

氯沙坦对大鼠动脉粥样硬化的影响

郭延松^{1*}, 吴宗贵², 杨军柯³, 林皓平¹

1. 福建医科大学省立临床医学院, 福建省立医院心血管内科, 福州 350001
2. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003
3. 解放军第二炮兵总医院心血管内科, 北京 100088

[摘要] **目的** 研究氯沙坦对大鼠动脉粥样硬化的影响。**方法** Wistar 雄性大鼠 30 只, 随机分为正常对照组、动脉粥样硬化模型组和氯沙坦治疗组, 正常组喂基础饲料, 模型组以高脂饲料+维生素 D3+动脉内膜球囊损伤术建立动脉粥样硬化模型, 治疗组同法造模后加氯沙坦治疗。喂养 90 d 后, 比较各组间血脂水平、血钙水平、胸主动脉形态学改变、巨噬细胞和 α -平滑肌肌动蛋白免疫组织化学结果、血浆和胸主动脉血管紧张素 II (Ang II) 水平。分析病变部位的 Ang II 水平与相应的内膜厚度的相关性。**结果** 与对照组相比, 模型组和治疗组总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、血钙水平均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 模型组与对照组相比, 内膜厚度增厚, 中层厚度变薄 ($P < 0.01$); 治疗组与模型组相比, 内膜厚度变薄, 中层厚度变厚 ($P < 0.01$)。对照组 CD68 阴性, 模型组强阳性, 治疗组为弱阳性; 模型组斑块表面只有很薄的一层 α -平滑肌肌动蛋白阳性, 中层明显萎缩; 治疗组内膜及中层均有较厚的 α -平滑肌肌动蛋白阳性。血浆 Ang II 水平在 3 组间无差别; 胸主动脉组织中的 Ang II 水平在模型组及治疗组均较对照组升高 ($P < 0.01$), 治疗组较模型组降低 ($P < 0.05$)。主动脉粥样硬化病变中 Ang II 水平与相应的内膜厚度呈正相关。**结论** 氯沙坦有抗动脉粥样硬化作用。

[关键词] 氯沙坦; 动脉粥样硬化; 血管紧张素 II

[中图分类号] R 543.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)12-1286-05

Effect of losartan on rat model of atherosclerosis

GUO Yan-song^{1*}, WU Zong-gui², YANG Jun-ke³, LIN Hao-ping¹

1. Department of Cardiovasology, Clinical Medical College of Fujian Medical University, Provincial Hospital of Fujian, Fuzhou 350001, Fujian, China
2. Department of Cardiovasology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. Department of Cardiovasology, General Hospital, Second Artillery Brigade of PLA, Beijing 100088, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of losartan on rat model of atherosclerosis. **Methods** Totally 30 male Wistar rats were randomly divided to three different groups: control group, model group (high lipid + Vitamin D overload + endothelium injury), and treatment group (high lipid + Vitamin D overload + endothelium injury + losartan). Rat model of atherosclerosis was established by high lipid plus Vitamin D overload plus balloon angioplasty-induced endothelium injury, and animals in the treatment group were models treated with losartan. After 90 days the blood samples were drawn to examine the serum lipids and calcium, H-E staining was used to observe the structure changes of thoracic aorta, and immunohistochemistry assay was used to observe CD68 and α -actin expression in the thoracic aorta. To study the relationship between Ang II and severity of AS, radio-immunity analysis was used to assay Ang II in each group, with the thickness of intima used as the index of AS severity. **Results** The serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), LDL-C and serum calcium in model and treatment groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Compared with the control group, the model group had a thicker intima and thinner media. Compared with model group, the treatment group had a significantly thinner intima and thicker media ($P < 0.01$). Immunohistochemistry showed that CD68 was negative in the control group, strongly positive in the model group and weakly positive in the treatment group. Compared with model group, α -actin positive level was higher in the treatment group. The serum Ang II levels were not significantly different between the three groups. Ang II level in the thoracic aorta tissue in the treatment group was significantly lower than that in control group and higher than that

[收稿日期] 2011-09-05 **[接受日期]** 2011-12-06

[作者简介] 郭延松, 博士, 副主任医师, 硕士生导师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0591-87557768, E-mail: ysguo1234@yahoo.com.cn

in the model group ($P < 0.05$). Ang II level in the thoracic aorta tissue was positively related with the intima thickness ($P < 0.01$). **Conclusion** Lorsartan has anti-atherosclerosis effect in rats.

[Key words] losartan; atherosclerosis; angiotensin II

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(12): 1286-1290]

肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)参与动脉粥样硬化(AS)的病理过程,特别是血管紧张素 II (Ang II)起重要作用,因而应用血管紧张素 II 受体拮抗剂作为抗 AS 药物的研究得到广泛关注。氯沙坦作为上市时间最长的血管紧张素 II 受体拮抗剂,是否具有抗动脉粥样硬化作用,具体机制如何,国内外报道各不相同^[1-5];本研究通过已成功建立的大鼠 AS 模型^[6],来研究氯沙坦是否具有抗 AS 作用。已有报道的机制探讨多从与 AS 相关的细胞因子出发,如转化生长因子 β 和肿瘤坏死因子等^[3],而这些细胞因子仅是 AS 发生过程中的一环,结果有一定的片面性;本研究从氯沙坦的主要作用机制、Ang II 受体拮抗剂的源头——Ang II 出发,观察动脉粥样硬化模型与 Ang II 的关系,来探讨氯沙坦可能的抗动脉粥样硬化机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康纯种的 Wistar 雄性大鼠 30 只,体质量 200 g 左右(3~4 月龄),由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组与模型制备 大鼠自由饮水,室温: 19~23℃,自然采光。动物饲养在带不锈钢盖底的塑料笼内,每笼 2 只,染色编号。大鼠随机分为 3 组,每组 10 只。(1)正常对照组:喂基础饲料。(2)动脉粥样硬化模型组:喂高脂饲料(2%胆固醇、0.5%胆酸钠、3%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、94.3%的基础饲料,由第二军医大学实验动物中心提供)+维生素 D3 粉剂(上海化学试剂公司) 1.25×10^6 U/kg,同时于右下肢肌内注射维生素 D3 针剂(上海第九制药厂) 30×10^4 U/kg,每隔 30 d 重复 1 次。于第 7 天行大鼠胸腹主动脉内膜球囊损伤术(参照球囊损伤的常规方法^[7]),戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉,分离暴露左颈主动脉,结扎远心端,插入 AQUAT 3 1.5F 球囊(Cordis),进入 8 cm 后,注入 0.2 ml 生理盐水充盈球囊,手感到一定阻力后回拉约 4~5 cm,放水后再进入 8 cm,注水充盈、回拉、放水,反复 3 次,拔出球囊,结扎近心端。(3)氯沙坦治疗组:饲料、口服及肌内注射维生素 D3、球囊损伤手术等处理均同模型组;饮水中加入氯沙坦(美国默克制药公司),按每只大鼠

每日饮水 20 ml,每日氯沙坦用量 20 mg/kg)。所有大鼠均饲养 90 d 后取标本检测。

1.3 血液和动脉标本的采集 90 d 后,各组大鼠在取血前均禁食过夜,大鼠戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉后,分离暴露腹主动脉,在肾动脉分叉处下方,剪开腹主动脉,插入穿刺针,以注射器采集动脉血,不抗凝,予 3 000 r/min(离心半径 16 cm) \times 15 min 离心,分离出血清,取 1 ml 用于检测血脂和血钙;剪下胸主动脉,胸主动脉下段约 1 cm 立即用 10%中性甲醛溶液固定,用于常规形态学和免疫组织化学检查。

1.4 血脂和血钙的检测 Abbott Aeroset™生化分析仪(美国雅培公司)检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和血钙水平。

1.5 病理学观察

1.5.1 形态学观察 石蜡包埋,连续切片,切片固定于载玻片上,H-E 染色,光镜观察,利用 HPLAS-1000 型图像分析系统检测内膜、中层厚度。

1.5.2 巨噬细胞和 α -平滑肌肌动蛋白免疫组织化学检测 采用微波 EnVision 法^[8],应用小鼠抗大鼠 CD68 单克隆抗体(NeoMarkers 公司)和 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(武汉博士德公司)为一抗鉴定巨噬细胞和平滑肌细胞,EnVision 复合物(Dako 公司)为二抗,常规 DAB-H₂O₂ 显色,苏木精复染。

1.6 血浆及血管组织的 Ang II 放射免疫分析 按 Ang II 放射免疫分析测定试剂盒(北京北方生物技术研究所)说明书进行。

1.7 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析,各组间两两比较用 SNK 法。血管组织的 Ang II 水平与相应的内膜厚度的相关性采用直线相关分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般状况 实验过程中共有 6 只大鼠死亡,其中对照组未死亡,模型组死亡 4 只,治疗组死亡 2 只。每组均取 6 只进行后续检测。

2.2 血脂和血钙浓度的变化 血脂和血钙变化见表 1,经方差分析,与对照组相比,模型组和治疗组

TC、TG、LDL-C 和血钙均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 各组间 HDL-C 差异无统计学意义。治

疗组与模型组相比,两组间的血脂及血钙差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血脂和血钙水平的变化

Tab 1 Changes of serum lipids in rats of different groups

$n = 6, \bar{x} \pm s, c_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$

Group	TC	TG	HDL-C	LDL-C	Calcium
Control	2.49 ± 0.20	0.84 ± 0.38	0.98 ± 0.22	1.13 ± 0.48	2.45 ± 0.51
Model	16.34 ± 4.39**	2.93 ± 0.45**	1.14 ± 0.35	13.46 ± 3.55**	3.97 ± 0.91**
Treatment	15.94 ± 4.20**	2.89 ± 0.41**	0.96 ± 0.50	13.49 ± 3.27**	3.99 ± 0.86**

TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; HDL-C: High density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol.

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 胸主动脉病理变化 由 H-E 染色图片可见, 对照组主动脉管腔呈圆形, 内膜、中层和外膜分界清楚, 管腔面由单层内皮细胞覆盖, 光镜下见内皮细胞完整, 中层主要见有梭形的平滑肌细胞; 外膜较薄, 为疏松结缔组织(图 1A)。模型组的主动脉病变部位内皮细胞脱落, 内膜增厚, 斑块表面纤维帽薄, 突出的斑块内含有坏死物质, 平滑肌细胞减少, 纤维组织增生伴片状、点状钙化, 中层明显萎缩, 呈较典型的成熟动脉粥样硬化斑块(图 1B)。治疗组主动脉病变部位内皮细胞脱落, 内膜增厚, 局部管壁向管腔内突出, 内含平滑肌细胞及少量泡沫细胞, 中层无明显萎缩(图 1C)。

2.4 胸主动脉内膜、中层厚度的变化 如图 1D 所示, 模型组与对照组相比, 内膜厚度明显增厚, 中层厚度明显变薄, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。治疗组与模型组相比, 内膜厚度明显变薄, 中层厚度明显变厚, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 胸主动脉巨噬细胞免疫组化检测 用特异性巨噬细胞抗体 CD68 抗体为一抗, 可见对照组阴性, 模型组为强阳性, 治疗组为弱阳性(图 2)。

2.6 胸主动脉 α -平滑肌肌动蛋白免疫组化检测 用特异性平滑肌抗体 α -平滑肌肌动蛋白抗体为一抗, 可见对照组基本正常(图 3A); 模型组斑块表面只有很薄的一层 α -平滑肌肌动蛋白阳性, 中层明显萎缩(图 3B); 治疗组内膜及中膜均有较厚的 α -平滑肌肌动蛋白阳性(图 3C)。

2.7 各组血浆及胸主动脉组织的 Ang II 水平 由表 2 可见, 血浆 Ang II 水平在 3 组间差异无统计学意义; 胸主动脉组织中的 Ang II 水平在模型组及治疗组均较对照组升高 ($P < 0.01$), 治疗组较模型组降低 ($P < 0.05$)。

2.8 胸主动脉组织的 Ang II 水平与相应的内膜厚度相关分析 直线相关分析结果表明, 大鼠主动脉粥样硬化病变中 Ang II 水平与相应的内膜厚度密切相关 ($r = 0.952, P < 0.01$, 图 4)。

3 讨论

给予大鼠高脂饲料 + 维生素 D 负荷 + 局部球囊损伤动脉可形成与人类 AS 相似的较成熟的 AS 斑块模型^[6]。本实验利用该方法建立了大鼠 AS 模型, 以此研究氯沙坦的抗 AS 作用。实验结果发现模型组的主动脉壁内皮细胞脱落, 内膜增厚, 斑块表面纤维帽很薄, 突出的斑块内含有大量的泡沫细胞、少量平滑肌细胞, 深部为坏死物质, 内含胞外脂质, 伴片状、点状钙化, 巨噬细胞免疫组织化学强阳性, α -平滑肌肌动蛋白免疫组织化学显示中层明显萎缩, 呈较典型的成熟动脉粥样硬化斑块。与模型组相比, 氯沙坦治疗组的主动脉病变部位内膜增厚程度明显减轻, 巨噬细胞减少, 内膜及中层均有较强的 α -平滑肌肌动蛋白阳性。这说明氯沙坦可能通过减少炎症细胞——巨噬细胞, 抑制平滑肌细胞的移行, 从而起到较好的抗 AS 作用。治疗组与模型组相比, 两组间的血脂 (TC、TG、LDL-C、HDL-C) 差异无统计学意义, 提示氯沙坦不影响血脂, 进而说明氯沙坦不是通过降低血脂而发挥抗 AS 作用的。

各种致 AS 因素使血管局部各主要炎性细胞中 RAAS 活性增加, 如氧化型 LDL-C 可攻击 ACE 基因, 在局部血管壁内产生 Ang II^[9-10], Ang II 能刺激心肌成纤维细胞增生, 诱导其 I、III 型胶原 mRNA 表达及蛋白分泌增多^[11]; Ang II 能促进心肌细胞凋亡、内皮细胞凋亡, 刺激血管平滑肌细胞增生, 并分泌多种细胞因子(血小板源性生长因子、碱性成纤维

细胞生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 和内皮素), 并使血管平滑肌细胞膜上这些生长因子受体表达增加, 进而加速 AS 的形成。氯沙坦是血

管紧张素 II 受体拮抗剂, 鲁辛等^[12]以氯沙坦预处理 Ang II 损伤的 RIN-m 细胞, 结果发现氯沙坦能够拮抗 Ang II 的作用, 对细胞起到保护作用。

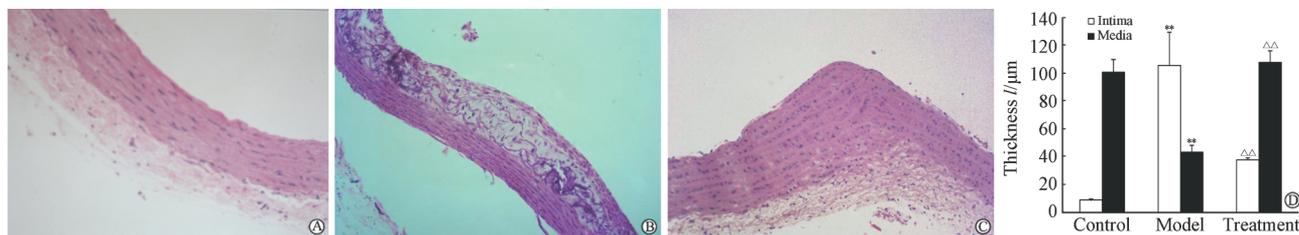


图 1 各组大鼠胸主动脉的 H-E 染色图和内膜、中层厚度

Fig 1 H-E staining results and thickness of intima and media of thoracic aorta of rats in different groups

A: Control group; B: Model group; C: Treatment group. Original magnification: $\times 100$ (A-C). D: Thickness of intima and media. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

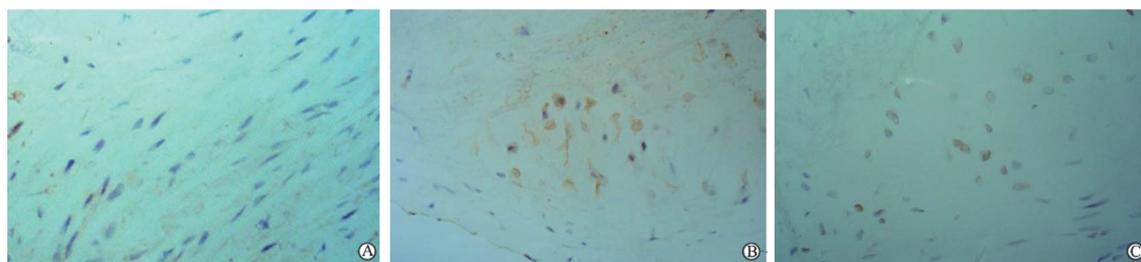


图 2 各组大鼠胸主动脉的 CD68 免疫组化染色

Fig 2 Immunohistochemical staining of CD68 in thoracic aorta of rats

A: Control group; B: Model group; C: Treatment group. Original magnification: $\times 200$

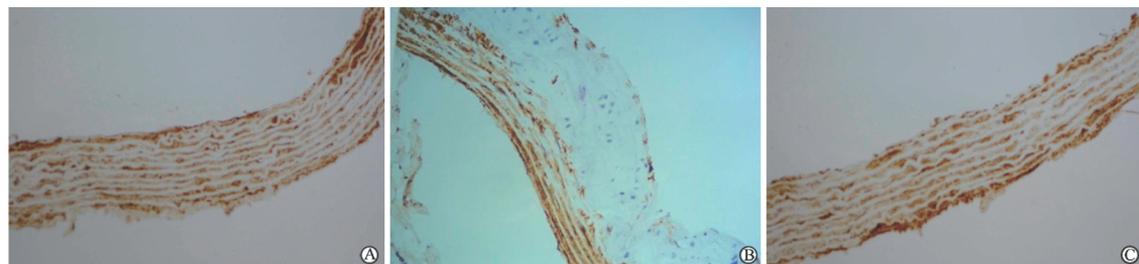


图 3 各组大鼠胸主动脉的 α -平滑肌肌动蛋白免疫组化染色

Fig 3 Immunohistochemical staining of α -smooth muscle actin in thoracic aorta of rats

A: Control group; B: Model group; C: Treatment group. Original magnification: $\times 100$

表 2 各组血浆及胸主动脉组织的 Ang II 水平

Tab 2 Ang II in thoracic aorta tissue and plasma in each group

$n = 6, \bar{x} \pm s$

Group	Plasma $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	Thoracic aorta $(\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1})$
Control	146.4 ± 25.8	454.3 ± 40.1
Model	138.4 ± 19.3	$935.8 \pm 100.7^{**}$
Treatment	143.5 ± 25.0	$707.8 \pm 31.0^{**\Delta}$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

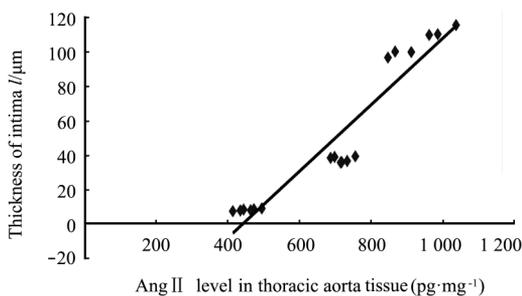


图 4 胸主动脉 Ang II 与内膜厚度相关关系散点图

Fig 4 Scatter diagram for relation between Ang II of thoracic aorta and thickness of intima

本实验为了观察氯沙坦对动脉粥样硬化大鼠的作用及机制,以放射免疫分析法测定了各组血浆和胸主动脉的 Ang II 水平,分析发现模型组及氯沙坦治疗组均较对照组明显升高,氯沙坦治疗组较模型组降低。将胸主动脉的 Ang II 水平与内膜厚度进行相关分析,证实两者具有正相关性。临床上常以内膜厚度值作为 AS 严重程度指标,因而说明 Ang II 水平与 AS 严重程度相关。氯沙坦通过拮抗血管紧张素 II 受体,减少血管组织中的 Ang II 水平起到抗动脉粥样硬化作用。

本研究发现血浆 Ang II 水平在 3 组间无差别,而胸主动脉组织中的 Ang II 水平变化明显,氯沙坦治疗组较模型组降低。胸主动脉组织中的变化与 Kobori 等^[13]和 Conte 等^[14]研究结果相似;但 Kobori 等^[13]研究发现应用奥美沙坦治疗 Ang II 诱发的高血压大鼠,12 d 后检测血浆中的 Ang II 水平明显升高,与本研究结果不同。另 Ichikawa 等^[15]研究发现长期(6~12 个月)应用奥美沙坦治疗的高血压患者,血浆 Ang II 水平降低,且随着时间延长,降低程度愈加明显。为何应用血管紧张素 II 受体拮抗剂后血浆 Ang II 水平有如此不同的变化,可能有以下原因:(1)用药时间长短的不同导致,具体机制有待于进一步研究;(2)与 RAAS 的分泌特点有关,RAAS 以自分泌或旁分泌形式发挥作用,并通过血液循环作用于其他器官,因此血循环与组织中 RAAS 的含量有明显差别。Campbell 等^[16]应用血管紧张素转换酶抑制剂对高血压大鼠进行降压时,发现循环中的 Ang II 水平治疗前后无变化,但仍能发挥降压作用,进一步研究发现高血压大鼠的心脏、肾脏等组织中的 Ang II 水平明显下降,这也从侧面证明了 RAAS 可以自分泌或旁分泌形式在局部组织中起作用。

综上所述,本研究结果显示氯沙坦具有抗 AS 的作用,这种作用可能是通过减少炎症细胞——巨噬细胞、抑制平滑肌细胞的移行、降低胸主动脉组织中的 Ang II 水平等途径来实现的。

[参考文献]

[1] An J, Nakajima T, Kuba K, Kimura A. Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling through a PPAR γ -dependent mechanism in human THP-1 macrophages[J]. *Hypertens Res*, 2010, 33:831-835.
 [2] Krämer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M, Schmidt B, et al. Angiotensin II receptor-independent antiinflammatory and

antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179[J]. *Circ Res*, 2002, 90:770-776.
 [3] Kaynar K, Ulusoy S, Ovali E, Vanizor B, Dikmen T, Gul S. TGF-beta and TNF-alpha producing effects of losartan and amlodipine on human mononuclear cell culture[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2005, 10:478-482.
 [4] Díez J. Review of the molecular pharmacology of losartan and its possible relevance to stroke prevention in patients with hypertension[J]. *Clin Ther*, 2006, 28:832-848.
 [5] Hernandez-Trujillo Y, Rodriguez-Esparragon F, Macias-Reyes A, Caballero-Hidalgo A, Rodriguez-Perez J C. Rosiglitazone but not losartan prevents Nrf-2 dependent CD36 gene expression up-regulation in an *in vivo* atherosclerosis model[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2008, 7: 3.
 [6] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 黄高忠. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11:465-469.
 [7] Fonseca F A, Paiva T B, Silva E G, Ihara S S, Kasinski N, Martinez T L, et al. Dietary mannesium improves endothelial dependent relaxation of balloon injured arteries in rats[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 139:237-242.
 [8] 马大烈, 郑青渝, 李全华, 黄玲, 魏建丽. 微波 EnVision 免疫组织化学技术及其应用[J]. *中华病理学杂志*, 1998, 27: 153-154.
 [9] Kramsch D M. Atherosclerosis progression/regression: lipoprotein and vessel wall determinants[J]. *Atherosclerosis*, 1995, 118 Suppl: S29-S36.
 [10] Potter D D, Sobey C G, Tompkins P K, Rossen J D, Heistad D D. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II[J]. *Circulation*, 1998, 98:800-807.
 [11] Bennani-Kabchi N, Kehel L, El Bouayadi F, Fdhil H, Amarti A, Saidi A, et al. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats; hypercholesterolemia combined with D2 vitamin[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 150:55-61.
 [12] 鲁辛, 吕俊, 张桦, 陈宏, 蔡德鸿. 氯沙坦对血管紧张素 II 损伤 RIN-m 细胞胰岛素分泌功能的保护及机制探讨[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30:166-169.
 [13] Kobori H, Prieto-Carrasquero M C, Ozawa Y, Navar L G. AT1 receptor mediated augmentation of intrarenal angiotensinogen in angiotensin II-dependent hypertension[J]. *Hypertension*, 2004, 43:1126-1132.
 [14] Conte D, Viscarra J, Nishiyama A, Ortiz R M. Chronic angiotensin receptor blockade suppresses intracardiac angiotensin II in angiotensin II-infused rats[J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236: 1449-1453.
 [15] Ichikawa S, Takayama Y. Long-term effects of olmesartan, an Ang II receptor antagonist, on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients[J]. *Hypertens Res*, 2001, 24:641-646.
 [16] Campbell D J. A review of perindopril in the reduction of cardiovascular events[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2006, 2: 117-124.