文章编号:1000-5404(2012)07-0643-04

论著

兔动脉粥样硬化组织 COX-2、mPGES-1 表达及阿伐他汀的影响

王 彦[1],施雪青[2],曲振运[3],王冬梅[4],赵赫男[3] (116023 辽宁 大连,大连医科大学附属第二临床医院实验中心[1];116011 辽宁 大连,大连市第二人民医院科研部[2];116044 辽宁 大连,大连医科大学:病理生理学教研室[3],机能学教研室[4])

[摘要] **目的** 通过观察环氧化酶Ⅱ(cyclooxygenase-2, COX-2)、诱导型前列腺素合成酶Ⅰ(membrane associated prostaglandin E-1, mPGES-1)在兔动脉粥样硬化(AS)斑块中的表达水平及阿伐他汀对其的干预作用。**方法** 取 40 只体质量为 2.0~2.2 kg 的 3 月龄健康雄性新西兰兔,随机分为正常对照组 8 只(普通饲料);高脂模型组 32 只(高胆固醇饲料)。8 周后将高脂模型组再分为模型组、阿伐他汀治疗Ⅰ组、Ⅱ组及Ⅲ组[剂量分别为 2.5、5 及 10 mg/(kg·d),$n=8$]。6 周后取各组兔冠状动脉,检测其 COX-2 及 mPGES-1 的表达;同时,采血检测各组血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)浓度。**结果** 模型组血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 及 VLDL-C 水平与正常对照组比较差异显著($P<0.05$);而阿伐他汀治疗Ⅱ组及Ⅲ组上述各项指标与模型组比较差异显著($P<0.05$);阿伐他汀治疗Ⅰ组各项血脂水平较之模型组无显著差异($P>0.05$)。与正常对照组比较,模型组动脉粥样硬化组织的 COX-2 及 mPGES-1 表达显著增高($P<0.05$);与模型组比较,治疗Ⅱ组、Ⅲ组动脉粥样硬化组织的 COX-2 及 mPGES-1 表达明显下调($P<0.05$)。**结论** 阿伐他汀可能通过降低 COX-2/mPGES-1 表达、降低血脂,进而发挥其对 AS 的治疗作用。

[关键词] 动脉粥样硬化;环氧化酶-2;诱导型前列腺素合酶-1;阿伐他汀
[中图法分类号] R543.5; R363; R972.6 [文献标志码] A

Expression of COX-2 and mPGES-1 in rabbit coronary atherosclerotic tissues and effects of atorvastatin

Wang Yan[1], Shi Xueqing[2], Qu Zhenyun[3], Wang Dongmei[4], Zhao Henan[3] ([1]Laboratory Center, Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province, 116023; [2]Department of Scientific Research Affairs, Second People's Hospital of Dalian, Dalian, Liaoning Province, 116011; [3]Department of Pathophysiology, [4]Department of Functional Sciences, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province, 116044, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and membrane associated prostaglandin E-1 (mPGES-1) in a rabbit model of atherosclerosis and determine the effects of atorvastatin on the expression. **Methods** Forty male New Zealand rabbits (3 months old) were fed with normal diet (blank-control group, $n=8$) and high-cholesterol diet ($n=32$) respectively for 8 weeks. Then, the high-cholesterol diet rabbits were subsequently assigned to receive non-treatment (simple atherosclerotic model group), and treatment groups with atorvastatin at 2.5, 5 and 10 mg/(kg·d) respectively ($n=8$ for each group). Six weeks later, all rabbits were sacrificed and their coronaries were removed. The expression of COX-2 and mPGES-1, and serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) were evaluated respectively. **Results** Compared with the blank-control group, the expression levels of COX-2 and mPGES-1, and the serum levels of total TC, TG, LDL-C and VLDL-C were all significantly increased, and HDL-C was significantly reduced in model group($P<0.05$). After being treated by atorvastatin with 5 mg/(kg·d) and 10 mg/(kg·d), the levels of COX-2 and mPGES-1, and TC, TG, LDL and VLDL were significantly decreased, but HDL was increased compared with the corresponding values of the model rabbits ($P<0.05$). **Conclusion** Atorvastatin may play anti-atherosclerotic inflammation role through down-regulating COX-2/mPGES-1 and reducing blood lipid.

[**Key words**] atherosclerosis; cyclooxygenase type 2; membrane associated prostaglandin E-1; atorvastatin

Corresponding author: Zhao Henan, E-mail: johnala_cn@sina.com

[通信作者] 赵赫男,E-mail:johnala_cn@sina.com

关于动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的发病机制存在多种学说。近年来,多种因素引起的慢性炎症反应因素及脂代谢紊乱在AS中的作用受到越来越多的重视,已被认为是AS发生、发展的中介和中心环节[1-4]。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)及诱导型前列腺素合酶-1(membrane associated prostaglandin E-1,mPGES-1)与AS相关疾病的发生、发展关系密切[5]。研究[5-7]报道二者可以通过影响血管舒缩功能、参与调节炎症反应及脂类代谢、促进前列环素及前列腺素E_2(PGE_2)合成,再通过其下游受体EPs进一步引起金属基质蛋白酶(MMP)等的表达,从而从多个角度对AS的进程产生影响。本实验通过建立兔AS模型,并给予阿伐他汀药物干预,以探讨阿伐他汀对兔动脉粥样硬化COX-2、mPGES-1表达的影响,从而进一步明确他汀类药物的抗动脉粥样硬化作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40只3月龄的健康雄性新西兰兔,体质量2.0~2.2 kg,由大连医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(辽)2008-0002]。

1.2 主要试剂和仪器

阿伐他汀购于大连辉瑞制药公司;RT-PCR试剂盒(TaKaRa One Step RNA PCR Kit AMV)购于大连宝生物公司;PCR引物由大连宝生物公司合成;Trizol购于美国Invitrogen公司。高速台式离心机(德国Thermo公司HERAEVS Pico17 Centrifuge);低温高速离心机(德国Eppendorf公司centrifuge5804 R);梯度PCR仪(德国Eppendorf公司2231 Hamburg);Laberwork4.6凝集成像系统(美国基因公司);一抗COX-2及mPGES-1分别购于Cayman Chemical及SANTA CRUZ公司。

1.3 模型制备及分组

将兔称质量、采血后,适应性喂养1周,随机分为对照组、模型组、阿伐他汀治疗Ⅰ组、Ⅱ组及Ⅲ组[剂量分别为2.5、5及10 mg/(kg·d),$n=8$]。对照组给予普通颗粒饲料;模型组和药物干预组给予高脂饲料(1%胆固醇、8%猪油、7.5%蛋黄粉的颗粒饲料)8周[8],后采血。之后药物干预组(即阿伐他汀治疗Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组)分别给予2.5、5、10 mg/(kg·d)阿伐他汀盐水灌胃6周,而对照组和模型组给予同体积的生理盐水灌胃,再次采血。

1.4 组织取材

给药6周末处死动物,取出冠状动脉左主干,左前降支,左旋支及右冠状动脉,剥净动脉外膜的周围脂肪,置于液氮中备用。

1.5 血脂检测

采用酶法测定血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)浓度,化学遮蔽法测定血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)浓度。

1.6 组织总RNA的提取及RT-PCR检测

将冠状动脉在液氮中碾磨呈粉状,加入1 ml Trizol中,处理成组织匀浆,按照试剂盒说明书要求提取总RNA。按照RT-PCR试剂盒,采用一步反应法完成mRNA检测;Cyclophin、GAPDH作为内参照。COX-2、Cyclophin、mPGES-1及GAPDH的上、下游引物序列及产物大小见表1。COX-2及Cyclophin的RT-PCR反应条件为:42 ℃ 1 h,94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,32个循环,72 ℃ 7 min;mPGES-1及GAPDH的RT-PCR反应条件为:42 ℃ 1 h,94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35个循环,72 ℃ 7min,反应体系均为25 μl。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色(终浓度为:0.5 μg/ml),应用美国基因公司Labwork 4.6凝胶成像分析软件系统进行半定量分析[9]。

表1 兔冠状动脉COX-2及mPGES-1mRNA表达的RT-PCR实验相关引物序列

基因	引物序列(5′—3′)	片段长度(bp)
COX-2	正义:GGTGGAGATGATCTACCCGC	151
	反义:GGTTGAAAAGCAGCTCTGGG	
Cyclophin	正义:ATGGTCAACCCCACCGTGTTCTTCG	206
	反义:CGTGTGAAGTCAACCACCCTGACACA	
mPGES-1	正义:GCAGCGCACTGCTGGTTCTGAAGA	210
	反义:AGACCAGGCCCAGGAAGAGGAAA	
GAPDH	正义:AGGGTAATCATCTCAGCCCC	445
	反义:ATGCCTGCTTCACCACCTTC	

1.7 各组COX-2及mPGES-1的蛋白检测

冠状动脉组织0.1 g加入蛋白裂解液(1 ml RIPA和10 ml PMSF),冰浴中匀浆至组织完全裂解。于4 ℃11 000 r/min离心30 min,取上清液,BCA法进行蛋白定量,取40 mg蛋白加入2×SDS凝胶加样缓冲液中,100 ℃ 10 min使蛋白质变性。用8%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白(总蛋白上样量为40 μg),电转膜法将蛋白转移至NC膜上,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白分子量标准位置。5%脱脂奶粉封阻37 ℃ 1 h,按1∶200加入一抗(兔抗兔多克隆抗体),4 ℃过夜,TBST洗涤3次,1∶3 000加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,37 ℃ 1 h,TBST洗涤3次,X光显影。结果用Labwork 4.6凝胶成像分析软件系统对其灰度值进行比较和半定量分析(内参为GAPDH)。

1.8 治疗组,阿伐他汀不良反应的评估

根据阿伐他汀引发的胃肠道功能紊乱程度(主要为食欲减退)将不良反应分为轻或无、中等及严重。评估标准为,最终进食减少量占治疗开始时的进食量1/4之内为轻度或无不良反应;1/4~1/2为中等度不良反应;1/2以上为严重不良反应。

1.9 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 15.0软件进行统计学处理,采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用q检验。

2 结果

2.1 各组血脂水平的比较

各组干预6周后,模型组TC、TG、LDL-C、VLDL-C、HDL-C水平与正常对照组比较差异均有统计学意义(P均<0.05);而阿伐他汀治疗Ⅱ组及Ⅲ组上述各项指标与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$);阿伐他汀治疗Ⅰ组各项血脂水平与模型组比较差异则无统计学意义($P>0.05$),见表2。

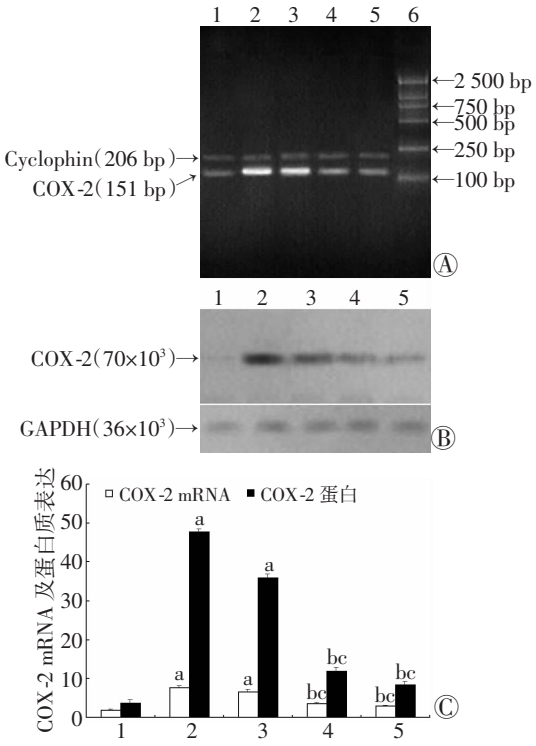
表 2　不同剂量阿托伐他汀干预 6 周后,各组家兔血清 TC、TG、LDL-C、VLDL-C、HDL-C 水平的表达变化及分析($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	TC(mmol/L)			TG(mmol/L)			LDL(mmol/L)			VLDL(mmol/L)			HDL(mmol/L)		
	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周
对照组	1.73±0.26	1.75±0.73	1.73±0.79	1.07±0.56	1.11±0.38	1.09±0.47	0.60±0.17	0.64±0.12	0.62±0.16	0.54±0.21	0.52±0.24	0.56±0.18	1.05±0.12	1.07±0.09	1.04±0.14
模型组	1.86±0.25	26.46±0.87^{a}	26.46±0.87^{a}	1.08±0.52	2.03±0.21^{a}	1.99±0.22^{a}	0.69±0.15	15.32±2.79^{a}	15.97±2.10^{a}	0.52±0.23	1.28±0.09^{a}	1.27±0.10^{a}	1.03±0.14	0.58±0.05^{a}	0.59±0.06^{a}
治疗Ⅰ组	1.84±0.27	27.08±0.23^{a}	25.26±1.98	1.05±0.66	2.02±0.23^{a}	1.97±0.20	0.70±0.13	14.98±3.01^{a}	14.79±3.23	0.56±0.19	1.26±0.10^{a}	1.25±0.11	1.06±0.11	0.59±0.03^{a}	0.56±0.07
治疗Ⅱ组	1.82±0.28	26.32±0.71^{a}	21.32±0.13^{b}	1.10±0.32	2.04±0.18^{a}	1.86±0.19^{b}	0.65±0.20	14.67±2.99^{a}	12.01±2.13^{b}	0.51±0.20	1.27±0.08^{a}	1.04±0.12^{b}	1.02±0.15	0.56±0.09^{a}	0.62±0.15^{b}
治疗Ⅲ组	1.85±0.25	27.11±0.19^{a}	20.08±0.09^{b}	1.06±0.63	2.02±0.20^{a}	1.79±0.12^{b}	0.72±0.09	14.98±3.11^{a}	10.87±1.99^{b}	0.55±0.17	1.26±0.11^{a}	0.77±0.14^{b}	1.03±0.11	0.60±0.03^{a}	0.69±0.09^{b}

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

2.2　各组冠状动脉 COX-2 mRNA 及蛋白表达情况

与正常对照组比较,模型组 COX-2 mRNA 及蛋白质的表达均显著增加($P<0.05$)。与模型组比较,阿伐他汀治疗Ⅱ、Ⅲ组上述指标明显降低($P<0.01$);阿伐他汀治疗Ⅰ组的上述指标虽下降,但无显著性差异。与治疗Ⅰ组比较,治疗Ⅱ及Ⅲ组上述指标亦显著降低($P<0.01$)。治疗Ⅱ、Ⅲ组之间差异不显著($P>0.05$),见图 1。

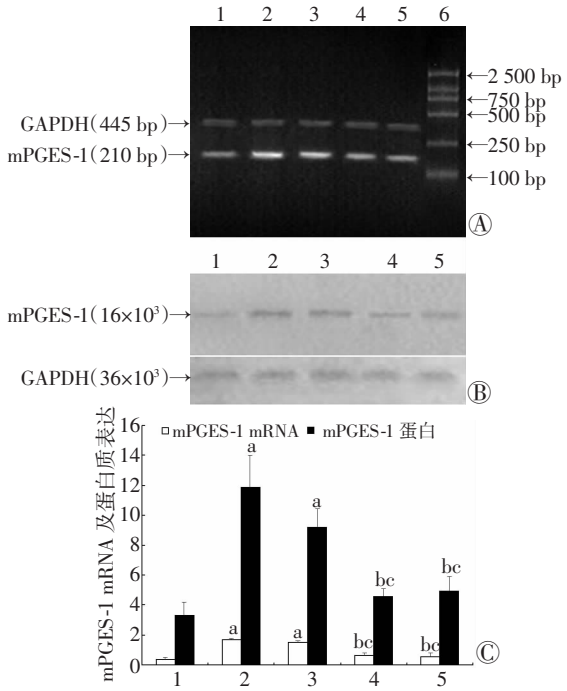


A:RT-PCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:COX-2 mRNA 及蛋白表达定量分析　1:正常对照组;2:模型组;3:治疗Ⅰ组;4:治疗Ⅱ组;5:治疗Ⅲ组;6:标准;a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与模型组比较;c:$P<0.01$,与治疗Ⅰ组比较

图 1　阿伐他汀干预后兔冠状动脉 COX-2 mRNA 及蛋白表达情况

2.3　各组冠状动脉 mPGES-1 mRNA 及蛋白表达情况

与正常对照组比较,模型组及阿伐他汀治疗Ⅰ组 mPGES-1 mRNA 及蛋白表达均显著增高($P<0.01$),而治疗Ⅱ及Ⅲ组虽仍高于正常对照组($P>0.05$)。与模型组比较,阿伐他汀治疗Ⅱ及Ⅲ组的 mPGES-1 mRNA 及蛋白表达均显著下降($P<0.01$)。与治疗Ⅰ组比较,治疗Ⅱ、Ⅲ组的 mPGES-1 mRNA 及蛋白表达亦显著下降($P<0.01$)。治疗Ⅱ、Ⅲ之间差异不显著($P>0.05$),见图 2。



A:RT-PCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:mPGES-1 mRNA 及蛋白表达定量分析　1:正常对照组;2:模型组;3:治疗Ⅰ组;4:治疗Ⅱ组;5:治疗Ⅲ组;6:标准;a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与模型组比较;c:$P<0.01$,与治疗Ⅰ组比较

图 2　阿伐他汀干预后兔冠状动脉 mPGES-1 mRNA 及蛋白表达情况

2.4　各组不良反应的情况

3 个治疗组(每组均为 8 例)均出现不同程度的副作用,不良反应的主要表现为:胃肠功能紊乱,食欲减退等症状,但未出现死亡现象。2.5 mg/(kg·d)阿伐他汀组,出现轻微不良反应的例数为 8,无中等或严重的不良反应;5 mg/(kg·d)阿伐他汀组,7 例表现为轻微或无不良反应,1 例表现为中等程度的不良反应;10 mg/(kg·d)阿伐他汀组,出现严重、中等及轻微不良反应的例数分别为 1、2 和 5 例。

3　讨论

AS 是一种由多种炎性因子参与并伴有细胞增生的血管慢性炎症反应过程[10],并成为各种 AS 危险因子导致 AS 发病的共同环节。环氧化酶是炎症的重要介质前列腺素(PG)生物合成的关键酶,主要分为组成型(COX-1)和诱导型(COX-2)。后者在 AS 血管中的单核-巨噬细胞、内皮细胞广泛表达[6]。mPGES-1 是

PGE_2合成的关键限速酶,主要与 COX-2 相偶联,特别是在炎症因子引起的迟发反应中,由 mPGES-1 和 COX-2 共同介导 PGE_2合成的增加[11]。大量的研究证实 AS 病变的主要细胞成分(内皮细胞、单核-巨噬细胞等)在多种促炎介质作用下均可诱导 COX-2/mPGES-1 的表达,并与 AS 的发生,特别是炎症反应具有密切的关系[5,12-13]。此外研究还发现,AS 病变本身释放的细胞因子也可诱导 COX-2/mPGES-1 表达,进一步导致炎症反应的放大和增强[14]。本实验结果也显示 AS 模型中,COX-2/mPGES-1 表达均显著增加,这与国外研究报道的结果相一致[15]。

阿伐他汀为羟甲戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,其水解产物在体内竞争性地抑制胆固醇合成过程中的限速酶 HMG-CoA 还原酶,抑制内源性胆固醇的合成,也使低密度脂蛋白受体合成增加,因而成为目前最常用的调脂调血压的药物之一[16-17]。本研究发现,阿伐他汀明显降低主动脉 AS 中 COX-2/mPGES-1mRNA 及蛋白的表达,提示其可能是通过 COX-2/mPGES-1 这一炎症信号通路改善 AS 性炎症反应。此外,阿伐他汀干预 6 周后,5 mg/(kg·d)剂量组和 10 mg/(kg·d) 剂量组兔的血液中 TC、TG、LDL、VLDL 的浓度均出现一定程度的下降,而 HDL 的浓度均出现一定程度的上升,这与文献[18]报道类似;2.5 mg/(kg·d) 剂量组则未见明显效果。这表明阿伐他汀还具有调节胆固醇代谢[18],从而发挥其治疗 AS 的作用。但本实验同时还发现在 3 个不同剂量组中,整体治疗效果以 5 mg/(kg·d)剂量组为最佳;10 mg/(kg·d) 剂量组的各项指标虽好于其他两组,但该组发生不良反应的数量明显升高。这可能与 10 mg/(kg·d) 的阿伐他汀促进了胃肠道不适等不良反应的发生率有关。

综上所述,AS 的形成是一个多因素共同作用的结果。COX-2/mPGES-1 在 AS 发展中的起着重要的作用;阿伐他汀通过降低 COX-2/mPGES-1 表达,进而控制炎症反应,同时降低血脂,从而发挥其对 AS 的治疗作用。同时也提示,在临床实际工作中,合理选择用药剂量也是至关重要的。

参考文献:

[1] 苏敏, 钟翠平. 动脉粥样硬化病变中黏附分子 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 的表达 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1066-1068.

[2] Rizza S, Cardellini M, Martelli E, *et al*. Occult impaired glucose regulation in patients with atherosclerosis is associated to the number of affected vascular districts and inflammation [J]. Atherosclerosis, 2010, 212(1): 316-320.

[3] Guardamagna O, Abello F, Saracco P, *et al*. Endothelial activation, inflammation and premature atherosclerosis in children with familial dyslipidemia [J]. Atherosclerosis, 2009, 207(2): 471-475.

[4] Libby P, Ridker P M, Hansson G K. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(23): 2129-2138.

[5] Pistoia F, Cipollone F, Ferri C, *et al*. Cyclooxygenase and atherosclerosis: a smoking area [J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(23): 2567-2571.

[6] Nagahama Y, Obama T, Usui M, *et al*. Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with the up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 413(4): 566-571.

[7] Gomez-Hernandez A, Sanchez-Galan E, Martin-Ventura J L, *et al*. Atorvastatin reduces the expression of prostaglandin E_2 receptors in human carotid atherosclerotic plaques and monocytic cells: potential implications for plaque stabilization [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47(1): 60-69.

[8] 商蓉郁, 曾惠, 赵清, 等. 不同水质和饲料对兔动脉粥样硬化形成的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2211-2215.

[9] 王彦, 赵英男, 许莹平, 等. 谷氨酰胺对脂多糖诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 191-193.

[10] Charo I F, Taub R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(5): 365-376.

[11] Murakami M, Naraba H, Tanioka T, *et al*. Regulation of prostaglandin E_2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E_2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32783-32792.

[12] Sata M. Role of chronic inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2011, 138(5): 182-186.

[13] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1410-1422.

[14] Song YG, Kwon H M, Kim J M, *et al*. Serologic and histopathologic study of Chlamydia pneumoniae infection in atherosclerosis: a possible pathogenetic mechanism of atherosclerosis induced by Chlamydia pneumoniae [J]. Yonsei Med J, 2000, 41(3): 319-327.

[15] Koeberle A, Werz O. Inhibitors of the microsomal prostaglandin E(2) synthase-1 as alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)--a critical review [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(32): 4274-4296.

[16] Rathouska J, Vecerova L, Strasky Z, *et al*. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis [J]. Pharmacol Res, 2011, 64(1): 53-59.

[17] Raval M, Frank P G, Laury-Kleintop L, *et al*. Celecoxib combined with atorvastatin prevents progression of atherosclerosis [J]. J Surg Res, 2010, 163(2): e113-e122.

[18] Gandelman K, Glue P, Laskey R, *et al*. An eight-week trial investigating the efficacy and tolerability of atorvastatin for children and adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. Pediatr Cardiol, 2011, 32(4): 433-441.

(收稿:2011-11-10;修回:2011-12-12)

(编辑 栾 嘉)