

环氧合酶 2 在高脂饮食兔颈总动脉球囊损伤后的动态变化及其与内膜增生的关系

胡信群, 沈向前, 周胜华, 祁述善, 方臻飞, 刘启明

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 环氧合酶 2 与内膜增生的关系; 逆转录聚合酶链反应; 环氧合酶 2; 球囊损伤; 内膜增生; 兔

[摘要] 目的 观察高脂饮食兔颈总动脉球囊损伤后环氧合酶 2 表达的变化及其与动脉内膜增生的关系, 探讨再狭窄发生的可能机制。方法 对高脂饮食兔颈总动脉球囊损伤后不同时间段的颈总动脉标本采用组织形态学观察内膜增生, 采用逆转录聚合酶链反应检测环氧合酶 2 mRNA 的表达。结果 球囊损伤后, 1 周可观察到内膜增生, 2 周时增生明显, 4 周时继续增生。中膜各时段均未见明显变化, 内膜/中膜面积比随时间逐步增长, 分别为 0.032 ± 0.004 , 0.030 ± 0.003 , 0.030 ± 0.002 , 0.251 ± 0.045 , 1.111 ± 0.182 及 1.448 ± 0.216 。对照侧内膜轻度增生, 但明显较损伤侧轻 ($P < 0.05$)。球囊损伤后 6 h、24 h、1 周、2 周、4 周对照侧环氧合酶 2 mRNA 的相对半定量值分别为 0.5 ± 0.21 , 0.5 ± 0.25 , 0.6 ± 0.19 , 0.6 ± 0.26 及 0.5 ± 0.22 , 损伤侧环氧合酶 2 mRNA 的相对半定量值分别为 0.6 ± 0.22 , 0.8 ± 0.24 , 1.2 ± 0.31 , 1.6 ± 0.36 及 1.4 ± 0.32 。环氧合酶 2 在损伤侧表达强于对照侧 ($P < 0.05$)。结论 球囊损伤后环氧合酶 2 表达明显增强, 且与内膜增生有关, 提示环氧合酶 2 可能在球囊损伤后内膜增生所致的再狭窄过程中起重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship between Intimal Hyperplasia and Cyclooxygenase-2 Expression in Hypercholesterolemic Rabbits Carotid Artery After Balloon Injury

HU Xin-Qun, SHEN Xiang-Qian, ZHOU Sheng-Hua, QI Shu-Shang, FAN Zhen-Fei, and LIU Qi-Ming

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Cyclooxygenase 2; Balloon Injury; Intimal Hyperplasia; Rabbits; Restenosis; Carotid Artery

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the change of cyclooxygenase-2 in hypercholesterolemic rabbits carotid artery injured by balloon and the relationship with intimal hyperplasia. **Methods** Twenty-five New Zealand male rabbits were studied. They were fed with atherogenic diet. Four weeks later, balloon injury was conducted in right carotid artery respectively. A few rabbits were killed at 6 h, 24 h, 1 W, 2 W and 4 W. Blood samples and right carotid artery were collected in time. Intimal hyperplasia was studied by histological morphology method. The expression of tissue cyclooxygenase-2 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Result** Intimal hyperplasia was present at day 7 after balloon injury, became more obvious at day 14 and in progression at day 28. The media area was not changed. The intima/media ratio increased as time went on (0.032 ± 0.004 , 0.030 ± 0.003 , 0.030 ± 0.002 , 0.251 ± 0.045 , 1.111 ± 0.182 and 1.448 ± 0.216). No change was observed in control group. Cyclooxygenase-2 mRNA expression was trace in the carotid artery of the hypercholesterolemic rabbits without balloon injury (0.5 ± 0.21 , 0.5 ± 0.25 , 0.6 ± 0.19 , 0.6 ± 0.26 and 0.5 ± 0.22). The expression increased significantly after balloon injury as time went on (0.6 ± 0.22 , 0.8 ± 0.24 , 1.2 ± 0.31 , 1.6 ± 0.36 and 1.4 ± 0.32).

After balloon injury cyclooxygenase-2 expressed stronger in injury group than in control group. **Conclusions** Cyclooxygenase-2 expressed stronger in injury group than in control group, which indicated that cyclooxygenase-2 may play an important role in restenosis caused by balloon injury.

目前经导管介入疗法是治疗冠状动脉狭窄, 改善心肌缺血的重要手段^[1], 经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)的成功率可达 90% 以上, 然而高再狭窄率

严重地困扰着患者和医师^[2]。目前再狭窄的机理仍不十分清楚, 炎症反应学说在其中起到重要作用^[3,4]。环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是炎症状态下前列腺素合成的限速酶, 其表达促进前列腺素的合成并参与炎症反应。COX-2 在冠心病发展中的作用尚不十分确切, 但有研究证实人类冠状动脉粥样斑块可见 COX-2 的广泛表达^[5]。因其在炎症反应中的重要地位提示其可能在动脉粥样硬化及

[收稿日期] 2005-04-12

[修回日期] 2005-07-10

[作者简介] 胡信群, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病介入治疗, E-mail 为 huxinqun@hotmail.com。沈向前, 教授, 主要从事心脏病介入治疗。周胜华, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脏病介入治疗。

PTCA 术后再狭窄中起重要作用。本研究应用高脂饮食兔颈动脉球囊损伤模型观察损伤后 COX-2 mRNA 的表达变化及其与内膜增生的关系。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康雄性新西兰大白兔 25 只,月龄 2~3 月,体重 2.3 ± 0.4 kg,由本院动物实验中心提供,观察 7 天后纳入实验。喂以高脂饮食(1%胆固醇+3%花生油),任意饮水,实验兔均在标准温度和湿度环境中单笼饲养。经 4 周高脂饮食喂养后行右侧颈总动脉球囊损伤术,分别于 6 h、24 h、1 周、2 周及 4 周处死,取双侧颈动脉备用。于实验入选时、4 周时清晨空腹经耳中动脉采血,分离血清,置 -30°C 冰箱保存。在实验过程中兔死亡 4 只。

1.2 右颈总动脉球囊损伤

术前一晚实验兔禁食,术前称重,经耳缘静脉注入戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,继以肝素钠(100 u/kg)术中抗凝,颈部正中切口,逐层分离暴露右侧颈总动脉,向上分离暴露右侧颈内及颈外动脉,经颈外动脉下方置入 4-0 丝线,结扎颈外动脉远心端,并以银制血管夹暂时阻断颈内动脉及颈总动脉近心端,以眼科剪剪开颈外动脉,经颈外动脉切口置入 0.014 导引钢丝,沿导丝逆行送入 3.0×20 mm PTCA 球囊入颈总动脉(松开银夹)约 5 cm,予以 6 atm 充盈球囊,匀速、缓慢地将球囊退回到切口处,抽空球囊,再次将球囊导入颈总动脉近心端重复上一过程,如此反复 3 次后退出球囊及导丝,在切口近心端结扎颈外动脉,充分止血后逐层缝合。

1.3 血脂浓度测定

在 HITACHI 7060 全自动生物化学分析仪上用酶法测定甘油三酯(triglyceride, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TC),直接法测定高密度脂蛋白和低密度脂蛋白。

1.4 颈总动脉的形态学观测

1.4.1 标本采集和制作 实验兔分别在球囊损伤后 6 h(5 只)、24 h(4 只)、1 周(4 只)、2 周(4 只)和 4 周(4 只)处死。处死前 12 h 禁食,经耳缘静脉静注戊巴比妥钠(60 mg/kg)处死,并予肝素钠(100 u/kg)防止血凝,暴露心脏,以 0.1 mmol/L PBS(100 mm Hg, 22°C)经左心室灌注,剪开右心房,放血,逐层分离双侧颈总动脉,以未损伤侧作为对照侧。仔细分离血管周围脂肪组织,将颈总动脉从分叉至肩胛舌骨肌处离断,以 0.1 mmol/L PBS 冲洗,中间约 1 cm 分成

两段,一段立即送冰冻切片,另一段以 10% 福尔马林固定 24 h 后予以石蜡包埋,取颈总动脉分叉近心端 2 mm 处切成 4 mm 厚的切片,常规烤片,脱腊、水化后进行 HE 染色。

1.4.2 内膜与中膜面积测定 光镜下观察血管壁形态学变化,应用 BIOQUANT-TCW98 计算机病理图像分析系统进行图像分析,测量管腔面积以及内、外弹力板包绕面积,以内弹力板包绕面积减去管腔面积为内膜面积,以外弹力板包绕面积减去内弹力板包绕面积为中膜面积,以内膜面积除以中膜面积表示增生程度。

1.5 逆转录聚合酶链反应测定环氧合酶 2

1.5.1 颈动脉组织总 RNA 的提取 氯仿-酚抽提 \rightarrow RNA 沉淀 \rightarrow RNA 洗涤 \rightarrow RNA 溶解 \rightarrow OD 值测定及电泳,质量合格后,进行下一步实验。

1.5.2 逆转录 将 RNA 与无 RNA 酶的纯水混匀离心,在 65°C 变性 10 min,冰上骤冷。加入 25 mmol/L MgCl_2 4 μL , $10 \times$ 逆转录缓冲液 2 μL , 10 mol/L dNTP 混合物 2 μL , RNA 酶抑制因子 0.5 μL , AMV 0.6 μL , oligo (dT) 15 1 μL ,再加无 RNA 酶水补足至 20 μL ,PCR 仪上恒温 42°C 60 min, 95°C 灭活逆转录酶,终止反应,置冰上骤冷贮存于 -20°C 备用,再取 cDNA 行 PCR 扩增。

1.5.3 聚合酶链反应 COX-2 上游引物 5'-GCC CTT CCT CCT GTG GCT GAT-3',下游引物 5'-TTG AGC ACA TCG CAC ACT CT-3',扩增片段为 619 bp; β -actin 上游引物 5'-TGA CGG TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA TGA-3',下游引物 5'-TTG ATC TTC ATG GTG TAG GAG CGA GGG CA-3',扩增片段为 270 bp。PCR 反应体系为 10 μL , cDNA 2 μL , Taq 酶(5 ku/L) 0.2 μL , $10 \times$ Buffer 1 μL , dNTP 0.25 μL , Mg^{2+} (promega) 0.8 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,补去离子水至 10 μL 。 95°C 预变性 180 s, 95°C 30 s \rightarrow 62°C 30 s \rightarrow 72°C 60 s。30 个循环后再 72°C 5 min。

1.5.4 环氧合酶 2 mRNA 的半定量分析 取 PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在扫描分析仪上进行产物半定量分析,测定面积的积分光密度值(IA),样品量的数值以目的片段的 IA 比 β -actin 的 IA 来表示。

1.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One Way ANOVA 检验,用 Bonferroni 方法进行两两比较;两组间比较采用 t 检验;相关性研究采用直线相关分析。以双侧 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 实验前后生物化学指标变化

实验 4 周时 TG、TC 明显高于入选时 ($P < 0.001$), 而白细胞、GPT、GOT 无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 1 (Table 1)。

表 1. 高脂血症兔生物化学指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Changes of characteristics of hypercholesterolemic rabbits

| 指 标 | 入选时 ($n=25$) | 4 周 ($n=23$) |
|-------------------------|-----------------|------------------|
| 甘油三酯 (mmol/L) | 0.76 ± 0.11 | 12.3 ± 3.2^a |
| 总胆固醇 (mmol/L) | 1.43 ± 0.12 | 25.2 ± 4.3^a |
| GPT (u/L) | 40.6 ± 3.5 | 38.5 ± 4.2 |
| GOT (u/L) | 22.6 ± 3.3 | 20.3 ± 3.1 |
| 白细胞 ($\times 10^6/L$) | 8.3 ± 2.4 | 8.8 ± 2.7 |

a: $P < 0.001$, 与入选时比较。

2.2 组织形态学分析

光镜下, 对照侧单层血管内皮细胞连续, 内膜轻

度增生, 内弹力板完整, 内膜面积近似为零。损伤后 6 h 和 24 h 可见内皮细胞脱落, 未见明显内膜增生; 1 周可见内皮细胞及平滑肌细胞增殖, 新生内膜形成, 增殖细胞排列紊乱; 2 周、4 周可见平滑肌细胞增殖继续加重。中膜面积则各时段间无显著性差异, 内膜面积、内膜与中膜面积比各时段间有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 2 和图 1 (Table 2 and Figure 1)。

2.3 球囊损伤后环氧合酶 2 mRNA 的表达

对照侧损伤后 6 h、24 h、1 周、2 周及 4 周时 COX-2 mRNA 的相对半定量值分别为 0.5 ± 0.21 、 0.5 ± 0.25 、 0.6 ± 0.19 、 0.6 ± 0.26 及 0.5 ± 0.22 , 损伤侧分别为 0.6 ± 0.22 、 0.8 ± 0.24 、 1.2 ± 0.31 、 1.6 ± 0.36 及 1.4 ± 0.32 。24 h 时 COX-2 mRNA 的表达较对照侧明显增加 ($P < 0.05$); 1 周、2 周、4 周时 COX-2 mRNA 的表达较 24 h 明显增加 ($P < 0.05$)。见图 2 (Figure 2)。

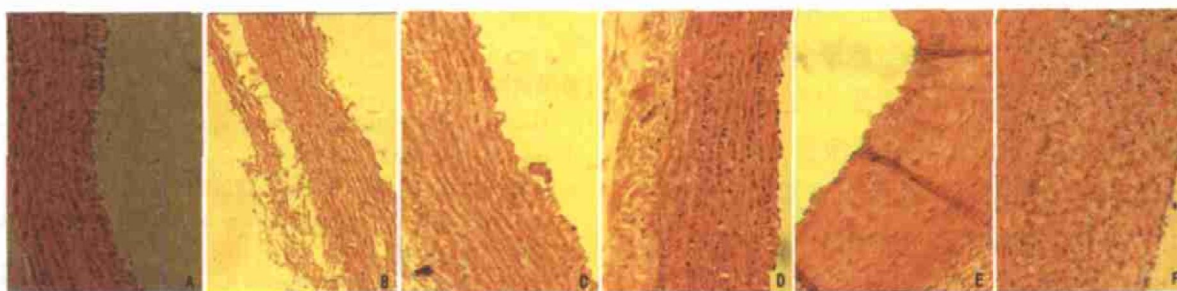


图 1. 球囊损伤后血管内膜变化 ($\times 100$) A 为对照, B 为损伤后 6 h, C 为损伤后 24 h, D 为损伤后 1 周, E 为损伤后 2 周, F 为损伤后 4 周。

Figure 1. Changes of intima after balloon injury

表 2. 内膜面积、中膜面积以及内膜/中膜面积比 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Intimal and media area and ratio of intima and media

| | 内膜面积 (mm^2) | 中膜面积 (mm^2) | 内膜/ 中膜面积比 |
|------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| 对照侧 | 0.012 ± 0.003 | 0.382 ± 0.051 | 0.032 ± 0.004 |
| 6 h | 0.011 ± 0.002 | 0.393 ± 0.045 | 0.030 ± 0.003 |
| 24 h | 0.012 ± 0.004 | 0.401 ± 0.053 | 0.030 ± 0.002 |
| 1 周 | 0.108 ± 0.009^a | 0.412 ± 0.055 | 0.251 ± 0.045^a |
| 2 周 | 0.453 ± 0.135^a | 0.408 ± 0.062 | 1.111 ± 0.182^a |
| 4 周 | 0.628 ± 0.098^a | 0.431 ± 0.058 | 1.448 ± 0.216^a |

a: $P < 0.05$, 与前一时间段比较。



图 2. 环氧合酶 2 mRNA 逆转录聚合酶链反应产物凝胶电泳图 1、3、5、7、9 分别为损伤后 6 h、24 h、1 周、2 周、4 周, 2、4、6、8、10 为相应时段对照侧。

Figure 2. Expression of cyclooxygenase 2 by RT-PCR

2.4 内膜增生与环氧合酶 2 的相关性

直线相关分析发现, 内膜增生与 COX-2 呈正相

关($r = 0.316, P < 0.05$)。

3 讨论

目前再狭窄是限制 PCI 发展的瓶颈,其发生机制及防治一直是心血管领域的热点。支架植入可有效地防止弹性回缩,如何防止内膜增生则是目前的难点。Sharma 等^[6]报道即使是雷帕霉素药物涂层支架应用在复杂病变时仍有 17.4% 的再狭窄率,而这种再狭窄主要由内膜增生引起。内膜增生是 PCI 过程中血管壁损伤后,以平滑肌细胞和大量的细胞外基质为主要成分的组织在内膜及损伤部位堆积,以此构成过度修复的结果。在此过程中炎症反应、细胞的增殖与移行是再狭窄的关键。本研究中组织形态学检查可见损伤后血管中层平滑肌细胞增殖,向内膜下移行,平滑肌细胞大量增殖与细胞基质一起造成了管腔的狭窄,与炎症反应病理生理过程相符。已有越来越多的证据表明炎症在再狭窄的发生发展中起重要作用^[7,8]。Karas 等发现在猪冠状动脉模型中,置入支架的金属丝周围有炎性细胞浸润,而临床研究亦证明再狭窄部位有炎性细胞浸润。

COX-2 在正常情况下,各组织中几乎不存在。只有在各种致炎因子的作用下激活 IKK kinases (IKK),从而在转录水平激活 COX-2,发挥促炎作用,COX-2 主要存在于炎症细胞如组织损伤后的内皮细胞、血管平滑肌细胞等。本研究结果发现,在球囊未损伤侧 COX-2 有微量表达,球囊损伤后 6 h 可见 COX-2 表达增加,2 周达高峰,4 周时仍有较高表达,这与文献^[9]报道基本相似,但 Michiharu 等报道 COX-2 在球囊损伤后第 3 天开始表达,2 周达高峰,表达稍滞后。原因可能是 Michiharu 等检测的是 COX-2 蛋白的表达,可能稍滞后;另外他们所研究的动物是鼠,也可能与种属差异有关。本研究中球囊未损伤侧有 COX-2 微量表达提示 COX-2 可能参与高脂血症促进动脉粥样硬化的形成。而球囊损伤后 COX-2 表达明显增强,表明 COX-2 可能在球囊损伤后再狭窄的过程中起重要作用。相关分析显示 COX-2 与内膜增生呈正相关。提示 COX-2 可能是促进再狭窄发生发展的因素。

李洪涛等^[5]研究发现人类冠状动脉粥样斑块可见 COX-2 的广泛表达。COX-2 还能促进巨噬细胞合成二十烷类物质。二十烷类物质具有促炎症作用,包括增加血管通透性,促进趋化性,促进细胞增殖和

胆固醇的沉积等^[10],这些作用均能促进动脉粥样硬化的形成。近来,有文献报道 COX-2 选择性抑制剂有导致心血管事件发生的可能,在 VIGOR 研究中,一组用 COX-2 选择性抑制剂罗非昔布,另一组则用萘普生,结果发现罗非昔布组心血管事件(主要是血栓性事件)的发生率是萘普生组的 2.38 倍^[11]。COX-2 刺激内皮源性 PGI₂ 活性较强,而 COX-1 刺激血小板源性 TXA₂ 合成的活性较强。所以当选择性抑制 COX-2 时,则打破 PGI₂ 与 TXA₂ 之间的平衡,造成血管收缩,在血流动力学上造成一种易致血栓的状态,这可能解释 COX-2 选择性抑制剂心血管事件发生率升高的原因。

因此,COX-2 分别在血管损伤后动脉内膜增生中和血流动力学中的作用以及两者之间的利弊关系有待于进一步研究。

本研究不足之处是未将 COX-2 选择性抑制剂引入实验。下阶段拟将不同剂量的 COX-2 选择性抑制剂引入实验,有可能进一步揭示 COX-2 与球囊损伤后动脉内膜增生的关系。

[参考文献]

- [1] Chokishi SK, Meger S, Mansour P. PTCA: ten years experience. *Prog Cardiovasc Dis*, 1987, **30** (3): 147-210
- [2] Califf RM, Fortin DF, Frid DT, Harlan WR 3rd, Ohman EM, Bengtson JR, et al. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol*, 1991, **17** (6): 2B-13B
- [3] Indolfi C, Stabile E, Perrino C, Chiariello M. Mechanisms of restenosis after angioplasty and approach to therapy. *Int J Mol Med*, 1998, **2** (2): 143-148
- [4] Newby CA, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction: the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*, 1999, **41** (2): 345-360
- [5] 李洪涛,陈倩,吴宗贵,梁春,潘晓明,樊民,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. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 533-536
- [6] Sharma SK, Shareghi S, Lee PC. Unprotected left main bifurcation lesion: Impact of Drug-Eluting stents. *Am J Cardiol*, 2004, **94** (Suppl 6A): 222E
- [7] Lijnen HR. Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in arterial neointima formation after vascular injury. *Verh K Acad Geneesk Belg*, 2001, **63** (6): 605-622
- [8] Welt FG, Roger G. Inflammation and restenosis in stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1767-776
- [9] Yamada M, Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Narase K, Matsui H, et al. Prostacyclin synthase gene transfer modulates cyclooxygenase-2-derived prostanoic acid synthesis and inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (2): 256-262
- [10] Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1299** (1): 125-240
- [11] Choi HK, Seegar JD, Kuntz KM. Effects of rofecoxib and naproxen on life expectancy among patients with rheumatoid arthritis: a decision analysis. *Am J Med*, 2004, **116** (9): 621-629

(此文编辑 文玉珊)