苏木精复染,常规脱水,中性树胶封片。

1.3.5　RT-PCR 检测血管壁组织 LOX-1 mRNA 表达　　用 Trizol 试剂提取大鼠颈总动脉血管壁组织内总 RNA,溶于无 RNase 水中,紫外分光光度计测定 $D(260)/D(280)$ 比值在 1.65 ~ 1.88 之间。取总 RNA 1.0 μg,用 M-MuLV Reverse Transcriptase 试剂盒合成 cDNA,再取逆转录产物 1 μl 进行 PCR 循环。大鼠 LOX-1 引物系列为:上游:5′-ACTCTTCAGGTCCTTGTCCACA-3′;下游:5′-GTTGGGATTTTTCCGATGTAAT-3′;产物 218 bp。PCR 反应条件为:94 ℃温育 3 min,94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,72 ℃延伸 5 min。内参采用 GAPDH,引物序列为:上游:5′-GCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT-3′;下游:5′-TGCCGAAGTGGTCGTGGATGACCT-3′,产物 465 bp。PCR 反应条件为:94 ℃温育 3 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,72 ℃延伸 5 min。反应结束后,取 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,加样量均为 5 μl,溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做吸光度测定和分析,计算 LOX-1 与 GAPDH 扩增条带光密度比值作为其相对表达量。

1.3.6　硫代巴比妥钠(TBA)法血清 MDA 含量检测　　参照试剂盒说明书进行。取血清 0.1 ml,加入试剂一 0.1 ml、试剂二 3 ml、试剂三 1 ml,漩涡混匀器混匀,试管口用保鲜薄膜扎紧,用针头刺一小孔,95 ℃水浴 40 min,取出后流水冷却,然后 3 500 r/min 离心 10 min,取上清,532 nm 处,1 cm 光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。血清中 MDA 含量 =(测定管吸光度值 - 测定空白管吸光度值)/(标准管吸光度值 - 标准空白管吸光度值)× 标准品浓度(10 nmol/ml)× 样本测定前稀释倍数。

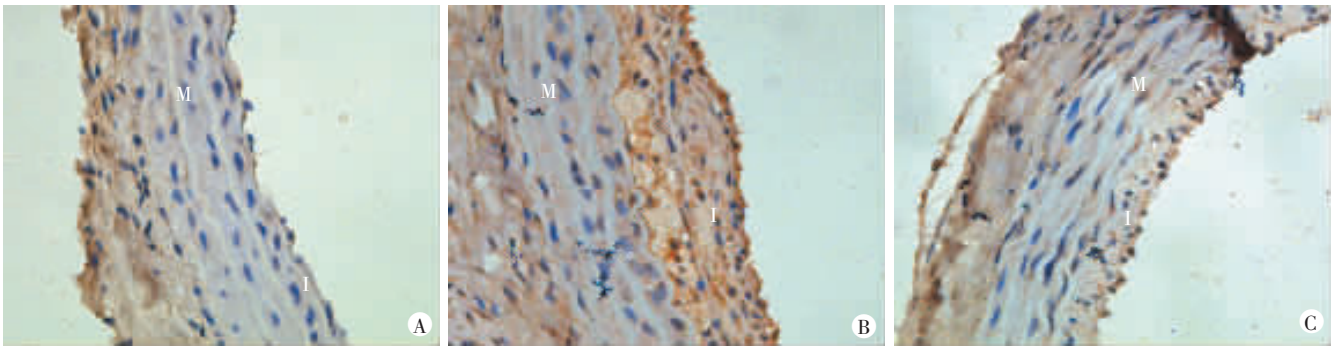
1.4　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用 t 检验,多组间进行单因素方差分析,组间比较用 Turkey's 检验。



A:假手术组;B:模型组;C:西洛他唑组　M:中膜;I:内膜

图1　各组大鼠颈总动脉血管壁内膜增生病理学观察　(HE×400)



A:假手术组;B:模型组;C:西洛他唑组　M:中膜;I:内膜

图2　免疫组化检测各组大鼠血管壁 LOX-1 蛋白的表达　(SABC×400)

2　结果

2.1　血管壁组织形态学

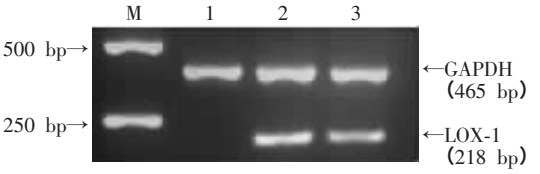
光镜下,假手术组大鼠颈总动脉内膜可见单层内皮细胞,动脉弹力层结构清楚(图1A)。模型组及西洛他唑组,损伤的动脉内膜呈均一或不均一增厚,管腔呈向心性或偏心性狭窄,内膜平滑肌细胞增生,细胞间质大量堆积,内弹力板不同程度破坏、断裂,中膜与内膜增生的平滑肌细胞在断裂处链接,中膜可见损伤和增厚(图1B、C)。模型组 IA/MA(1.120±0.219)较假手术组(0.110±0.012)显著升高($P<0.05$);西洛他唑组 IA/MA(0.580±0.164)较模型组显著降低($P<0.05$),较假手术组显著升高($P<0.05$)。

2.2　血管壁 LOX-1 蛋白表达

免疫组化染色结果显示,LOX-1 阳性染色呈现棕黄色,假手术组血管壁组织中几乎无 LOX-1 蛋白的阳性表达(图2A);模型组大鼠颈总动脉血管壁可见显著棕黄色 LOX-1 表达,多分布在新生内膜区,内膜管腔边缘更为显著,中膜区亦可见少量表达(图2B);西洛他唑组血管壁内膜区亦有棕黄色 LOX-1 表达,但较模型组分布明显稀疏(图2C)。

2.3　血管壁 LOX-1 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示,假手术组血管壁组织未检测到 LOX-1 mRNA 表达,模型组及西洛他唑组均可见 LOX-1 mRNA 表达,光密度比值分别为(0.94±0.04)和(0.36±0.12),西洛他唑组较模型组显著降低($P<0.05$,图3)。



M:DNA 标准;1:假手术组;2:模型组;3:西洛他唑组

图3　RT-PCR 检测各组大鼠血管壁组织 LOX-1 mRNA 的表达

2.4　血清 MDA 含量

假手术组、模型组、西洛他唑组血清 MDA 含量分别为(17.7±4.0)、(49.4±8.9)、(31.4±7.5)nmol/ml;模型组血清 MDA 含量较假手术组显著升高($P<0.05$);西洛他唑组血清 MDA 含量较模型组显著下降($P<0.05$)。

3　讨论

西洛他唑是药物防治 PCI 术后再狭窄的代表药物之一。大量临床试验证实,西洛他唑不仅具有抗血小板、抗血栓形成作用,在 PCI 术后再狭窄防治上疗效显著[1,5]。西洛他唑可抑制磷酸二酯酶活性,使细胞内环磷腺苷(cAMP)浓度增加,启动一系列反应的发生,包括调节肿瘤抑制基因 p53/p21 和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的表达。细胞循环中

P53 蛋白抑制作用的增加将导致平滑肌细胞的凋亡,起到抗细胞增殖作用。HGF 可刺激内皮细胞快速再生,加速内皮细胞的修复从而抑制内膜增生。此外 cAMP 是重要的炎症反应和免疫反应的调节因子,西洛他唑可通过增加细胞内 cAMP 来调节炎症及免疫反应。上述可能是西洛他唑抑制内膜增生的机制之一[6]。

前期研究发现,LOX-1 在球囊损伤后大鼠血管壁表达显著增加,同时伴有血清 MDA 含量增加,LOX-1 表达程度与内膜增生程度趋势相似,提示 LOX-1 参与球囊损伤后再狭窄的形成过程,球囊损伤后氧化应激是促进 LOX-1 表达的重要因素[7]。本实验结果示,给予西洛他唑治疗后,损伤血管内膜增生显著抑制,再次证实了西洛他唑防治再狭窄的功效;同时血管壁 LOX-1 表达及血清丙二醛含量显著降低,提示西洛他唑可显著抑制 LOX-1 表达及其介导的氧化应激。抑制 LOX-1 表达及其介导的氧化应激可能是西洛他唑抑制内膜增生的机制,亦可能是西洛他唑防治 PCI 术后再狭窄的机制。

西洛他唑抑制 LOX-1 的表达是否与细胞内 cAMP 浓度增加有关,目前还不清楚。有研究发现,西洛他唑可抑制核因子-κB 活性,而核因子-κB 在 LOX-1 表达过程中有重要作用[8,9]。西洛他唑可能通过抑制核因子-κB 活性来实现对 LOX-1 表达的抑制。Shin 等[10]实验发现,西洛他唑可降低 NAD(P)H 氧化酶活性抑制 RLP 诱导的内皮细胞活性氧族生成增加。活性氧族不仅是 LOX-1 介导的效应,亦是促进 LOX-1 表达的重要因素。LOX-1 与配体结合后可增加 NAD(P)H 氧化酶活性,促进活性氧族生成,而活性氧族可通过激活 P_{38} MAPK、PI_3K、$ERK_{1/2}$,再进一步激活转录因子核因子-κB 来促进 LOX-1 表达,从而形成恶性循环[11]。西洛他唑可能通过抑制 NAD(P)H 氧化酶活性来阻断这一恶性循环的形成,抑制 LOX-1 及其介导的氧化应激在再狭窄形成过程中的作用。上述仅仅是推测,但可以明确的是西洛他唑可以显著抑制内膜增生、LOX-1 表达及其介导的氧化应激。抑制 LOX-1 表达及其介导的氧化应激可能是西洛他唑抑制内膜增生的机制。

以药物支架为代表的新医疗器械的应用,显著降低了经皮冠状动脉介入手术后再狭窄的发病率。然而目前的药物支架的近期疗效尚不够理想,远期疗效还有待考证。以西洛他唑为代表的药物在防治 PCI 术后再狭窄方面的疗效得到大量试验证实,其可能成为药物洗脱支架重要辅助治疗措施,为再狭窄的防治带来新的希望。

参考文献:

[1] Min P K, Jung J H, Ko Y G, *et al*. Effect of cilostazol on in-stent neointimal hyperplasia after coronary artery stenting: a quantative coronary angiography and volumetric intravascular ultrasound study[J]. Circ J,2007, 71(11): 1685 - 1690.

[2] Yao E H, Fukuda N, Ueno T, *et al*. Novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 attenuates restenosis of the artery after injury[J]. Hypertension,2008, 52(1): 86 - 92.

[3] Novelli G, Mango R, Vecchione L, *et al*. New insights in atherosclerosis research: LOX-1, leading actor of cardiovascular diseases[J]. Clin Ter, 2007, 158(3): 239 - 248.

[4] Tulis D A. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model[J]. Methods Mol Med, 2007, 139: 31 - 66.

[5] Lee S W, Park S W, Kim Y H, *et al*. Drug-eluting stenting followed by cilostazol treatment reduces late restenosis in patients with diabetes mellitus the DECLARE-DIABETES Trial (A Randomized Comparison of Triple Antiplatelet Therapy with Dual Antiplatelet Therapy After Drug-Eluting Stent Implantation in Diabetic Patients)[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(12): 1181 - 1187.

[6] Morishita R. A scientific rationale for the CREST trial results: evidence for the mechanism of action of cilostazol in restenosis[J]. Atheroscler Suppl, 2005, 6(4): 41 - 46.

[7] 苏华科, 宋耀明, 黄　岚, 等. 血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 在颈总动脉球囊损伤大鼠血管中的表达[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(5): 595 - 598.

[8] Shibata Y, Kume N, Arai H, *et al*. Mulberry leaf aqueous fractions inhibit TNF-alpha-induced nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in vascular endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2007, 193(1): 20 - 27.

[9] Otsuki M, Saito H, Xu X, *et al*. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription *via* inhibiting NF-kappaB binding to its recognition sequence[J]. Atherosclerosis, 2001, 158(1): 121 - 128.

[10] Shin H K, Kim Y K, Kim K Y, *et al*. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines *via* lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol[J]. Circulation, 2004, 109(8): 1022 - 1028.

[11] Chen X P, Zhang T T, Du G H. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, a new promising target for the therapy of atherosclerosis[J]. Cardiovasc Drug Rev, 2007, 25(2): 146 - 161.

(编辑　汪勤俭)