

阿奇沙坦酯对大鼠颈总动脉球囊损伤后内膜增生的抑制作用及机制探讨

殷佳宇 夏 勇

摘 要 **目的** 探讨新型降压药阿奇沙坦酯 (azilsartan medoxomil, TAK-491) 能否抑制球囊损伤后血管内膜增生及其可能机制。**方法** 选取清洁级雄性 200~250g SD 大鼠 48 只, 随机分为 4 组, 即假手术组、模型组、阿奇沙坦酯低剂量组、阿奇沙坦酯高剂量组, 每组 12 只。建立模型后, 阿奇沙坦酯低剂量组与高剂量组 SD 大鼠分别按 2mg/kg 和 4mg/kg 每天给予 3ml 药物灌胃, 模型组和假手术组大鼠每天用 3ml 生理盐水灌胃。于术后 14、28 天取大鼠颈总动脉行 HE 染色, 观察血管形态学变化, 同时计算内膜面积 (IA)、中膜面积 (MA) 及内膜/中膜面积比 (IA/MA)。免疫组化技术测量增殖细胞核抗原 (PCNA)、Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子- κ B (NF- κ B) p65 表达变化结果, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-6 (IL-6) 水平。**结果** 与模型组对比发现, 药物低、高剂量组术后 14、28 天 IA、IA/MA 明显减少 ($P < 0.05$), 颈总动脉的 PCNA、TLR4、NF- κ B p65 蛋白的表达明显降低 ($P < 0.05$), 血清中 TNF- α 、IL-6 表达明显降低 ($P < 0.05$)。与假手术组进行对比发现, 手术组术后 14、28 天 IA、IA/MA 明显增加 ($P < 0.05$), 颈总动脉的 PCNA、TLR4、NF- κ B p65 的表达明显增加 ($P < 0.05$), 血浆中 TNF- α 、IL-6 表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 阿奇沙坦酯可以减轻损伤后血管再狭窄发生率, 其作用机制可能是通过抑制 TLR4 介导的 NF- κ B 通路, 减少了下游炎性相关因子 TNF- α 、IL-6 等的表达, 继而减少内膜增生而实现的。

关键词 阿奇沙坦酯 球囊损伤 内膜增生

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.027

Inhibitory Effect and Mechanism of Azilsartan Medoxomil on Carotid Artery Intimal Hyperplasia in Balloon-Injured Rats. Yin jiayu, Xia Yong. Institute of Cardiovascular Diseases, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221006, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effect of a new antihypertensive drug on carotid artery intimal hyperplasia in balloon-injured rats and its possible mechanism. **Methods** A total of 48 SD rats were randomly divided as follows: sham operation group, model group, low-dose Azilsartan medoxomil group and high-dose Azilsartan medoxomil group ($n = 12$). The rats in sham operation group and model group were treated by gavage with 3ml normal saline every day, and rats in low-dose Azilsartan medoxomil group and high-dose Azilsartan medoxomil group were treated by gavage at a dose of 2mg/kg and 4mg/kg Azilsartan medoxomil (3ml) every day. 14 and 28 days after operation, we can observe the morphological changes of the injured arteries by HE staining and measure intimal area (IA), medial area (MA), the intimal/medial area ratio (IA/MA). The expression of PCNA, TLR4, NF- κ B p65 in each group were detected by immunohistochemistry and the plasma level of TNF- α , IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the model group, the intimal area and the intimal/medial area ratio were significantly reduced in the low-dose group and high-dose group ($P < 0.05$). The expression of PCNA, TLR4 and NF- κ B p65 in carotid artery were significantly lower ($P < 0.05$). The plasma level of TNF- α , IL-6 were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the sham operation group, the intimal area and the intimal/medial area ratio were significantly increased in the operation group ($P < 0.05$) and the expression of PCNA, TLR4 and NF- κ B p65 in carotid artery were significantly increased ($P < 0.05$). The plasma level of TNF- α , IL-6 were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Azilsartan medoxomil can alleviate the incidence of vascular restenosis. The mechanism of action possibly was related to reducing the expression of inflammatory factors such as TNF- α , IL-6 by TLR4/NF- κ B pathway and inhibiting the carotid artery intimal hyperplasia.

Key words Azilsartan medoxomil; Balloon injury; Intimal hyperplasia

动脉粥样硬化 (AS) 以及相关并发症已成为 21

世纪困扰人类健康一个主要杀手。自 Gruentzig 教授施行经皮冠脉成形术以来, 经皮冠脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 技术得到迅速普及, 现今已演变成成为诊疗冠心病的主要方法。但支架

作者单位: 221006 徐州医科大学心血管病研究所

通讯作者: 夏勇, 电子信箱: 1561699668@qq.com

内再狭窄(in stent restenosis, ISR)一直是 PCI 待解决的难题,目前关于 ISR 的发生机制和处理方法意见仍未统一^[1]。阿齐沙坦酯是一种新型血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin receptor blocker, ARB)^[2],可以阻断血管紧张素 II (Ang II)与相应受体发生特异性结合,从而降低动脉血压、扩张外周血管、减少醛固酮分泌及交感神经兴奋等作用。目前最新的研究证明,ARB 类药物可以通过相应机制抑制体内炎症反应,减少相关炎症因子的分泌^[3,4]。本实验分离各组大鼠颈总动脉后行球囊扩张,比较不同组间内膜增生情况及相关蛋白的表达变化,研究阿奇沙坦酯能否减少血管内膜的增生及其可能存在机制。

材料与方法

1. 实验动物:于徐州医科大学动物实验中心购得清洁级 200~250g 的雄性 SD 大鼠 48 只。

2. 主要仪器及试剂:阿奇沙坦酯(日本武田制药公司),intuition 导丝(美国美敦力公司),1.5mm × 15.0mm 球囊(业聚医疗器械深圳有限公司提供),SP 试剂盒、PCNA 抗体、TLR4、NF- κ B p65 抗体(武汉博士得生物工程有限公司)。TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

3. 实验分组:将 48 只大鼠随机配对为 4 组,每组 12 只,分别为假手术组、球囊损伤组(模型组)、球囊损伤+药物低剂量组(阿奇沙坦酯低剂量组)和球囊损伤+药物高剂量组(阿奇沙坦酯高剂量组)。每组又以 14、28 天时间点分成两组,大鼠数量均为 6 只,于球囊损伤后 14、28 天处死大鼠后取颈总动脉。对假手术组大鼠行颈总动脉分离但不行球囊损伤,对照组、阿奇沙坦酯低剂量与阿奇沙坦酯高剂量行颈总动脉分离,并对其行球囊损伤,术后模型组和假手术组每天用 3ml 生理盐水灌胃;阿奇沙坦酯低剂量组与高剂量组分别按 2mg/kg 和 4mg/kg 每天给予 3ml 药物灌胃。

4. 建立模型:称量体重腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50mg/kg 麻醉,大鼠取仰卧位固定于手术台上,去除颈部中央毛发,碘伏消毒后于大鼠颈部中间切开皮肤,止血钳分离出皮下组织及肌肉组织并分离动脉,分别用线结扎颈外动脉远心端、颈内动脉远心端,止血夹临时夹闭颈总动脉近心端。用小血管钳挑起颈外动脉,使其与颈总动脉平直,并在近分叉处切一小口,取小段美敦力导丝,穿进 1.5mm × 15.0mm 业聚球囊,通过导丝辅助送进大鼠颈总动脉后,松开颈总动脉近端止血夹,然后加压(3atm)行球囊扩张,送至

动脉分叉前约 2cm 处,并来回抽拉 3 次。撤离后结扎颈外动脉远心端,等血流正常后进行皮肤缝合,碘伏消毒切口,青霉素稀释液冲洗切口,常规饲养。

5. 标本取材:常规饲养后 14、28 天对大鼠抽血麻醉后处死取材。每只大鼠各取左颈总动脉段 2cm。常规磷酸缓冲液冲洗,10% 甲醛中浸泡,放入恒温(4℃)的冰箱中 24h,血液于离心机常温离心 15min 后取上清液。

6. 组织病理形态分析:把上述制备的标本取出,先后经梯度无水乙醇去水、二甲苯透明、浸蜡 1~2 天后对其包埋、均匀切片(厚度为 0.5 μ m)、染色。观察血管平滑肌细胞内膜变化,通过图像分析软件,以内外弹力膜为界限,得出 IA、IA/MA 以及比较 14 天与 28 天差异。

7. 免疫组化染色检测 PCNA、TLR4 和 NF- κ B p65 蛋白:按照试剂盒说明书行相关操作,采用免疫组化 SP 法进行试验。每张随机选取 4 个视野,在光学显微镜下观测细胞增殖情况,并用 Image-pro Plus 6.0 统计各组细胞阳性率。

8. 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测 TNF- α 、IL-6 蛋白:按照 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,波长 450nm 酶标仪测得各孔吸光度(A 值),绘制吸光度 A 值曲线,测得各样品实际浓度。

9. 统计学方法:运用 GraphPad Prism 5.0 对数据进行处理。所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单因素方差分析比较各组数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

通过药物组与模型组对比发现,术后 14、28 天 IA、IA/MA 显著减少($P < 0.05$)。颈总动脉的 PCNA、TLR4、NF- κ B p65 的表达明显降低($P < 0.05$),血清中 TNF- α 、IL-6 表达明显降低($P < 0.05$)。通过对手术组与假手术组比较,手术组 14、28 天 IA、IA/MA 明显增加($P < 0.05$)。颈总动脉的 PCNA、TLR4、NF- κ B p65 的表达明显增加($P < 0.05$),血清中 TNF- α 、IL-6 表达明显降低($P < 0.05$)。通过对阿奇沙坦酯低剂量组、阿奇沙坦酯高剂量组比较发现,14、28 天 IA、IA/MA 无显著变化($P > 0.05$),颈总动脉的 PCNA、TLR4、NF- κ B p65 的表达无明显变化($P > 0.05$),14 天血清中 TNF- α 表达明显降低($P < 0.05$),IL-6 表达无明显变化($P > 0.05$)。28 天 TNF- α 、IL-6 表达无明显变化($P > 0.05$)。见表 1、表 2 及图 1~图 3。

表 1 术后 14、28 天各组 IA、IA/MA 及 PCNA、TLR4、NF-κB p65 免疫组化细胞阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

天数	组别	IA (mm ²)	IA/MA (%)	PCNA (%)	TLR-4 (%)	NF-κB p65 (%)
14 天	对照组	0.015 ± 0.003	0.132 ± 0.006	1.42 ± 0.31	2.92 ± 0.53	2.91 ± 0.75
	模型组	0.126 ± 0.011 *	0.873 ± 0.094 *	18.91 ± 2.02 *	49.33 ± 6.21 *	46.21 ± 5.32 *
	低剂量组	0.099 ± 0.005 *#	0.682 ± 0.085 *#	14.73 ± 1.45 *#	36.10 ± 5.01 *#	35.82 ± 4.87 *#
	高剂量组	0.089 ± 0.007 *#	0.568 ± 0.053 *#	11.95 ± 1.02 *#	30.77 ± 6.23 *#	31.56 ± 5.25 *#
28 天	对照组	0.014 ± 0.004	0.135 ± 0.007	1.38 ± 0.25	2.87 ± 1.06	3.12 ± 0.87
	模型组	0.212 ± 0.019 *	1.553 ± 0.212 *	4.52 ± 0.99 *	40.33 ± 6.55 *	39.56 ± 6.71 *
	低剂量组	0.146 ± 0.008 *#	1.236 ± 0.109 *#	3.87 ± 1.02 *#	31.21 ± 4.32 *#	31.05 ± 3.99 *#
	高剂量组	0.129 ± 0.012 *#	1.098 ± 0.062 *#	3.92 ± 0.77 *#	32.05 ± 5.12 *#	29.07 ± 4.23 *#

与同天数对照组比较, * $P < 0.05$; 与同天数模型组比较, # $P < 0.05$

表 2 术后 14、28 天血清 TNF-α、IL-6 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

天数	组别	TNF-α	IL-6
14 天	假手术组	41.631 ± 6.211	28.607 ± 6.241
	模型组	77.701 ± 9.692 *	70.460 ± 10.066 *
	低剂量组	59.930 ± 3.130 *#	44.504 ± 5.544 *#
	高剂量组	51.590 ± 4.632 *#△	40.925 ± 6.410 *#
28 天	假手术组	39.342 ± 3.042	27.115 ± 5.152
	模型组	62.742 ± 10.548 *	48.174 ± 8.427 *
	低剂量组	53.046 ± 4.508 *#	36.568 ± 1.908 *#
	高剂量组	47.584 ± 2.919 *#	37.222 ± 6.316 *#

与同天数假手术组比较, * $P < 0.05$; 与同天数模型组比较, # $P < 0.05$; 与同天数低剂量组比较, △ $P < 0.05$

讨 论

动脉粥样硬化(AS)以及相关并发症对人类的健康和生命产生了严重的影响。每年大约有二百万冠心病患者需要行 PCI 术, 支架内再狭窄(ISR)是 PCI 待克服的主要难题之一, 研究表明, 置入金属裸支架(BMS)后 ISR 的发生率约为 30%, 虽然随着药物洗脱支架(DES)的发明及广泛应用, ISR 的发生率已明显降低, 但仍高达 5% ~ 15%, 严重影响了 PCI 的疗效, 其发生机制及处理策略亦尚无定论^[5]。目前相关资料显示, 血管损伤后可以加速炎症因子的释放, 而后者表达的增加又造成了损伤内膜的增生, 因此炎症可能是 ISR 发生、发展的重要机制之一^[6]。

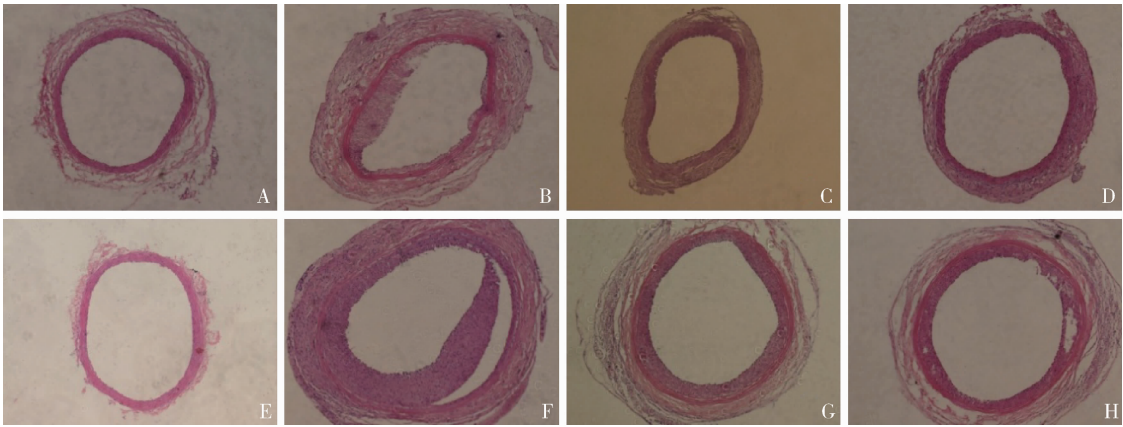


图 1 术后 14、28 天各组颈总动脉新生内膜增生情况(免疫组化, ×100)

A. 14 天假手术组; B. 14 天模型组; C. 14 天阿奇沙坦酯低剂量组; D. 14 天阿奇沙坦酯高剂量组; E. 28 天假手术组; F. 28 天模型组; G. 28 天阿奇沙坦酯低剂量组; H. 28 天阿奇沙坦酯高剂量组

TLR4 是一种特殊的蛋白质分子, 相关研究表明, TLR4 介导的免疫反应在心肌细胞缺血再灌注损伤、心肌炎症等心脏相关病中都扮演了举足轻重的角色, Edfeldt 发现动脉粥样硬化患者中其表达也明显增加^[7,8]。TLR4 识别发现配体后, 通过 MyD88 依赖性

信号转导通路和 MyD88 非依赖性信号转导通路, 介导 NF-κB 的活化^[9,10]。MyD88 主要由氨基端的死亡结构域(DD)、羧基端的 Toll /IL-1 同源受体区(TIR)结构域组成。在 MyD88 依赖的信号转导通路中, MyD88 分别通过羧基端的 TIR 结构域和 TLR4

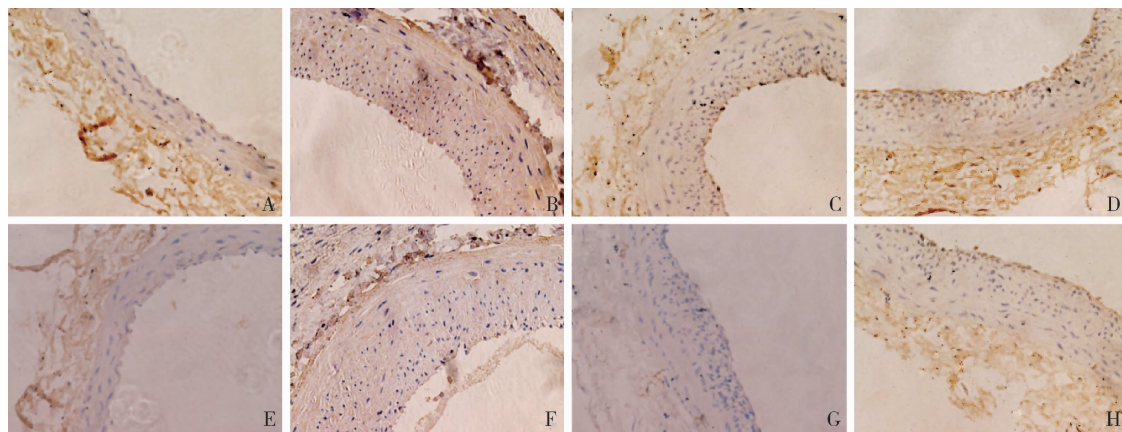


图2 术后14、28天各组颈总动脉内膜PCNA的表达情况(免疫组化, ×400)

A. 14天假手术组; B. 14天模型组; C. 14天阿奇沙坦酯低剂量组; D. 14天阿奇沙坦酯高剂量组; E. 28天假手术组;
F. 28天模型组; G. 28天阿奇沙坦酯低剂量组; H. 28天阿奇沙坦酯高剂量组

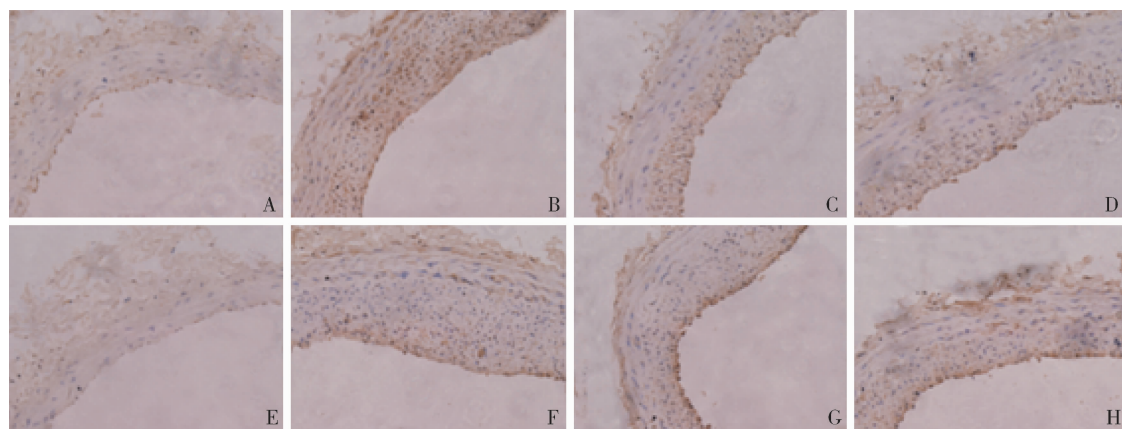


图3 术后14、28天各组颈总动脉内膜TLR4的表达情况(免疫组化, ×400)

A. 14天假手术组; B. 14天模型组; C. 14天阿奇沙坦酯低剂量组; D. 14天阿奇沙坦酯高剂量组; E. 28天假手术组;
F. 28天模型组; G. 28天阿奇沙坦酯低剂量组; H. 28天阿奇沙坦酯高剂量组

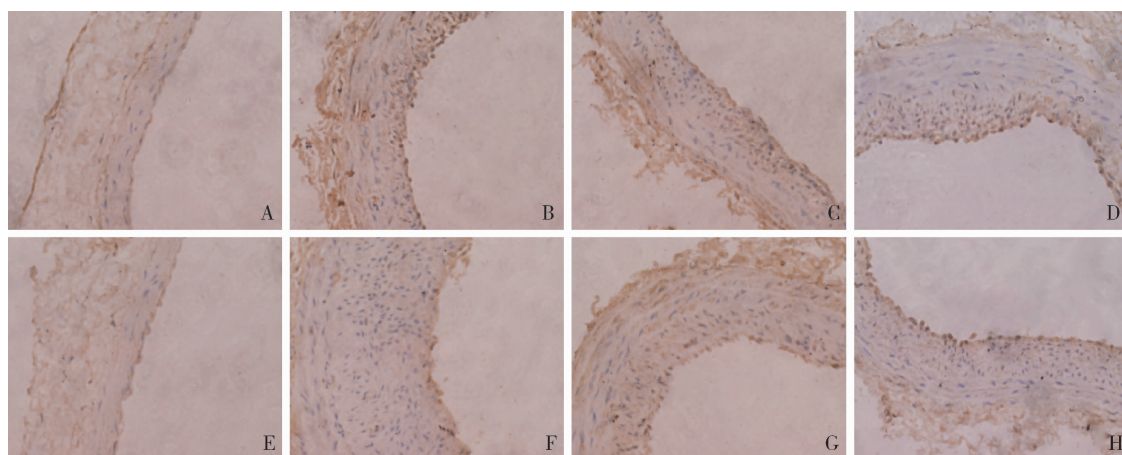


图4 术后14、28天各组颈总动脉内膜NF-κB p65的表达情况(免疫组化, ×400)

A. 14天假手术组; B. 14天模型组; C. 14天阿奇沙坦酯低剂量组; D. 14天阿奇沙坦酯高剂量组; E. 28天假手术组;
F. 28天模型组; G. 28天阿奇沙坦酯低剂量组; H. 28天阿奇沙坦酯高剂量组

的 TIR 相结合,氨基端的 DD 结构域和 IL-1 受体相关激酶(IRAKs)发生关联,导致自身磷酸化并进一步激活肿瘤坏死因子相关受体 6 (TRAF6),后者又使 NF- κ B 的抑制蛋白(I- κ B)磷酸化而降解从而使细胞核内的 NF- κ B 水平升高。MyD88 非依赖性信号转导通路为干扰素调节因子 3 (IRF3)和 NF- κ B 的迟发激活反应。TLR4 激活后通过 TIR 的接头蛋白分子招募 TLRs 相关的干扰素活化因子 (TRIF),TRIF 再激活 IRF3,使其与干扰素激活反应原件连接,使得靶基因的转录被激活,通过与 MyD88 依赖途径类似的途径激活 NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路,促进炎症反应,引起炎症相关基因如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及白细胞介素-1、6、8、12 (IL-1、IL-6、IL-8、IL-12) 等的转录,最终导致斑块的不稳定性^[11]。

本研究结果发现,各组大鼠 TLR4 表达与 NF- κ B p65 表达结果呈现明显相关性。对大鼠球囊损伤后 TLR4 表达与 NF- κ B p65 明显增高,部分炎症因子如 TNF- α 及 IL-6 亦出现不同程度增高,而给予阿奇沙坦酯后其表达较模型组显著降低,这表明阿奇沙坦酯抑制了炎症反应,其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路的活化有关。

增殖细胞核抗原(PCNA)是一种非组蛋白质,其浓度在细胞中呈周期性变化。当细胞处于静止期时基本不表达,大部分仅在增殖细胞中合成与表达,基于其变化与 DNA 合成密切相关^[12]。因此,它可以作为评价细胞增殖状态及活性的有效指标之一,研究发现,细胞增殖程度决定了它的表达水平,其表达阳性细胞数和增殖强度呈正相关^[13]。本实验中模型组表达明显增高,而阿奇沙坦酯高、低剂量组的表达较模型组明显减少,表明阿奇沙坦酯可以抑制细胞增殖。

阿奇沙坦酯是 Takeda 公司研发的新型降压药物,2011 年其已经获得 FDA 批准。相关研究证明其降低血压方面较其他 ARB 类药物如缬沙坦、奥美沙坦及替米沙坦更平稳且效果明显,且不良反应更少^[14-16]。本实验中阿奇沙坦酯组与模型组比较,明显减少内膜增生程度,降低了 TLR4/NF- κ B、PCNA 及下游 TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达($P < 0.05$),说明阿奇沙坦酯可以通过 TLR4 介导的 NF- κ B 通路抑制损伤血管内膜的增殖,降低球囊损伤后血管再狭窄及其发生率,但其抑制血管内膜增生作用是否涉及其他通路有待于进一步研究。

参考文献

- De Caterina AR, Cuculi F, Banning AP. Incidence, predictors and management of left main coronary artery stent restenosis: a comprehensive review in the era of drug-eluting stents. [J]. Eurointervention Journal of Europcr in Collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology, 2013, 8 (11):1326-1334
- Dargad RR, Parekh JD, Dargad RR, *et al.* Azilsartan: Novel Angiotensin Receptor Blocker [J]. J Assoc Physicians India, 2016, 64 (3):96
- Gamboa JL, Pretorius M, Toddztanetos DR, *et al.* Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin-receptor blockade on inflammation during hemodialysis. [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(2):334-342
- Lin CH, Yang H, Xue QL, *et al.* Losartan improves measures of activity, inflammation, and oxidative stress in older mice [J]. Exp Gerontol, 2014, 58:174-178
- Cassese S, Byrne RA, Tada T, *et al.* Incidence and predictors of restenosis after coronary stenting in 10 004 patients with surveillance angiography [J]. Heart, 2014, 100(2):153-159
- Liang S, Aiqun M, Jiwu L, *et al.* TLR3 and TLR4 as potential clinical biomarkers for in-stent restenosis in drug-eluting stents patients [J]. Immunol Res, 2016, 64(2):424
- Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. [J]. Nat Clin Prac Cardiovasc Med, 2007, 4(8):444-454
- Edfeldt K, Swenberg J, Hansson GK, *et al.* Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. [J]. Circulation, 2002, 105(10):1158-1161
- 张丽峰, 曾伟, 刘洋, 等. Toll 样受体 4 及 NF- κ B 与动脉粥样硬化关系的实验研究 [J]. 国际外科学杂志, 2011, 38(1):15-18
- Lv J, Chen Q, Shao Y, *et al.* Cross-talk between angiotensin-II and toll-like receptor 4 triggers asynergistic inflammatory response in rat mesangial cells under high glucose conditions [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 459(2):264-269
- Wang YC, Lin S, Yang QW. Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. [J]. J Neuroinflamm, 2011, 8(1):1-11
- Joubert A, Bianchi P, Maritz C, *et al.* Influence of prostaglandin A2 on Bax, Bcl-2 and PCNA expression in MCF-7 cells. [J]. Biomedical Research, 2006, 27(4):157-162
- Choe KN, Moldovan GL. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork [J]. Molecular Cell, 2017:380-392
- Handley A, Lloyd E, Roberts A, *et al.* Safety and tolerability of azilsartan medoxomil in subjects with essential hypertension: a one-year, phase 3, open-label study [J]. Clin Exp Hypertension, 2016, 38(2):180
- White WB, Weber MA, Sica D, *et al.* Effects of the angiotensin receptor blocker azilsartan medoxomil versus olmesartan and valsartan on ambulatory and clinic blood pressure in patients with stages 1 and 2 hypertension. [J]. Hypertension, 2011, 57(3):413-420
- Kipnes MS, Handley A, Lloyd E, *et al.* Safety, Tolerability, and Efficacy of azilsartan medoxomil with or without chlorthalidone Ddring and after 8 months of treatment for hypertension. [J]. J Clin Hypertension, 2015, 17(3):183-192

(收稿日期:2017-03-03)

(修回日期:2017-03-16)