

急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶 2 mRNA 表达及阿托伐他汀的作用

邓平¹, 赵水平, 白衡初², 周宏年, 聂赛

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011; 1. 长沙市中心医院心内科, 湖南省长沙市 410014;

2. 南华大学附属第二医院放射科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 冠心病单核细胞环氧合酶 2 的表达; 逆转录聚合酶链反应; 急性冠状动脉综合征; 环氧合酶 2; 阿托伐他汀

[摘要] 为检测急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞中环氧合酶 2 表达及阿托伐他汀的影响, 探讨环氧合酶 2 在动脉粥样硬化中的作用和他汀类药物的抗炎机制。采用逆转录聚合酶链反应半定量的方法, 观察 42 例急性冠状动脉综合征患者和 18 例健康自愿者外周血单核细胞环氧合酶 2 的表达, 同时观察急性冠状动脉综合征组单核细胞在不同浓度阿托伐他汀(0~10 μmol/L)干预 24 h 后环氧合酶 2 表达的变化。结果发现, 急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞中环氧合酶 2 的表达明显高于健康对照组(1.64±0.25 比 0.59±0.21, $P<0.05$)。阿托伐他汀在体外明显抑制急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶 2 的表达($P<0.05$), 且呈浓度依赖性。结果提示, 环氧合酶 2 在动脉粥样硬化炎症中起作用, 阿托伐他汀明显降低急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶 2 的表达, 环氧合酶 2 可能是阿托伐他汀发挥降脂外抗炎作用的靶点之一。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Atorvastatin Reduces the Expression of Cyclooxygenase-2 mRNA in Peripheral Blood Monocytes From Patients with Acute Coronary Syndrome

DENG Ping¹, ZHAO Shui-Ping, BAI Heng-Chu², ZHOU Hong-Nian, and NIE Sai

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; Department of Cardiology, Changsha Central Hospital, Changsha 410011; Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001; China)

[KEY WORDS] Cyclooxygenase-2; Acute Coronary Syndrome; Atorvastatin; Atherosclerosis; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute coronary syndrome (ACS), and the effects of atorvastatin on it. **Methods** Expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from 18 normal control subjects and 42 patients with acute coronary syndrome were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the monocytes from patients had been incubated with atorvastatin (0~10 μmol/L) in vitro. **Results** Expression of COX-2 mRNA significantly increased in peripheral blood monocytes from the patients with ACS compared with those from normal control subjects (1.64±0.25 vs 0.59±0.21, $P<0.05$). Atorvastatin significantly reduced the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with ACS ($P<0.05$), and the reduction is relative to the concentration of atorvastatin. **Conclusions** These findings suggest that COX-2 may play an important role on the inflammation in atherosclerosis. Atorvastatin may have anti-inflammatory effects which are related to its effect on COX-2.

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 炎症参与了动脉粥样硬化斑块形成和破裂。环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是前列腺素这一重要组织源性炎症介质合成的限速酶, 本文通过检测急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者外周血单核细胞中环氧合酶 2 mRNA 的表达, 以及他汀类药物阿托伐他汀的影响, 探讨环氧合酶 2 在动

脉粥样硬化炎症中的作用及他汀类药物的抗炎机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择典型急性冠状动脉综合征患者 42 例(不稳定型心绞痛 30 例, 急性心肌梗死 12 例), 其中男性 32 例, 女性 10 例, 年龄 60.7±7.2 岁, 均经临床检查、心电图和心肌酶学检查确诊。选择健康自愿者 18 例, 其中男性 14 例, 女性 4 例, 年龄 59.2±9.5 岁。被选对象均排除以下情况: 周围血管疾病或周围血管栓塞性疾病、脑卒中、严重肝肾功能不全、感

[收稿日期] 2004-01-18

[修回日期] 2004-07-15

[作者简介] 邓平, 医学博士, 副主任医师, 主要从事动脉粥样硬化及炎症的研究, E-mail 为 pamelat7937@sina.com。赵水平, 教授, 博士研究生导师, 主要从事临床血脂学和动脉粥样硬化的研究。

染、高热、自身免疫性疾病、服用抗生素或非甾体类消炎药物和入选前2周内服用降脂药物等。

1.2 采血、细胞分离和培养

分别取健康自愿者外周血5 mL,急性冠状动脉综合征患者外周血20 mL于无菌抗凝管中,用Hank'S液等倍稀释,制成细胞悬液;在透明无菌的离心管中加入淋巴细胞分离液(体积为细胞悬液体积的1/2),将细胞悬液缓慢地加在分离液上面;2 000 r/min水平离心20 min;用毛细吸管吸取中间的乳白色层于另一无菌离心管中;用5~6倍体积的Hank'S液离心洗涤2次,用RPMI1640培养基离心洗涤1次,每次离心速度为1 500 r/min,时间为10 min;将洗涤后的细胞沉渣加入1 mL含10%胎牛血清的完全1640培养基,混匀;进行细胞计数,并用2%苔盼蓝染色,计数活细胞,活细胞大于95%;用完全1640培养基稀释,置于细胞培养孔中,其中急性冠状动脉综合征组细胞需分置于四个培养孔中,每孔细胞数调定为 1×10^7 个,37℃、5% CO₂孵育箱中培养6 h,去除上清液,得到贴壁的单核细胞;各孔加入完全1640培养基5 mL和脂多糖5 μg(终浓度1 mg/L),同时急性冠状动脉综合征组分别加入终浓度为0、0.1、1和10 μmol/L阿托伐他汀(北京红辉制药有限公司提供),37℃、5% CO₂孵育箱中培养24 h后收集贴壁细胞。

1.3 单核细胞总RNA提取和逆转录聚合酶链反应扩增

用Trizol方法提取单核细胞总RNA,采用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA后,进行PCR扩增。环氧合酶2上游引物5'-AAGCTGGGAAGCCT-TCTCTA-3',下游引物5'-TTTCCATCCIT-GAAAAGGCGC-3',扩增片段为342 bp。内参Cyclophlin上游引物5'-ATGGTCAACCCAC-CGTGTTCTTCG-3',下游引物5'-CGTGTGAAGTCAC-CACCTGACACA-3',扩增片段206 bp。94℃预变性3 min后,94℃变性50 s→55℃退火50 s→72℃延伸1 min,共38个循环,72℃延伸10 min。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,以环氧合酶2的相对吸光度表示,环氧合酶2的相对吸光度=环氧合酶2吸光度A值÷Cyclophlin吸光度A值。

1.4 统计学分析

应用SPSS统计软件包进行统计分析。所有检测指标进行正态性检验,正态分布的各计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组基本资料的比较

急性冠状动脉综合征患者和健康对照者的性别、年龄、烟龄、体质指数、肾功能、血红蛋白和血糖等无明显差别。急性冠状动脉综合征患者血总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇、外周血白细胞总数明显高于健康对照者。

表1. 急性冠状动脉综合征患者与健康对照者基本资料比较

Table 1. Baseline characteristics of patients with acute coronary syndrome and normal control subjects

指 标	ACS 组 (n = 42)	健康对照组 (n = 18)
年龄 (岁)	60.7 ± 7.2	59.2 ± 9.5
男/女 (例)	32/10	14/4
体质指数 (kg/m ²)	21.9 ± 2.4	20.5 ± 3.1
吸烟 [例(%)]	18 (43%)	7 (39%)
收缩压 (mm Hg)	128.4 ± 21.9 ^a	112.5 ± 12.5
舒张压 (mm Hg)	72.5 ± 9.5	71.2 ± 8.6
甘油三酯 (mmol/L)	2.31 ± 0.37	1.25 ± 0.14
总胆固醇 (mmol/L)	5.69 ± 1.67 ^a	4.11 ± 0.91
HDL-C (mmol/L)	1.13 ± 0.31 ^a	1.49 ± 0.36
LDL-C (mmol/L)	3.25 ± 0.92 ^a	2.05 ± 0.74
肌酐 (mmol/L)	127.3 ± 25.6	106.4 ± 18.2
尿酸 (mmol/L)	405.1 ± 129.2	375.2 ± 111.3
空腹血糖 (mmol/L)	5.71 ± 2.11	5.26 ± 0.74
血红蛋白 (g/L)	132.4 ± 16.3	131.9 ± 14.2
白细胞 ($\times 10^9/L$)	6.9 ± 3.1 ^a	5.2 ± 1.6

a: $P < 0.05$, 与健康对照组比较。

2.2 外周血单核细胞环氧合酶2表达水平

急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞中环氧合酶2 mRNA表达明显高于健康对照组。阿托伐他汀在体外明显抑制急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶2 mRNA表达,且呈浓度依赖性(图1和表2, Figure 1 and Table 2)。

3 讨论

炎症在动脉粥样硬化斑块形成和破裂中起重要作用^[1,2],单核/巨噬细胞是急性冠状动脉综合征中的主要炎症细胞。环氧合酶有两种异构酶,环氧合酶1和环氧合酶2。环氧合酶1是结构性表达酶,介导细胞的某些重要生理功能;而环氧合酶2的表达受多种促炎因子的诱导,主要存在于炎症细胞中,如

表 2. 各组外周血单核细胞环氧合酶 2 逆转录聚合酶链反应产物相对吸光度的变化

Table 2. Relative absorbance value of cyclooxygenase-2 by RT-PCR in groups

分 组	COX-2 相对吸光度
健康对照组	0.59±0.21
阿托伐他汀 0 μmol/L	1.64±0.25 ^a
0.1 μmol/L	1.12±0.17 ^b
1 μmol/L	0.81±0.12 ^b
10 μmol/L	0.71±0.13 ^b

a: $P < 0.05$, 与健康对照组相比较; b: $P < 0.05$, 与 0 μmol/L 组相比较。

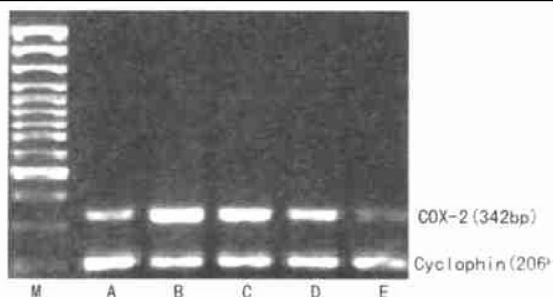


图 1. 逆转录聚合酶链反应分析结果 M 为标准分子量 DNA; A 为健康对照组; B、C、D 和 E 均为 ACS 组, 阿托伐他汀的干预浓度分别为 0 μmol/L、0.1 μmol/L、1 μmol/L 和 10 μmol/L。

Figure 1. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA by RT-PCR

组织损伤后的内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞和成纤维细胞中。有研究表明, 环氧合酶 2 在人类动脉粥样硬化血管中的单核/巨噬细胞、中层平滑肌细胞和内皮细胞中广泛表达^[3,4]。本研究观察到, 急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞环氧合酶 2 表达明显增加, 进一步支持环氧合酶 2 参与了动脉粥样硬化发展过程这一观点。环氧合酶 2 参与动脉粥样硬化发生发展的机制尚不清楚, 可能与前列腺素产物增加有关。已有大量研究表明前列腺素产物能增加血管渗透性, 促进单核细胞粘附, 诱导巨噬细胞化学趋化性, 促进巨噬细胞迁移, 刺激炎症性细胞

因子产生, 激活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP), 并使白细胞和血小板活化^[5-8]。

他汀类药物为 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 目前大量的研究表明它能明显降低冠心病患者的死亡率和心血管事件发生率, 他汀类除有效地降血脂外, 还具有非降脂性抗炎作用^[9]。我们采用阿托伐他汀对急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞体外干预, 发现阿托伐他汀以浓度依赖方式降低环氧合酶 2 表达, 提示他汀类药物可能至少通过环氧合酶 2 途径发挥抗炎作用。其可能机制是环氧合酶 2 的表达受核因子 κB (NF- κB) 调控^[10], 而他汀类药物能有效降低 NF- κB 活性^[11], 从而下调环氧合酶 2 表达。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] 彭道泉, 赵水平, 李江, 周宏年. 可溶性 CD40 配体与急性冠状动脉综合征的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 159-161
- [3] Schonbeck U, Sukhove GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1999, **155**: 1281-291
- [4] Hong BK, Kwon HM, Lee BK, Kim K, Kang SM, Jang Y, et al. Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions. *Yonsei Med J*, 2000, **41**: 82-88
- [5] Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin-6 is induced by prostaglandin in E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 4885-890
- [6] Kreuzer J, Denger S, Jahn L, Bader J, Ritter K, Von Hodenberg E, et al. LDL stimulates chemotaxis of human monocytes through a cyclooxygenase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (12): 1481-487
- [7] Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology*, 2001, **33** (4): 860-867
- [8] Shankavaram UT, Lai WC, Netzel-Arnett S, Mangan PR, Ardans JA, Caterina N, et al. Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. Prostaglandin dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. *J Biol Chem*, 2001, **276** (22): 19027-032
- [9] 李江, 赵水平, 彭道泉, 李全忠, 聂 寨. 西立伐他汀对 THP-1 细胞 CD40 和基质金属蛋白酶 9 表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 533-536
- [10] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κB . A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 1997, **336**: 1066-071
- [11] Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortega M, Tunon J, Ortega L, Perez F, et al. HMG-CoA reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **32**: 2057-064

(此文编辑 文玉珊)