

阿托伐他汀在大鼠颈总动脉球囊损伤模型中对 NF- κ B 及其相关炎症因子的影响

王敬祥, 张月兰, 田文, 牛晶丽, 曾定尹

(中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市, 110000)

[关键词] 阿托伐他汀; 大鼠; 核因子 κ B; 炎症因子

[摘要] **目的** 研究阿托伐他汀在大鼠颈总动脉球囊损伤模型中对核转录因子 NF- κ B 及其相关炎症因子: 细胞间细胞黏附分子 1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 72 只, 体重 300 ~ 350 g, 随机分为 3 组, 阿托伐他汀干预组为实验组, 通过灌胃法给予阿托伐他汀[10 mg/(kg · d)]; 安慰剂对照组为模型组, 给予等量清水; 空白对照组为假手术组, 只分离出左颈总动脉后缝合, 不作球囊损伤处理, 给予等量清水。药物干预 3 天后实验组与模型组行左侧颈总动脉内膜球囊损伤术, 术后实验组继续每日给予阿托伐他汀, 模型组及假手术组给予等量清水, 每组中各有 6 只于术后 1、3、7 天和 14 天分别处死, 采集血清及颈总动脉标本。采用组织形态学观察内膜增生, 采用免疫组织化学及酶联免疫吸附试验检测 NF- κ B 及 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子的表达。**结果**

阿托伐他汀组球囊损伤后内膜增生面积显著小于模型组($P < 0.01$); 模型组血管壁及血清中 NF- κ B 及炎症因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、IL-6、TNF- α 的表达显著高于假手术组; 阿托伐他汀组血管壁及血清中 NF- κ B 及炎症因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、IL-6、TNF- α 的表达显著低于模型组($P < 0.01$)。**结论** 阿托伐他汀能抑制大鼠颈总动脉损伤后的内膜增生, 其可能机制是通过特异性抑制炎症关键调节因子 NF- κ B, 从而减少其下游炎症因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1、IL-6 及 TNF- α 的表达而实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on NF- κ B and its Related Inflammatory Factors in Balloon Injury Model of Common Carotid Artery in Rats

WANG Jing-Xiang, ZHANG Yue-Lan, TIAN Wen, NIU Jing -Li, and ZENG Ding-Yin

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Rat; NF- κ B; Inflammatory Factors

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of atorvastatin on NF- κ B and its related inflammatory factors of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, IL-6, TNF- α in balloon injury model of common carotid artery in rats. **Methods** In the experiment, a total of 72 male healthy Wistar rats between 300 and 350 gram were randomly divided into three groups. They were as the followings: ① blank control group which were operated without balloon injury or atorvastatin; ② placebo control group which were operated and injured by balloon without atorvastatin; ③ experimental group which were operated and injured by balloon with atorvastatin. In the experiment, the experimental group were given atorvastatin by 10mg/(kg · d) while the two control groups were given the same amount of water instead. After 3 days, all the rats were operated. However, blank control group were operated only without balloon injury. In each group, 6 of them were killed at 1, 3, 7, 14 days after operation and their blood samples and carotid arteriespecimens were taken respectively. Intimal hyperplasia was detected by histomorphology. NF- κ B and its downstream factors were detected by immunohistochemistry. **Results**

The hyperplasia area of intima after balloon injury in the experiment group was significantly smaller than the placebo control group ($P < 0.01$); The expression of NF- κ B and its related factors in vascular wall and serum of the placebo control

[收稿日期] 2011-04-08

[作者简介] 王敬祥, 硕士, 住院医师, 研究方向为冠心病的诊治, E-mail 为 wsjingxiang@yahoo.com.cn。通讯作者张月兰, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的基础和临床研究工作, E-mail 为 zhangzyl3@sina.com。田文, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊治, E-mail 为 dr.wentian@gmail.com。

group was significantly higher than the blank control group ($P < 0.01$); The expression of NF- κ B and its related factors in vascular wall and serum of experiment group was significantly lower than the placebo control group ($P < 0.01$). **Conclusions** Atorvastatin can inhibit intimal hyperplasia of common carotid artery in rats after injury. The mechanism may be that it can specifically inhibit the expression of NF- κ B, which is the key inflammatory regulatory factor. Thus, atorvastatin can reduce the expression of its downstream inflammatory factors of VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, IL-6 and TNF- α .

近年来,冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)成为危害人类健康的罪魁祸首之一,随着医学水平的进步,经皮冠状动脉介入治疗(PCI)成为治疗冠心病的有效手段,但是再狭窄(restenosis, RS)仍是制约这一技术应用的主要问题。大量研究证实,再狭窄的机制主要由于球囊扩张和支架置入时导致血管壁损伤,内皮细胞释放多种细胞因子,并活化核因子 κ B(NF- κ B),NF- κ B得以激活,并移位进入细胞核,与DNA链上特异部位结合,启动基因转录,并相继激活下游相关的炎症因子,如黏附分子(ICAM-1、VCAM-1)、趋化因子(MCP-1)、IL-6、TNF- α 等,而炎症因子正反馈活化NF- κ B,进而形成瀑布效应,在其作用下,原已存在于内膜的平滑肌细胞发生表型转变(由收缩型转变为合成型),并穿过内弹力板窗孔迁移入内皮下间隙,增殖形成新生内膜^[1,2]。本研究通过模拟临床再狭窄,建立大鼠颈总动脉球囊损伤模型,观察阿托伐他汀(atorvastatin)对NF- κ B及其相关炎症因子的影响,探讨阿托伐他汀防治再狭窄的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料及分组

健康雄性Wistar大鼠72只,体重300~350 g,由中国医科大学动物实验中心提供。实验前适应性饲养1周,喂食标准饲料,自由饮水,随机分为3组:空白对照组为假手术组,只分离出左颈总动脉后缝合,不作球囊拉伤处理;阿托伐他汀干预组为实验组,通过灌胃法给予阿托伐他汀[10 mg/(kg·d)];安慰剂对照组为模型组,给予等量清水,每组又分为术后1天、3天、7天、14天4个时间段,每个时间段6只大鼠。药物干预3天后行左侧颈总动脉内膜损伤术,术后实验组继续每日给予阿托伐他汀,假手术组及模型组继续给予等量清水。

1.2 处理方法

参照文献[3]方法并改进,将大鼠麻醉后固定,暴露左颈总动脉,用眼科剪将颈外动脉剪一小口,从小口向近心端插入球囊导管,去除动脉夹,采用普通球囊导管插至颈总动脉起始部,使用压力泵6个大

气压使球囊充分膨胀,慢速回拉球囊至颈总动脉分叉处,反复3次,最后抽出球囊导管中的生理盐水,撤出球囊,结扎颈外动脉,逐层缝合皮下组织与皮肤,放回笼内,普通饲料喂养。术后常规肌注青霉素20万单位3天以预防感染。于术后1、3、7、14天分别处死大鼠,采集血清及颈总动脉标本。

1.3 组织形态学观察

常规烤片、脱蜡、水化后进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜观察血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的移行、增殖及内膜增厚情况,并应用数码摄像系统进行拍照,再利用Image J图像处理系统进行图像编辑,分别测量血管内膜和中膜横断面的面积,以及外弹力膜内横截面积(external elastic lamina, EEL),计算内膜/中膜面积比。每只动物随机选取5张切片进行图像分析,取平均值。

1.4 采用免疫组织染色法检测NF- κ B及炎症因子ICAM-1、VCAM-1、MCP-1的表达

常规烤片、脱蜡、水化后进行免疫组化染色,模型组与实验组大鼠各6条血管,光镜下($\times 400$ 倍)每张血管组织切片随机选取5个视野,通过计算阳性细胞百分数来评定NF- κ B、VCAM-1、ICAM-1、MCP-1的活化情况。通过下面公式计算:阳性细胞百分数=DAB(显色剂)染色的阳性细胞核或胞质/(苏木素染色的细胞核或胞质+DAB染色的阳性细胞核或胞质) $\times 100\%$ 。

1.5 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测不同时间点血清MCP-1、TNF- α 、IL-6的含量

严格按照试剂盒说明书操作,显色后用酶标仪读OD值,再以建立的标准曲线换算出检测指标的真实含量。

1.6 统计学分析

采用SPSS17.0软件包进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行正态性及方差齐性检验,两个正态分布数据均数比较采用 t 检验,多组样本间均数比较采用方差分析,方差齐时采用LSD方法进行两两比较,方差不齐时采用Tamhane's T2法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血管形态学动态变化

光镜下,假手术组大鼠颈总动脉内膜仅见单层内皮细胞,内弹力膜完整(图 1A)。球囊损伤后即刻,可见动脉内皮剥脱(图 1B);模型组球囊损伤术

后 14 天,颈总动脉新生内膜呈均一或不均增厚,管腔呈向心性或偏心性狭窄,内膜增生明显,说明已形成典型损伤后内膜增生动物模型(图 1C);实验组与同一时间点模型组相比,内膜增生明显减轻(图 1D),差异有显著性($P < 0.01$)。术后 14 天内膜增生的形态学分析见表 1。

表 1. 14 天组血管各层面积比较 (mm², $n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of each layer of blood vessels in 14 days group

分 组	内膜面积	中膜面积	EEL 截面积	内/中膜面积比
实验组	0.059 ± 0.043 ^{ab}	0.121 ± 0.042	0.329 ± 0.022	0.521 ± 0.336 ^{ab}
模型组	0.102 ± 0.031 ^b	0.101 ± 0.021	0.319 ± 0.020	1.074 ± 0.498
假手术组	0.012 ± 0.002	0.098 ± 0.010	0.302 ± 0.013	0.122 ± 0.010

a 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

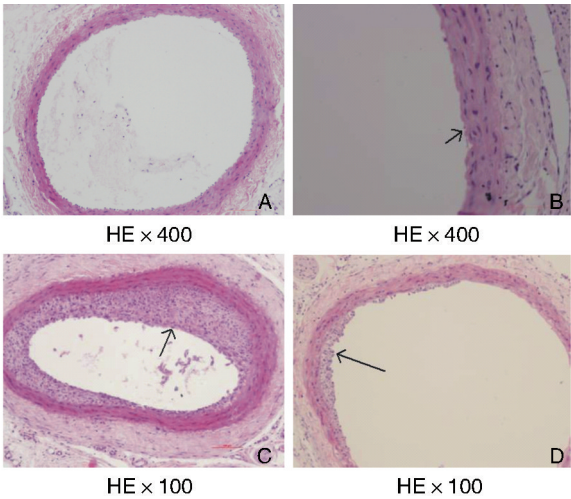


图 1. 球囊损伤术后各组大鼠血管典型的 HE 染色结果 A 为假手术组, B 为损伤后即刻, C 为安慰剂对照组 14 天, D 为实验组 14 天。

Figure 1. Presentative histological sections of common carotid arteries after injury

2.2 免疫组织化学染色检测血管壁 α -SMA、NF- κ B、I- κ B α 、VCAM-1、ICAM-1、MCP-1 表达

阴性对照组可见背景为棕褐色,苏木素复染后胞核呈蓝色,未见特异性染色(图 2A);平滑肌特异肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)免疫组织化学染色表明新内膜中增生的细胞主要为平滑肌细胞(箭头所示),阳性颗粒为棕黄色,胞质及胞核均有表达(图 2B);球囊损伤术后 7 天、14 天模型组 NF- κ B 表达明显高于同一时间点实验组 ($P < 0.05$; 图 3 及表 2);炎症因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 的表达 14 天模型组也明显高于实验组 ($P < 0.05$; 图 4 ~ 图 6 及表 2)。表 2 示模型组阳性细胞百分数

与实验组相比差异有显著性。

表 2. 14 天组中膜和内膜阳性细胞百分比的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 2. Comparison of positive cells percentage of media and intima in 14 days group

指 标	实验组	模型组
NF- κ B p65	0.442% ± 0.057% ^a	0.744% ± 0.125%
ICAM-1	0.478% ± 0.024% ^a	0.768% ± 0.046%
VCAM-1	0.402% ± 0.091% ^a	0.742% ± 0.075%
MCP-1	0.400% ± 0.086% ^a	0.787% ± 0.088%

a 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.3 ELISA 检测 IL-6、MCP-1、TNF- α 的表达

从图 7 ~ 图 9 可以看到,在同一时间点,炎症因子 IL-6、TNF- α 、MCP-1 在实验组的表达明显少于模型组 ($P < 0.01$),但都高于假手术组 ($P < 0.01$) (除 MCP-1 第 14 天实验组);在实验组,炎症因子的表达被逐渐抑制,到 7 天时到达高峰,14 天时炎症因子的表达较 7 天减少 ($P < 0.01$)。模型组炎症因子呈上升趋势,到 14 天到高峰 ($P < 0.05$)。

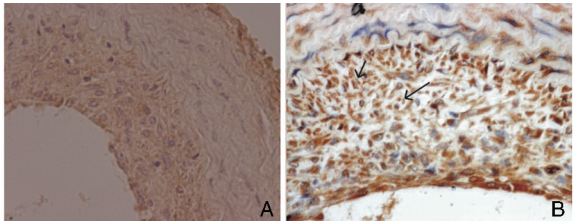


图 2. 阴性对照组与 α -SMA 的免疫组织化学结果 (HE \times 400) A 为阴性对照组, B 为 α -SMA。

Figure 2. Immunohistochemical results in negative control group and the α -SMA

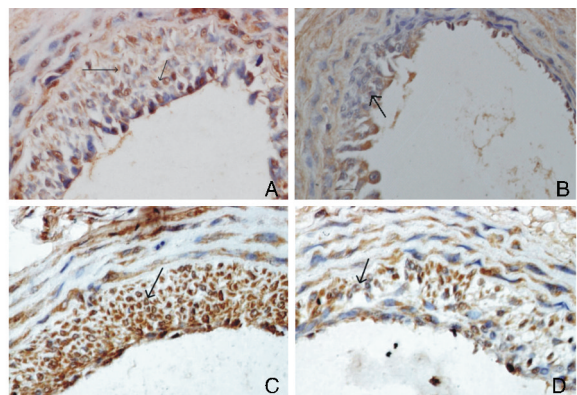


图 3. 模型组与实验组中 NF-κB 的免疫组织化学结果比较

A 为 NF-κB P65 模型组 7 天组, B 为 NF-κB P65 实验组 7 天组, C 为 NF-κB P65 模型组 14 天组, D 为 NF-κB P65 实验组 14 天组。

Figure 3. Comparison of immunohistochemical results of NF-κB in model group and experimental group

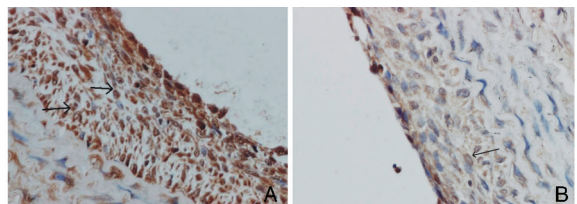


图 4. 模型组与实验组中 ICAM-1 的免疫组织化学结果比较 (×400) A 为模型组 14 天组, B 为实验组 14 天组。

Figure 4. Comparison of immunohistochemical results of ICAM-1 in model group and experimental group

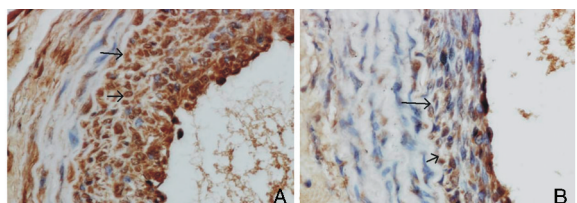


图 5. 模型组与实验组中 VCAM-1 的免疫组织化学结果比较 (×400) A 为模型组 14 天组, B 为实验组 14 天组。

Figure 5. Comparison of immunohistochemical results of VCAM-1 in model group and experimental group

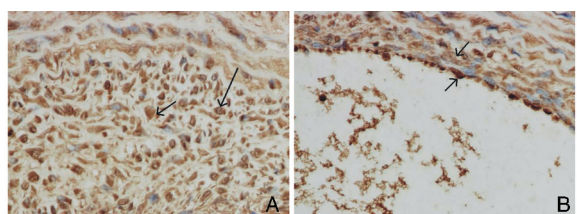


图 6. 模型组与实验组中 MCP-1 的免疫组织化学结果比较 (×400) A 为模型组 14 天组, B 为实验组 14 天组。

Figure 6. Comparison of immunohistochemical results of MCP-1 in model group and experimental group

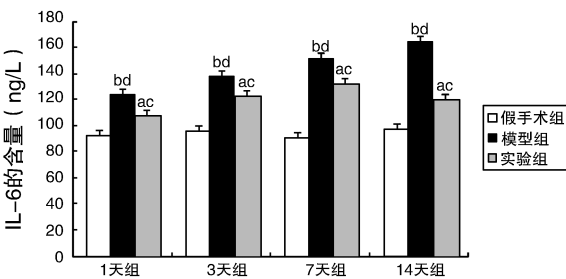


图 7. IL-6 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与模型组及假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; c 为 $P < 0.01$, 实验组中不同天数组两两比较; d 为 $P < 0.01$, 模型组中不同天数组两两比较。

Figure 7. Expression of IL-6

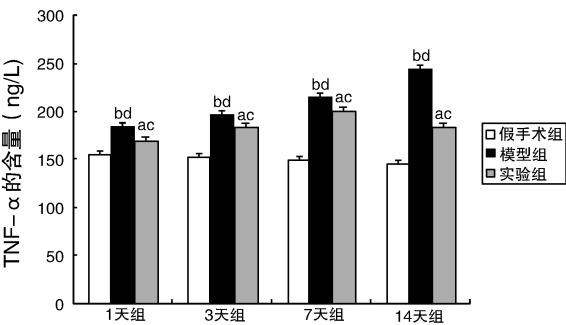


图 8. TNF-α 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与模型组及假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; c 为 $P < 0.01$, 实验组中不同天数组两两比较; d 为 $P < 0.01$, 模型组中不同天数组两两比较。

Figure 8. Expression of TNF-α

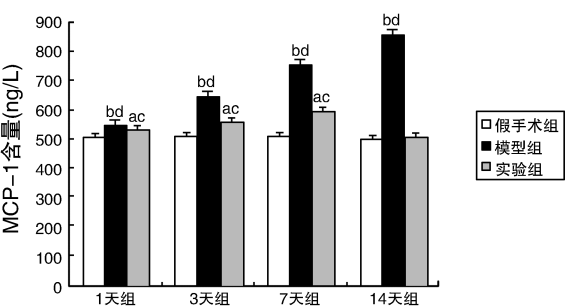


图 9. MCP-1 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与模型组及假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; c 为 $P < 0.01$, 实验组中不同天数组两两比较; d 为 $P < 0.01$, 模型组中不同天数组两两比较。

Figure 9. Expression of MCP-1

3 讨论

大量研究表明:他汀类药物除调脂作用以外,还具有抗炎作用^[4],而再狭窄本质就是一种炎症反应^[1,2]。球囊损伤术后取血管行苏木素-伊红染色,大鼠颈总动脉球囊损伤 7 天、14 天后可见明显的新生内膜形成。与模型组相比,阿托伐他汀组的内膜增生明显减少,而中膜面积和 EEL 截面积相比较没有统

计学意义,表明内膜增生是管腔变窄的主要因素。业已证实,NF- κ B 激活通路是 VSMC 增殖的必经和始动环节^[5,6],它是血管成形术后内膜增生的一个关键调节因子^[7,8]。在免疫组织化学染色中,阳性细胞百分数模型组明显多于实验组,表明 NF- κ B p65 活化后核移位异常活跃,其下游炎症因子 ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 的免疫组化染色阳性细胞数模型组也明显多于实验组,与 NF- κ B 呈现一致性。ELISA 实验表明,炎症因子 IL-6、MCP-1、TNF- α 在实验组的表达明显少于模型组,这表明阿托伐他汀的确抑制了炎症反应;在实验组,炎症因子的表达被逐渐抑制,但仍呈增长趋势,到 7 天时炎症因子的含量到达高峰,14 天时炎症因子的表达较 7 天减少,这表明阿托伐他汀抑制炎症需要一个过程,具有时间依赖性,甚至可以使炎症因子的含量恢复到正常水平范围。

综上所述,阿托伐他汀抑制了一系列瀑布式级联反应的起始点,即 NF- κ B 活化,而由 NF- κ B 启动的 ICAM-1、VCAM-1、IL-6、MCP-1、TNF- α 等下游炎症因子也相应减少,导致平滑肌细胞移行减少,进而内膜增生减少。由此可知阿托伐他汀的抗炎作用的分子机制可能与抑制 NF- κ B 的活化有关,而 ICAM-1、VCAM-1、IL-6、MCP-1、TNF- α 等炎症因子参与了这一过程。但从目前的研究来看,他汀类抗炎机制的分子途径不止一条^[9,10],这还需要进一步深入研究。在临床上,支架后再狭窄仍是制约介入技术发展的一大障碍,而本研究进一步明确了他汀类药物在再狭窄中的作用靶点,这势必会对他汀药物的规范化使用提供更有力的证据。

[参考文献]

[1] Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents [J]. Circulation, 2005, 111 (17): 2

257-273.

- [2] Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era[J]. Arterioscl Thromb Vasc Biol, 2002, 1 (22): 1 769-776.
- [3] Chen SJ, LI H, Durand J, et al. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery [J]. Circulation, 1996, 93 (3): 577-584.
- [4] Tahara N, Kai H, Ishibashi M, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 1 825-831.
- [5] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses[J]. Nat Immunol, 2004, 5 (10): 1 052-060.
- [6] Grassia G, Maddaluno M, Musilli C, et al. The I κ B kinase inhibitor nuclear factor- κ B essential modulator-binding domain peptide for inhibition of injury-induced neointimal formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (12): 2 458-466.
- [7] Murrell M, Khachigian LM, Ward MR. Divergent roles of NF- κ B and Egr-1 in ow-dependent restenosis after angioplasty and stenting [J]. Atherosclerosis, 2011, 214 (1): 65-72.
- [8] Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions[J]. Circulation, 2002, 106: 1 985-990.
- [9] 王红,喻杨,覃军,等. 小鼠颈动脉损伤新生内膜增生与局部转录因子 Id1 的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (4): 253-256.
- [10] 刘平,李永红,苘瑜琳,等. 球囊损伤大鼠主动脉内皮后血管紧张素 II2 型受体的表达及瑞舒伐他汀的干预作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (9): 709-712.

(此文编辑 李小玲)