

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000293

缬沙坦对动脉粥样硬化大鼠模型主动脉内皮细胞保护作用及对血浆内皮脂肪酶水平影响

姚恩辉¹, 王华军², 许昌声²

(1. 福建医科大学附属协和医院心血管内科, 福州 350001;

2. 福建医科大学附属第一医院福建高血压研究所, 福州 350001)

【摘要】目的:通过血管紧张素Ⅱ受体阻断剂(angiotensinⅡ receptor blocker, ARB)对动脉粥样硬化性大鼠模型进行治疗, 探讨 ARB 对主动脉内皮细胞保护作用。**方法:**30 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 模型组通过高脂饲料建立动脉粥样硬化大鼠模型, 实验组增加缬沙坦干预, 8 周后比较各组主动脉内皮一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮素(endothelin, ET)、细胞色素 c(cytochrome, Cyt-c)及内皮脂肪酶(endothelial lipase, EL)水平。**结果:**实验结束时, 模型组 HE 染色可见明显斑块形成并伴有大量脂质细胞浸润, Cyt-c 免疫组化染色显示内皮细胞凋亡阳性率(36.85 ± 12.45), 高于对照组(0.81 ± 0.11)和实验组(13.85 ± 6.41)($P=0.000$), 平滑肌细胞凋亡阳性率(9.65 ± 2.62)高于对照组(0.06 ± 0.01)($P=0.000$), 但与实验组(7.85 ± 1.34)差异无统计学意义($P=0.058$); 模型组和实验组总胆固醇(total cholesterol, TC)和低密度脂蛋白-胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)明显增加, 与对照组相比差异具有统计学意义($P=0.000$); 模型组和实验组相比, TC 和 LDL-C 差异也有统计学意义($P=0.000$ 和 0.002); 模型组和实验组大鼠 ET-1、NO、EL 与对照组相比差异均有统计学意义($P=0.000$), 与模型组相比, 实验组 NO 水平升高, ET-1、EL 水平降低, 差异具有统计学意义($P=0.017$, 0.008 和 0.000)。**结论:**缬沙坦在细胞损伤期, 即具有明显内皮细胞保护功能。对动脉粥样硬化患者早期用药, 能够保护细胞完整性, 减少凋亡发生, 起到疾病预防和治疗的重要意义。

【关键词】动脉粥样硬化; 缬沙坦; 内皮细胞; 疾病模型**【中图分类号】**R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-01-26

Effects of valsartan on aortic endothelial cells and plasma endothelial lipase levels of atherosclerosis rat model

Yao Enhui¹, Wang Huajun², Xu Changsheng²

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University;

2. Fujian Hypertension Research Institute, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of angiotensinⅡ receptor blocker on atherosclerosis aortic endothelial cells through treating atherosclerotic rats with ARB. **Methods:** Totally 30 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: model group, experiment group and control group with 10 rats in each group. Atherosclerosis rat model was established in model group by feeding high fat diet. Valsartan intervention was added in experiment group. After eight weeks, nitric oxide (NO), endothelin (ET), cytochrome-c (Cyt-c) and plasma endothelial lipase (EL) levels of aortic endothelial cells were compared. **Results:** At the end of the experiment, HE staining of model group showed obvious plaque formation with a large amount of lipid infiltration. Immunohistochemical staining of Cyt-c showed that the positive rate of apoptosis of endothelial cells were higher in model group (36.85 ± 12.45) than in control group (0.81 ± 0.11) and experimental group (13.85 ± 6.41) ($P=0.000$). The positive rate of apoptosis of smooth muscle cells was higher than in model group (9.65 ± 2.62) than in control group (0.06 ± 0.01) ($P=0.000$), but did not statistically different from that of experimental group (7.85 ± 1.34) ($P=0.058$). Total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in model group and experimental group were increased significantly, however, did not statistically different those in control group ($P=0.000$). There was statistically significant difference in TC and LDL-C between model group and experimental group ($P=0.000$, $P=0.002$). There was statistically significant difference in ET-1, NO, EL between model group, experimental group and control group ($P=0.000$). There was statistically significant difference in ET-1, NO, EL between model group and experimental group ($P=0.017$, 0.008 , 0.000). **Conclusion:** Valsarta can protect function of endothelial cells during cell injury period. For patients with early atherosclerosis, Valsarta could protect the integrity

of cells, reduce the apoptosis, playing a significant role in the prevention and treatment of disease.

【Key word】valsartan; atherosclerosis; endothelial cell; disease models

作者介绍: 姚恩辉, Email: yh_214@163.com,

研究方向: 动脉硬化, 高血压。

基金项目: 福建省医学创新课题计划资助项目 (编号: 2012-cx-19)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000293.html>

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要病理基础,其机制为富脂斑块在大动脉的积聚^[1]。前期研究表明^[2],血管紧张素 II 受体阻断剂(angiotensin II receptor blocker, ARB)具有抗缺血、抗动脉硬化、稳定斑块的作用。但 ARB 是否参与内皮细胞功能,干预主动脉内皮细胞损伤尚无明确定论。本研究以缬沙坦为例,通过对动脉粥样硬化模型大鼠内皮素(endothelin, ET)和血浆内皮脂肪酶(endothelial lipase, EL)水平的测定,分析 ARB 对大鼠内皮细胞保护作用,进而探讨 ARB 降低不良心血管事件发生的机理和早期用药的意义。

1 资料与方法

1.1 模型建立

选择 Wistar 雄性大鼠 30 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,平均体质量(200 ± 20) g(中科院上海实验动物中心,批号 SCXK2012-0014),按体质量随机分为 3 组,每组 10 只。均饲养于我院动物房中。对照组以基础饲料喂食,模型组和实验组喂养高脂饲料,即 81.3%基础饲料+10%猪油+4%白糖+4%胆固醇+0.5%胆酸钠+0.2%丙基硫氧嘧啶,实验组在模型组基础上增加缬沙坦(葛兰素史克,批号 20110654)灌胃处理,每日 1 次,剂量按照 10 mg/kg 体质量换算。同时在喂食前,实验组和模型组给予一次性腹腔注射维生素 D3 45 万 IU/kg 以进一步诱发动脉损伤和粥样斑块形成,对照组给予同体积生理盐水注射。

1.2 检测指标

喂养开始前和治疗结束后对所有动物进行心率、血脂等指标测量,以尾动脉收缩压作为大鼠血压,并进行血浆 EL、ET 和一氧化氮(nitric oxide, NO)水平测定。

1.2.1 血浆 EL 水平测定 连续喂养 8 周后抽取主动脉血,

置于 EDTA 抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清液与 EP 管中,-20 ℃保持待测。以酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆 EL 水平(试剂盒由南京建成生物有限公司提供),按说明书操作。

1.2.2 主动脉内皮细胞功能检测 连续喂养 8 周后处死大鼠,剥离主动脉匀浆进行检测。一部分进行放射免疫法测定 ET(试剂盒由北京中桥生物工程有限公司提供),硝酸还原酶法测定 NO(试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供),按说明书操作。其余部分以 10%中性甲醛固定、HE 染色,免疫组化测定大鼠胸主动脉病理变化及细胞色素 c(cytochrome, Cyt-c)水平。

1.3 统计学分析

本研究结果由 SPSS 17.0 软件包进行分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)形式描述,均通过正态性检验。3 组间的整体比较为单因素方差分析,各组间的两两比较,为 LSD-*t* 检验;部分观测资料为治疗前后 2 个时点的重复测量,考虑疗前基数可能影响疗后状态,故行单因素方差-协方差分析,以疗前水平为协因素,对疗后资料行统计控制。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 干预前及干预 8 周后 3 组各指标比较

3 组大鼠的体质量等 5 项指标资料列于表 1。该资料均为疗前疗后 2 次观测所得。考虑到一些指标的疗后水平如体质量等,不仅受试验影响,还可能受疗前基数制约,故采用单因素方差-协方差分析,把这些指标的疗前水平作为协因素处理,以统计校正的方式对疗后水平的组间差异做客观判断。

统计结果:所有指标的协方差分析均有意义($P<0.05$),佐证统计校正的客观性;3 组大鼠的疗前各组间各种指标差异均无统计学意义($P>0.05$),佐证分组随机,均衡可比;干预 8 周后,模型组体质量增加明显甚至超过对照组和实验组

表 1 干预后 3 组大鼠各指标变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Changes in indexes of three groups after the intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)		TC (mmol/l)		LDL-C (mmol/l)		HR (次/min)		血压(mmHg)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A. 对照组	201.46 ± 18.00	241.71 ± 26.09	2.62 ± 0.23	2.70 ± 0.42	1.22 ± 0.45	1.25 ± 0.42	44.98 ± 13.97	45.12 ± 10.98	101.19 ± 15.54	103.88 ± 26.33
B. 模型组	196.36 ± 16.08	345.38 ± 37.09	2.49 ± 0.57	16.47 ± 0.81	1.51 ± 0.58	11.00 ± 0.41	45.92 ± 16.01	43.98 ± 14.90	102.43 ± 19.84	109.76 ± 32.28
C. 实验组	207.67 ± 20.93	283.45 ± 41.21	2.82 ± 0.57	15.89 ± 0.37	1.46 ± 0.52	10.18 ± 0.23	45.89 ± 18.01	45.03 ± 17.03	103.56 ± 21.58	106.89 ± 17.19
整体方差-协方差分析(<i>F, P</i>)										
方差分析	0.94, 0.402	21.74, 0.000	1.18, 0.322	1 878.48, 0.000	0.87, 0.429	2 199.19, 0.000	0.01, 0.989	0.02, 0.981	0.04, 0.963	0.13, 0.881
协方差分析	58.80, 0.000		28.95, 0.000		54.32, 0.000		50.35, 0.000		20.74, 0.000	
校正后方差分析	-	80.97, 0.000	-	3 812.57, 0.000	-	5 947.84, 0.000	-	0.11, 0.893	-	0.16, 0.850
校正后多重比较-LSD 检验(LSD- <i>t, P</i>)										
A vs. B	-	7.10, 0.000	-	54.35, 0.000	-	56.86, 0.000	-	0.28, 0.780	-	0.41, 0.686
A vs. C	-	2.02, 0.053	-	50.97, 0.000	-	52.16, 0.000	-	0.12, 0.907	-	0.07, 0.941
B vs. C	-	5.08, 0.000	-	3.38, 0.002	-	4.70, 0.000	-	0.16, 0.870	-	0.33, 0.742

($P<0.05$);模型组和实验组总胆固醇(total cholesterol,TC)和
低密度脂蛋白-胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,
LDL-C)明显增加,与对照组相比差异具有统计学意义($P<$
0.05);模型组和实验组相比,差异也有统计学意义($P<0.05$);
模型组血压 3 组之间相比,差异并无统计学意义($P>0.05$);
各组心率干预前后差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见表 1。

2.2 干预 8 周后大鼠主动脉病理改变情况

对照组主动脉光镜下内皮细胞完整,内膜、中膜、外膜分
界清楚;模型组内皮细胞碎裂、脱落,内膜增厚并见斑块,并
有大量脂质和泡沫细胞沉积,中膜萎缩,局部管壁向内突出,
提示建模成功;实验组斑块也有形成但面积明显小于模型组。
见图 1。

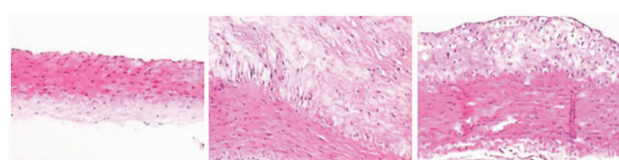


图 1 3 组大鼠主动脉病理改变(HE 染色,100×)

Fig.1 Pathological changes in rat aorta in three groups

(HE staining, 100×)

2.3 干预后 3 组大鼠 NO、ET-1 和 EL 水平比较

3 组大鼠 NO、ET-1 和 EL 水平资料列于表 2。经单因素
方差分析;3 个指标的 3 个组整体比较,差异均有统计学意义。
遂进行两两两组间精细比较。比较知:模型组和实验组大鼠
NO、ET-1、EL 与对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$),
与模型组相比,实验组 NO 水平升高,ET-1、EL 水平降低,差
异具有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 干预后 3 组大鼠 NO、ET-1 和 EL 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of NO,ET-1 and EL levels in three groups
after the intervention ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	NO($\mu\text{mol/l}$)	ET-1(pg/ml)	EL(ng/ml)
A. 对照组	10	81.25 $\pm$ 11.26	48.07 $\pm$ 16.95	330.15 $\pm$ 28.95
B. 模型组	10	51.36 $\pm$ 10.68	92.56 $\pm$ 26.25	399.85 $\pm$ 18.84
C. 实验组	10	66.15 $\pm$ 16.52	66.51 $\pm$ 15.85	353.65 $\pm$ 24.86
整体比较(F,P)		13.29,0.000	12.10,0.000	21.14,0.000
多重比较: B vs. A		5.16,0.000	4.90,0.000	6.37,0.000
LSD-t, P C vs. A		2.61,0.015	2.04,0.051	2.07,0.048
C vs. B		2.55,0.017	2.86,0.008	4.30,0.000

2.4 主动脉内皮细胞 Cyt-c 免疫组化染色内皮细胞、平滑肌细胞阳性率

3 个组的主动脉内皮细胞 Cyt-c 免疫组化染色内皮细胞、平滑肌细胞阳性率资料列于表 3。亦经单因素方差分析,
2 个指标的 3 组间整体比较均有统计学差异。结合图 2 及实
验数据的两两组间比较:对照组细胞内可见明显棕黄色颗粒,
模型组棕黄色颗粒较多,实验组颗粒多于对照但明显少于模

型组;模型组和实验组内皮细胞和平滑肌细胞阳性率高于对
照,差异具有统计学意义($P<0.05$);实验组内皮细胞阳性率
低于对照($P<0.05$),但平滑肌细胞阳性率与模型组差异无统
计学意义($P>0.05$)。详见表 3、图 2。

表 3 主动脉内皮细胞 Cyt-c 免疫组化染色内皮细胞、
平滑肌细胞阳性率(%)

Tab.3 Positive rate of endothelial cells and smooth muscle cells
in aortic endothelial cell Cyt-c by immunohistochemical
staining (%)

组别	例数(n)	内皮细胞	平滑肌细胞
A:对照组	10	0.81 $\pm$ 0.11	0.06 $\pm$ 0.01
B:模型组	10	36.85 $\pm$ 12.45	9.65 $\pm$ 2.62
C:实验组	10	13.85 $\pm$ 6.41	7.85 $\pm$ 1.34
整体比较:F,P		50.76,0.000	88.98,0.000
多重比较:LSD-t,P B vs. A		9.95,0.000	12.54,0.000
C vs. A		3.60,0.001	10.22,0.000
C vs. B		6.35,0.000	2.32,0.028



图 2 3 组大鼠主动脉内皮细胞 Cyt-c 免疫组化

(eNOS 染色,100×)

Fig.2 Immunohistochemistry of aortic endothelial cells Cyt-c in
three groups (eNOS 染色,100×)

3 讨论

血管内皮具有生成、激活和释放活性物质的功
能^[4],可以参与血液循环,对心血管功能起到调节作
用。它不但可以感知血流压力、激素水平及血液中
炎性因子变化,而且可以根据这些变化起到调节血
管舒缩状态作用。多项研究已证明^[5-6],LDL-C 和游
离 TC 是动脉粥样硬化发生发展过程中的独立危险
因素,它在巨噬细胞转变为泡沫细胞、内皮细胞增
殖、调节和凋亡中起到重要作用。在动脉粥样硬化
形成过程中,内皮细胞可产生内源性抗氧化剂,而
Ang II 可以促进 LDL 的氧化和摄取,从而形成大量
氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL),而高剂量 ox-LDL
具有明显细胞毒性,可通过细胞膜上的中性神经鞘
磷脂酶途径,触发细胞凋亡的发生;游离 TC 也具有
细胞毒性,能够启动巨噬细胞的凋亡。本研究中发现,
模型组 TC 和 LDL 水平明显增高,证明模型建立

成功,而缬沙坦对动脉粥样硬化的治疗作用并不是通过降低 TC 和 LDL 实现。

ET-1 和 NO 是血管内皮产生的具有缩血管和舒血管作用的 2 种活性物质^[7]。ET-1 可以促进内皮细胞 Ang II 的合成,促使细胞钙超载,并诱导内皮细胞增殖,使外周血阻力升高^[8];而 NO 具有舒血管、降血压的作用,它可以抑制内皮细胞表面白细胞或中性粒细胞黏附,使内皮细胞 Ang II 和 ET 释放受到抑制^[9]。在动脉粥样硬化过程中,NO 合成功能下降,ET-1 水平增加,提示内皮摄取 HDL 增加,血管壁对 Ang II 受体敏感度增加,ET-1 和 NO 平衡破坏,进一步加重可导致高血压^[10]。本研究经高脂饮食+维生素 D 注射后,模型组呈现此特点,并伴有镜下脂质斑块的形成,说明建模成功。Cyt-c 是线粒体呼吸链中电子传递的中药载体。冯雅君和郭锦丽^[11]认为,Cyt-c 是细胞凋亡的启动子,可以在各种凋亡诱因的刺激下,从线粒体中释放出来,影响电子运转过程,破坏线粒体跨膜电位的形成,得到 ATP 生成障碍,从而引起细胞死亡。有人认为^[6],线粒体诱导凋亡的机制可能与 Ca^{2+} 依赖性释放有关。也有研究认为^[8],Cyt-c 可能与细胞凋亡的关键酶 Caspases 存在相关性,Cyt-c 可以与 Caspases9 结合形成凋亡复合物,激活 Caspase-3、6、7 等,并启动凋亡级联反应。本研究以 Cyt-c 为研究目标,分析缬沙坦对内皮细胞的保护作用。结果发现,在试验组中,大鼠内皮细胞和平滑肌细胞阳性率明显低于模型组,甚至接近正常对照水平,说明缬沙坦能够改善动脉硬化大鼠内皮功能障碍,减少硬化斑块造成的内皮细胞凋亡损伤,对全身内皮功能具有保护作用。

EL 是脂肪酶家族新成员,参与血管壁的重塑,是 HDL 胆固醇代谢的关键因子^[12]。周昌龙等^[13]认为,EL 水平增加,往往提示局部血管动脉粥样硬化的发生。本研究结果显示,模型大鼠主动脉 EL 水平升高,而缬沙坦治疗后 EL 水平下降,进一步验证了缬沙坦能够调节机体酶代谢水平,在细胞-脂蛋白-蛋白聚糖乃至脂蛋白脂肪酶、肝脂酶形成中具有重要作用。

既往研究^[13-14]多从缬沙坦抗炎、阻断 Ang II 介导的炎症级联反应、促进血管新生等方向进行,认为动脉粥样硬化的发病主要考虑斑块内慢性炎症作用,而近年来研究认为^[15],粥样硬化更可能是机体动脉的内皮功能损伤所致,损伤是炎症反应的前期阶

段。缬沙坦在细胞损伤期,即具有明显内皮细胞保护功能。对动脉粥样硬化患者早期用药,能够保护细胞完整性,减少凋亡发生,起到疾病预防和治疗的重要意义。

参 考 文 献

- [1] 边云飞,赵 欣,李茂莲,等.阿托伐他汀对 TNF- α 和 IL-1 β 诱导的大鼠主动脉内皮细胞 PAPP-A 表达的影响[J].中国病理生理杂志,2011,27(7):1335-1337.
- [2] 夏金盈,李 莹.内皮微颗粒与糖尿病患者内皮功能障碍关系的研究进展[J].中国糖尿病杂志,2012,33(10):248-250.
- [3] 陈永宏,周建忠,张松涛.肾性高血压大鼠内皮脂肪酶表达与血管重构的关系及机制初探[J].四川医学,2012,31(12):154-156.
- [4] Wang Y,Zhang MX,Meng X,et al.Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2011,300(5):1743-1752.
- [5] 彭 艳,覃 数,刘 剑,等.血脂康对慢性心力衰竭患者血清 TNF- α 和血管内皮功能的影响[J].重庆医学,2009,31(4):145-147.
- [6] 王国峰,陆 峰,赵 霞,等.川芎对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中华老年心脑血管病杂志,2012,16(3):125-127.
- [7] Nusca A,Melfi R,Patti G,et al.Statin loading for acute coronary syndromes[J].Curr Opin Cardiol,2010,25(4):373-378.
- [8] 郑宏超,李 宁,丁悦有,等.缬沙坦对兔高尿酸血症诱导的动脉粥样硬化的影响[J].上海医学,2012,22(12):248-250.
- [9] 陈 伟,谈 红,李晓燕,等.缬沙坦对冠心病外周血内皮祖细胞的动员作用及影响内皮功能的机制[J].山东医药,2011,33(25):126-128.
- [10] 黄 琳,徐 瑞,张 莉,等.高血压合并颈动脉斑块患者内皮功能的变化及其影响因素[J].中华临床医师杂志(电子版),2013,21(13):1015-1017.
- [11] 冯雅君,郭锦丽.氯沙坦对原发性高血压患者的疗效及血管内皮功能的影响[J].中国药业,2012,15(5):364-366.
- [12] 马 颖,何媛利.VEGF 对内皮抑素诱导的血管内皮细胞凋亡的抑制作用[J].重庆医学,2011,32(2):312-314.
- [13] 周昌龙,孙晓川,贺学农,等.血管紧张素 II-1 受体拮抗剂对自发性脑出血大鼠脑组织中 VEGF 含量的影响[J].中国临床神经外科杂志,2012,34(10):15-17.
- [14] Wallace SM,Yasmin L,McEniery CM,et al.Isolate systolic hypertension is characterized by increased aortic stiffness and endothelial dysfunction[J].Hypertension,2012,50(1):228-233.
- [15] 刘 佳,王笑云,徐亚光,等.氟伐他汀联合氯沙坦对血管紧张素 II 诱导的人足细胞血管内皮生长因子表达的影响及机制研究[J].中华肾脏病杂志,2012,24(9):278-280.

(责任编辑:冉明会)