

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000758

一氧化氮在阿托伐他汀钙抗动脉粥样硬化中的作用

刘 星, 马东明, 诸 波, 查克岚, 陈俞瑾, 郑舒展, 蔡毅华, 杨 悠, 范忠才

(泸州医学院附属医院心内科, 泸州 646000)

【摘要】目的:观察一氧化氮(nitric oxide, NO)气体信号通路体系对他汀类降脂药物阿托伐他汀钙的抗动脉粥样硬化作用的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠 60 只随机分为:正常对照组(Control 组), 高脂饮食组(HF 组), 阿托伐他汀钙(atorvastatin, ATV)组(ATV 组), 阿托伐他汀钙+ N'-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐(N'-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)组(ATV+ L-NAME 组)。在给予高脂饮食后, 继续 ATV 和 ATV 联合 L-NAME 各治疗 13~15 周。观察主动脉弓的病理变化;测定各组血脂水平;测量 NO、总一氧化氮合酶(total-nitric oxide synthase, T-NOS)活力、内皮性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)以及 eNOS 的信使核糖核酸(eNOSmRNA)水平。**结果:**与 Control 组相比, HF 组及 ATV+L-NAME 组大鼠主动脉弓均出现显著的动脉粥样硬化病理损害, HF 组血脂水平变化明显($P<0.05$), 血清 NO、eNOS 水平、T-NOS 活力及降主动脉 eNOSmRNA 表达水平明显下降($P<0.05$)。与 HF 组比较, ATV 组动脉粥样硬化病变较轻, 血脂含量明显下降($P<0.05$), 血清 NO、eNOS 水平、T-NOS 活力以及降主动脉 eNOSmRNA 表达水平明显增高($P<0.05$)。与对照及 ATV 组别比较, ATV+L-NAME 组大鼠血脂均升高明显($P<0.05$), 而血清 NO、eNOS 含量及 T-NOS 活力均明显下降($P<0.05$)。**结论:**ATV 提高了大鼠血清 NO 体系的含量和活性, 阻断大鼠 NO 通路后使 ATV 的抗动脉粥样硬化作用明显减弱。

【关键词】一氧化氮;阿托伐他汀钙;动脉粥样硬化**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-04-29

Effect of nitric oxide on the antiatherogenic course of atorvastatin

Liu Xing, Ma Dongming, Zhu Bo, Zha Kelan, Chen Yujin, Zheng Shuzhan, Cai Yihua, Yang You, Fan Zhongcai

(Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate antiatherosclerosis effect of atorvastatin in atherosclerosis model of SD rats, and to explore effect of nitric oxide in this course. **Methods:** Totally 60 male SD rats were divided into 4 groups randomly: control group, high-fat(HF) group, atorvastatin(ATV) group, and ATV+ N'-nitro-L-arginine-methyl ester hydrochloride(L-NAME) group. After being fed a high-fat diet, the rats were treated with ATV and ATV combined with L-NAME from 13 to 15 weeks, respectively. Pathologic changes of aortic arch were observed. Serum lipid level was determined. Furthermore, nitric oxide(NO), total nitric oxide synthase(T-NOS), endothelial nitric oxide synthase(eNOS) and eNOSmRNA were also determined. **Results:** The classical atherosclerotic lesions were found in HF group and ATV+ L-NAME group, not in control group; serum lipid in the HF group was significantly altered($P<0.05$). Levels of serum NO, eNOS, vitality of serum T-NOS and mRNA levels of eNOS in the HF group were decreased($P<0.05$). Compared with those of HF group, atherosclerotic lesions were ameliorated in the ATV group. Serum lipid in the ATV group were significantly decreased($P<0.05$). Serum NO, eNOS, vitality of serum T-NOS and mRNA levels of eNOS in the ATV group were elevated($P<0.05$). Compared with those in ATV group, serum lipid levels in the ATV+ L-NAME group were significantly elevated($P<0.05$); serum NO, eNOS, and vitality of serum T-NOS in the ATV+L-NAME group were decreased($P<0.05$). **Conclusion:** Atorvastatin significantly enhances the activity of serum nitric oxide system. The blockage of nitric oxide pathway significantly bates antiatherosclerosis of atorvastatin.

【Key words】nitric oxide; atorvastatin; atherosclerosis

目前,以动脉粥样硬化为主要病理基础的心脑血管病是一类严重威胁人类健康的疾病。炎症、免疫

应答的异常、脂质代谢紊乱、脂质沉积和血管内膜异常增生等都参与了动脉粥样硬化斑块的形成^[1-2]。

大量多中心研究显示,他汀类药物能有效降低冠心病患者死亡率、提高生存率,且安全性高。深入的机制研究提示,这除与他汀类药物显著降低血脂有关外,也与其具有重要的降脂外作用密切相关^[3-4]。然而,目前他汀类药物对心血管作用的多重机制仍

作者介绍:刘 星, Email:hsxd_1@163.com,

研究方向:心血管疾病的基础与临床研究。

通信作者:范忠才, Email:zhongcai9665@126.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150910.1512.002.html>

(2015-09-10)

不完全清楚。

有研究发现:他汀类药物的作用与内皮性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)关系密切^[5-7];他汀类药物可通过脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 Akt 活化 eNOS^[8]。但是,作为人体重要的气体信号通路,一氧化氮(nitric oxide, NO)在他汀类药物抗动脉粥样硬化的机制中的作用尚未完全明确。本实验通过建立大鼠动脉粥样硬化模型,以阿托伐他汀钙(atorvastatin, ATV)和 eNOS 抑制剂 N'-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐(N'-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)进行干预,进而观察和评价 NO 体系在阿托伐他汀钙抗动脉粥样硬化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 180~220 g,由四川医科大学实验动物中心提供,实验动物均为清洁级。饲养室温度维持在(22±2)℃,相对湿度为 30%~60%。阿托伐他汀钙片(北京嘉林药业股份有限公司,10 mg,批号 110618),L-NAME(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,1 g,批号 1418459V),NO 和总一氧化氮合酶(total-nitric oxide synthase, T-NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),大鼠 eNOS ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠动脉粥样硬化模型的建立和处理 60 只大鼠被分为 4 组,包括正常对照组(Control 组),高脂饮食组(HF 组),阿托伐他汀钙组(ATV 组),阿托伐他汀钙+ N'-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐组(ATV+ L-NAME 组),每组 15 只大鼠。总饲养周期为 15 周,正常对照组大鼠始终以普通大鼠饲料喂养。其他实验组大鼠均始终给予高脂饲料(配方:2%胆固醇,10%蛋黄粉,5%猪油,10%蔗糖,72.3%普通大鼠饲料等)喂养;ATV 组在第 11 周初开始至第 15 周末给予阿托伐他汀钙 5 mg/(kg·d)灌胃。ATV+ L-NAME 组在第 11 周初开始至第 15 周末除给予阿托伐他汀钙 5 mg/(kg·d)外,另被加用 L-NAME 15 mg/(kg·d)腹腔注射。同时正常对照组被给予灌胃和腹腔注射等量的 0.9%生理盐水。

在实验结束时,各组大鼠被给予腹腔注射 10%氯胺酮(0.1 ml/100 g)麻醉并处死。通过颈动脉穿刺采集 1 ml 血液标本。仔细分离主动脉弓,标本储存于-80℃以备用。

1.2.2 大鼠血脂水平的测定 饲养至第 10 周末、15 周末时分别测定各组大鼠血脂。血样凝固后在 4℃下离心 10 min (3 000 r/min),然后收集上清液。用全自动生化分析仪 Hitach-7060 测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平。TC 和 TG 采用常规酶法,LDL-C 和 HDL-C 采用直接法。

1.2.3 大鼠主动脉弓病理观察 采集的部分主动脉被连续

切成 4 μm 厚切片,然后用 H&E 染色,显微镜下观察并拍照记录。主动脉弓的病理改变由 2 个病理学专业人员独立观察和评估。任何分歧都通过再测试解决而达成协议。

1.2.4 血清 NO、T-NOS 和 eNOS 的测定 (1)血清 NO 用 550 nm 光谱仪测定,取数据平均值计算 NO 含量。NO 含量(μmol/L)=(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×标准品浓度(100 μmol/L)×样品测试前稀释倍数(参照说明书所列公式)。(2)血清 T-NOS 用紫外分光光度计在 530 nm 处测定。T-NOS 活力(U/ml)=(T-NOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)×反应液总体积/(呈色物纳摩尔消光系数×取样量×比色光径×反应时间×1 000)=(T-NOS 测定管 OD 值-空白管 OD 值)×2.44/(38.3×10⁻⁶×0.03×1×15×1 000)(参照说明书所列公式)。(3)血清 eNOS 通过 ELISA 试剂盒在 450 nm 处以酶标仪 SPECTRUM 全谱微孔板分光光度计测定。

1.2.5 Real-time PCR 测定 eNOS mRNA 约 50 mg 的主动脉组织由 TRIzol 试剂与 DNaseI 处理后提取 RNA,并以提取的 RNA(2 μg)作为模板利用禽流成髓细胞瘤病毒逆转录酶进行逆转录。合成的 cDNA(2 μl)与实时 PCR SYBR Green I 预混液(25 μl),前向和反向引物(10 μmol/L,共 2 μl)和双蒸水(21 μl)混合后进行扩增。引物列举在表 1 中。在 95℃变性,持续 4.5 min,分别在 55℃(eNOS)或 55℃(β-肌动蛋白)退火,持续 1 min,进行 40 个循环。所得数据由 bio-rad i Q5 optical system software 及 7500 system SDS software 分析。

表 1 研究中使用的引物
Tab.1 Primers used in the study

靶基因	引物	5' 到 3' 序列
eNOS	前向	CAAGACCGATTACACGACA
	反向	ATCACCCGACACAAACA
β-肌动蛋白	前向	GAGGGAAATCGTGCGTGAC
	反向	CTGGAAGGTGGACACTGAC

1.3 统计分析

使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-t 法及 Tamhane T2 test 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对大鼠血脂的影响

各实验组大鼠第 10 周末基线血脂水平一致($P>0.05$),与 Control 组比较均有统计学意义($P<0.05$)。第 15 周末,HF 组大鼠的 TC、TG 和 LDL-C 的水平明显高于 Control 组($P<0.05$),HDL-C 水平比 Control 组明显降低($P<0.05$);与 HF 组对比,ATV 明显下调了模型大鼠 TC 和 LDL-C 水平(两者均 $P<0.05$),但是它对 TG 和 HDL-C 水平无影响($P>0.05$);L-NAME 明显减弱了 ATV 降低 TC 和 LDL-C 水平的作用(两者均 $P<0.05$),与 ATV 比较,L-NAME 对高脂饮食大鼠的 TG 和 HDL-C 水平无明显作用($P>0.05$)(表 2)。

表 2 第 15 周末各组血清 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 含量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Levels of serum TC, TG, LDL-C and HDL-C in each groups at the end of 15th week ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
Control组	15	1.62 ± 0.44	0.60 ± 0.13	0.30 ± 0.15	1.38 ± 0.12
HF组	15	5.11 ± 0.35 ^a	0.97 ± 0.18 ^a	2.80 ± 0.27 ^a	0.88 ± 0.21 ^a
ATV组	15	2.33 ± 0.28 ^{ab}	0.87 ± 0.20 ^a	1.26 ± 0.19 ^{ab}	0.96 ± 0.14 ^a
ATV+L-NAME组	15	4.48 ± 0.50 ^{abc}	0.91 ± 0.16 ^a	2.21 ± 0.21 ^{abc}	0.86 ± 0.19 ^a
F 值		261.190	14.540	412.070	30.320
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 Control 组比较,a, $P < 0.05$;与 HF 组比较,b, $P < 0.05$;与 ATV 组比较,c, $P < 0.05$

2.2 主动脉弓病理切片观察

对照组内皮细胞层完整,中膜层以平滑肌细胞和弹力纤维为主。在 HF 组发现血管壁变硬,内膜表面粗糙,伴部分组织崩解坏死、大量胶原纤维增生和少量胆固醇和钙盐沉积(如箭头所示),中层萎缩及弹力板断裂、塌陷等。ATV 组显示主动脉弓粥样损害显著减轻,仅遗留轻微粗糙的内膜,其余改变均较 HF 组有明显改善。ATV+L-NAME 组显示与 HF 组类似的病理损伤:内皮层破坏,有较多泡沫细胞聚集,中膜变薄、弹力纤维受压断裂(如箭头所示),所有改变均较 ATV 组严重(图 1)。

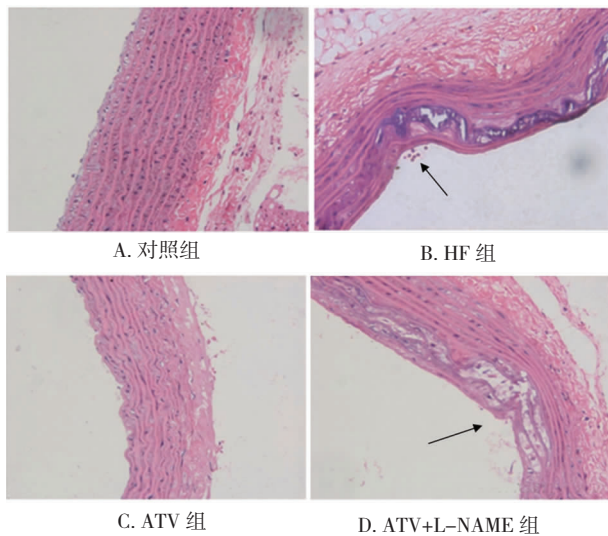


图 1 各组主动脉弓病理改变 (200 ×)

Fig.1 Pathological changes of the aorta arch in each group (200 ×)

2.3 各组 NO/NOS 体系结果的比较

与 Control 组比较, HF 组中血清 NO、eNOS 水平及 T-NOS 活力明显下降($P < 0.05$);与 HF 组比较, ATV 明显提高了血清 NO、eNOS 水平和 T-NOS 活力($P < 0.05$);与单独使用 ATV 治疗相比,加用 L-NAME 明显下调了血清 NO、eNOS 水平及 T-NOS 活力($P < 0.05$)(表 3,图 2)。与 Control 组比较, HF 组的降主动脉 eNOS mRNA 的表达下调($P < 0.05$);与 HF 组比较, ATV 组的降主动脉 eNOS mRNA 表达上调($P < 0.05$);加用 L-NAME 后其 eNOS mRNA 的表达与 ATV 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 4)。

表 3 各组血清 NO、eNOS 含量和 T-NOS 活性变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Levels of serum NO, eNOS and the activities of serum T-NOS in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
Control组	15	22.85 ± 1.64	85.48 ± 5.51	19.22 ± 1.92
HF组	15	17.10 ± 1.22 ^a	61.57 ± 5.72 ^a	13.26 ± 2.78 ^a
ATV组	15	20.15 ± 1.57 ^{ab}	96.60 ± 5.85 ^{ab}	17.58 ± 1.76 ^{ab}
ATV+L-NAME组	15	12.75 ± 1.08 ^{abc}	52.76 ± 4.27 ^{abc}	10.82 ± 1.21 ^{abc}
F 值		144.400	216.120	56.120
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与 Control 组比较,a, $P < 0.05$;与 HF 组比较,b, $P < 0.05$;与 ATV 组比较,c, $P < 0.05$

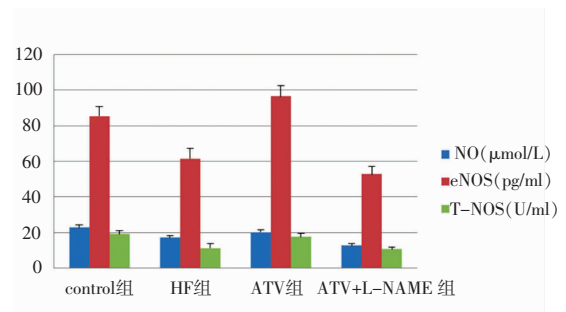


图 2 各组血清 NO、eNOS 含量和 T-NOS 活性变化

Fig.2 Levels of serum NO, eNOS and the activities of serum T-NOS in each group

表 4 各组大鼠 eNOS 与 β -actin 的灰度比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of the gray scale ratio of eNOS to β -actin in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	eNOS mRNA
Control组	15	0.26 ± 0.02
HF组	15	0.20 ± 0.01 ^a
ATV组	15	0.33 ± 0.02 ^{ab}
ATV+L-NAME组	15	0.34 ± 0.01 ^{abc}
F 值		265.580
P 值		0.000

注:与 Control 组比较,a, $P < 0.05$;与 HF 组比较,b, $P < 0.05$;与 ATV 组比较,c, $P > 0.05$

3 讨论

动脉粥样硬化可累及多个器官和系统,是导致心、脑急性事件的主要原因。阿托伐他汀钙是目前临床应用最为广泛的他汀类降脂药物之一,其抗动脉粥样斑块的效应除与其降脂作用有关外,还可能通过许多重要的信号通路发挥作用。

NO 是重要的气体信号分子和调节血管内稳态的因子,它可以通过抑制炎症细胞和血小板的聚集、黏附等活性,以及抑制平滑肌细胞的增殖而起到防止动脉粥样硬化的作用^[9]。有研究显示当患者体内的 NO 水平下降时可引起冠心病的发作^[10],而当冠状动脉内皮的 NO 生物利用度下降时也会导致糖尿病患者并发冠心病^[11],进而增加患者死亡风险。在本研究也发现:当 HF 组动脉粥样硬化斑块形成时血中 NO 明显下降;使用 ATV 后 NO 的表达显著回升,动脉粥样损害也随之明显改善;而当加用 L-NAME 使动脉 NO 的表达抑制时,动脉粥样硬化的损害程度也较单纯使用 ATV 时明显加重,这提示血清中 NO 水平与动脉粥样硬化的形成密切相关,并且 ATV 可以通过 NO 对动脉粥样斑块的形成和严重程度产生显著影响。

另一方面,NO 主要由一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)的作用由 L-精氨酸产生。eNOS 主要表达于血管内皮,同时在血小板及心肌细胞上均有表达,其为钙及钙调蛋白复合物依赖性激活。eNOS 对心血管的影响尤为重要,其与冠心病的发生发展,甚至与冠心病血管移植术的成败等密切相关^[12],已有研究证实 eNOS 能显著抑制 apoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化的形成。还有研究发现 eNOS 的基因多态性也与冠心病的发生发展及胰岛素依赖性糖尿病患者并发冠心病的关系密切^[13-14]。在本研究中, HF 组大鼠血清 eNOS 含量明显降低,而 ATV 组使用 ATV 后可使 eNOS 含量明显升高且伴随动脉粥样硬化损害的改善,这提示 eNOS 水平变化与 NO 一致,亦与动脉粥样硬化形成密切相关。此外,本研究中还发现, ATV 组与 ATV+L-NAME 组均存在 eNOS mRNA 表达的上调,提示 ATV 可以在 NO 表达的上游干预 NO 的生成,进而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

总之,在 ATV 处理模型大鼠后,血液中的 TC 和 LDL-C 的水平降低, NO 体系显著增强,并伴随动脉粥样硬化斑块的抑制;当 NO 通路受阻时, ATV 的保

护作用亦明显降低。这些结果表明 NO 体系在 ATV 的抗动脉粥样硬化中发挥了重要作用, ATV 极有可能通过 NO 体系增强其抗动脉粥样硬化作用。

参考文献

- [1] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Dousti M, et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes[J]. Int J Prev Med, 2014, 5(8): 927-946.
- [2] Salisbury D, Bronas U. Inflammation and immune system contribution to the etiology of atherosclerosis: mechanisms and methods of assessment[J]. Nurs Res, 2014, 63(5): 375-385.
- [3] Sorrentino S, Landmesser U. Nonlipid-lowering effects of statins[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2005, 7(6): 459-466.
- [4] Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, et al. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(11): 1519-1530.
- [5] Li H, Horke S, F rstermann U. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention[J]. Trends Pharmacol Sci, 2013, 34(6): 313-319.
- [6] Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(5): C803-C816.
- [7] Balakumar P, Kathuria S, Taneja G, et al. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(1): 83-92.
- [8] Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by upregulating a pro-survival pathway[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(3): 508-515.
- [9] Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, et al. The role of nitric oxide on endothelial function[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(1): 4-18.
- [10] Pinto VL, Brunini TM, Ferraz MR, et al. Depression and cardiovascular disease: Role of nitric oxide[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008, 6(2): 142-149.
- [11] Bagi Z, Feher A, Dou H, et al. Selective up-regulation of arginase-1 in coronary arteries of diabetic patients[J]. Front Immunol, 2013, 26(4): 1-6.
- [12] Sugimoto M, Yamanouchi D, Komori K. Therapeutic approach against intimal hyperplasia of vein grafts through endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide (eNOS/NO) and the Rho/Rho-kinase pathway[J]. Surg Today, 2009, 39(6): 459-465.
- [13] Bhandary UV, Tse W, Yang B, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with hypertension and cardiovascular disease in renal transplantation[J]. Nephrology, 2008, 13(4): 348-355.
- [14] Mollsten A, Lajer M, Jorsal A, et al. The endothelial nitric oxide synthase gene and risk of diabetic nephropathy and development of cardiovascular disease in type 1 diabetes[J]. Mol Gen Metab, 2009, 97(1): 80-84.

(责任编辑:冉明会)