

# 阿托伐他汀与一氧化碳供体分子3联用对动脉粥样硬化易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响<sup>Δ</sup>

魏刚<sup>1\*</sup>,包小敏<sup>1</sup>,张英<sup>2</sup>,黄维义<sup>1#</sup>(1.西南医科大学附属医院心内科,四川泸州 646000;2.西南医科大学机能实验室,四川泸州 646000)

中图分类号 R543.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0338-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.12

**摘要** 目的:研究阿托伐他汀与一氧化碳供体分子3(CORM-3)联用对动脉粥样硬化(AS)易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响。方法:取大鼠随机分为对照组(灌胃生理盐水)、模型组(灌胃生理盐水)、他汀组[灌胃阿托伐他汀2 mg/kg]、他汀+CORM-3组[灌胃阿托伐他汀2 mg/kg+腹腔注射CORM-3 10 mg/kg],每组8只。对照组大鼠予以基础饲料喂养,右颈总动脉只经历手术暴露但不予损伤并用生理盐水代替药物干预;其余3组大鼠均予以高脂饲料喂养+右颈总动脉损伤+异种蛋白注射刺激免疫炎症反应等方法复制AS易损斑块模型,继续饲养10周后,给予相应药物进行干预,每天1次,连续2周。末次给药24 h后取腹腔动脉血,使用全自动生化分析仪测定血浆中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)浓度,采用酶联免疫吸附试验检测血浆中超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素10(IL-10)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)水平,化学比色法测定血浆中丙二醛(MDA)、氧化修饰型低密度脂蛋白(ox-LDL)水平,Western blot法测定血红素氧合酶1(HO-1)蛋白表达水平,并取右颈总动脉在光镜下观察病理学变化。结果:与对照组比较,模型组大鼠LDL-C、hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL水平和HO-1蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ),HDL-C、IL-10水平均明显降低( $P<0.05$ ),右颈总动脉形成明显的易损斑块。与模型组比较,他汀组和他汀+CORM-3组大鼠LDL-C、hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL水平均明显降低( $P<0.05$ ),HDL-C、IL-10水平和HO-1蛋白表达水平均明显升高( $P<0.05$ ),其中除LDL-C、HDL-C外其余指标他汀+CORM-3组改善效果较他汀组更明显( $P<0.05$ ),他汀组颈动脉斑块改变尚不明显,但他汀+CORM-3组AS病变较模型组和他汀组显著减轻,斑块结构也更趋稳定。结论:阿托伐他汀与CORM-3联用对AS易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的改善作用强于单用阿托伐他汀,能促进AS易损斑块稳定。

**关键词** 阿托伐他汀;一氧化碳供体分子3;动脉粥样硬化;易损斑块;炎症;氧化应激;大鼠

- in-solid dispersion granules obtained using fluid bed granulation[J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014, 24(1):413-429.
- [10] JANG DJ, KIM ST, OH E, et al. Enhanced oral bioavailability and antiasthmatic efficacy of curcumin using redispersible dry emulsion[J]. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2014, 24(1):917-930.
- [11] CHAUHAN PS, SUBHASHINI, DASH D, et al. Intranasal curcumin attenuates airway remodeling in murine model of chronic asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1):63-75.
- [12] 王风秀,于锋英.姜黄素药物递送系统研究进展[J]. *中国药业*, 2014, 23(18):120-121.
- [13] 李楠,李锡晶,王倩,等.微乳法制备姜黄素固体脂质纳米粒[J]. *中国药房*, 2015, 26(19):2698-2702.
- [14] 李楠,于美丽.姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的制备工艺研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(28):3979-3981.
- [15] 李楠,刘佩莉,孔令钰,等.姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的质量评价及初步稳定性考察[J]. *中国药房*, 2016, 27(34):4838-4841.
- [16] 陈德,刘意,范凯燕,等.姜黄素微球中药物存在形式与释药行为的关系研究[J]. *药学学报*, 2016, 51(1):140-146.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:120-124.
- [18] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M]. 4版.北京:人民卫生出版社,2010:383-393.
- [19] WEBER S, ZIMMER A, PARDEIKE J. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(1):7-22.
- [20] DAL MAGRO R, ORNAGHI F, CAMBIANICA I, et al. ApoE-modified solid lipid nanoparticles: a feasible strategy to cross the blood-brain barrier[J]. *J Control Release*, 2017.DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.01.039.
- [21] 陈亚媛,赵娣,李宁.缓释型肺吸入制剂的研究进展[J]. *药学研究*, 2018, 37(8):469-481.

Δ 基金项目:四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研专项资金计划项目(No.14JC0051);泸州市科技局项目(No.2013LZLY-J15)

\* 医师,硕士研究生。研究方向:介入心脏病学。电话:0830-3165289。E-mail:553725703@qq.com

# 通信作者:教授,硕士。研究方向:介入心脏病学。电话:0830-3165289。E-mail:hwy6881@126.com

(收稿日期:2018-09-05 修回日期:2018-12-11)

(编辑:邹丽娟)

# Effects of Atorvastatin Combined with CORM-3 on Inflammation and Oxidative Stress Indexes in Atherosclerotic Vulnerable Plaque Model Rats

WEI Gang<sup>1</sup>, BAO Xiaomin<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, HUANG Weiyi<sup>1</sup> (1.Dept. of Cardiology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2.Dept. of Functional Lab, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the effects of atorvastatin combined with carbon monoxide releasing molecule 3 (CORM-3) on inflammation and oxidative stress indexes in atherosclerotic (AS) vulnerable plaque model rats. **METHODS:** The rats were randomly divided into control group (normal saline, i.g.), model group (normal saline, i.g.), statin group (atorvastatin 2 mg/kg, i.g.), and statin+CORM-3 group (atorvastatin 2 mg/kg, i.g.+CORM-3 10 mg/kg, i.p.), with 8 rats in each group. Control group was fed with basal diet, and the right common carotid artery was exposed to surgery without injury and was treated with normal saline instead of drug; other three groups were fed with high-fat diet+right common carotid artery injury+heteroprotein injection to induce AS vulnerable plaque model, for 10 weeks; and then they were given relevant medicine for intervention, once a day, for consecutive 2 weeks. 24 h after last medication, abdominal artery blood was collected; the concentration of LDL-C and HDL-C were determined by fully automatic biochemical analyzer. The levels of hs-CRP, IL-10, MCP-1 and MMP-9 in plasma were detected by ELISA; plasma levels of MDA and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) were determined by chemical colorimetry; the protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1) was determined by Western blot. The pathological changes of right common carotid artery were observed under light microscope. **RESULTS:** Compared with control group, the levels of LDL-C, hs-CRP, MCP-1, MMP-9, MDA and ox-LDL, and protein expression of HO-1 were increased significantly ( $P<0.05$ ), while the levels of HDL-C and IL-10 were decreased significantly in model group ( $P<0.05$ ); the right common carotid artery formed obvious AS plaques. Compared with model group, the levels of LDL-C, hs-CRP, MCP-1, MMP-9, MDA and ox-LDL were decreased significantly in statin group and statin+CORM-3 group in model group ( $P<0.05$ ), while the levels of HDL-C, IL-10 and the protein expression of HO-1 were increased significantly ( $P<0.05$ ). Except for LDL-C and HDL-C, the improvement of other indexes in statin+CORM-3 group was more significant than statin group ( $P<0.05$ ); pathological changes of right common carotid artery in statin group were not obvious, but the pathological changes of rats in statin+CORM-3 group were significantly alleviated and plaque structure also tended to be more stable. **CONCLUSIONS:** Atorvastatin combined with CORM-3 is better than atorvastatin alone in improving inflammation and oxidative stress indexes of AS vulnerable plaque model rats, and can promote the stability of AS vulnerable plaques.

**KEYWORDS** Atorvastatin; CORM-3; Atherosclerosis; Vulnerable plaque; Inflammation; Oxidative stress; Rat

易损斑块是引发主要心血管不良事件的重要病理基础,而炎症和氧化应激是易损斑块进展的罪魁祸首,由此可见,在动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)防治中,抑制炎症进而稳定斑块比消退斑块更有临床意义<sup>[1-2]</sup>。他汀类药物自问世以来因其显著的调脂作用已成为AS防治的基石,但常规应用他汀类药物仅能预防30%~40%的心血管事件,残余风险仍然很高<sup>[3]</sup>。近年来有研究发现,他汀类药物还能通过诱导血红素氧合酶1(Heme oxygenase-1, HO-1)这一内源性保护酶的表达发挥抗炎、抗氧化应激、保护血管内皮等调脂外作用,后者对稳定AS易损斑块尤其重要<sup>[4]</sup>。还有研究表明,他汀诱导HO-1表达与其剂量呈正相关性,诱导HO-1持续高表达所需剂量可能远超临床常规用量<sup>[5]</sup>。实际上,我国患者对强化他汀类药物治疗的耐受性差<sup>[6]</sup>,采用中小剂量的常规他汀类药物进行治疗时,可能会因剂量不足以高效诱导HO-1表达而削弱其稳定易损斑块及减少心血管不良事件的作用,如何弥补这一缺陷值得探讨。已知HO-1能够催化游离血红素降解生成胆红素、一氧化碳(CO)和Fe<sup>2+</sup>,且

CO是HO-1发挥有益作用的主要效应分子<sup>[7-8]</sup>,此外外源性CO也能通过多种细胞内信号途径产生与HO-1表达相似的抗炎、抗组织细胞乃至器官损伤等作用<sup>[9]</sup>,但补充外源性CO能否协同小剂量他汀类药物增强易损斑块的稳定性目前国内外均无研究报道。CO供体物质经过不断的研究开发,目前主要有五种类型,其中新型一氧化碳供体分子3(CORM-3)为目前开发的第三代过渡金属羰基类有机化合物,为新型水溶性CO供体分子,具有良好的应用前景,在体内可持续释放CO作用于靶点组织发挥抗炎、抗氧化作用<sup>[10-12]</sup>。本文拟选用CORM-3及循证医学证据最足的阿托伐他汀<sup>[13]</sup>,探讨两者联用对AS易损斑块模型大鼠炎症及氧化应激指标的影响,以期AS的临床治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TBA-40FR全自动生化分析仪(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);DR-200Bs酶标仪(济南Diatek公司);TGL-16c台式离心机(上海安亭科学仪器厂);

WD-9405A脱色摇床(北京市六一仪器厂);光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 药品与试剂

维生素 D<sub>3</sub>注射液(上海通用药业股份有限公司,批号:170921,规格:30万 u:1 mL);卵清白蛋白(批号:201706P9)和牛血清白蛋白(批号:712W051)均购自北京索莱宝科技有限公司;阿托伐他汀钙片(辉瑞制药有限公司,批号:W19186,规格:20 mg)、CORM-3(美国 Sigma 公司,批号:LQ2657-467,纯度:>98%);氧化修饰型低密度脂蛋白(ox-LDL)、丙二醛(MDA)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、超敏C反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素10(IL-10)、单核细胞超化蛋白1(MCP-1)(英国 Abcam 公司,批号:Ek-R31009、Ek-AQ2098、Ek-LQ5402、Ek-R30252、Ek-HT0183、Z06527);HO-1 抗体试剂盒(美国 Novus 公司,批号:HU-203242);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(中杉金桥公司,批号:ZPI-9032)。

## 1.3 动物

SPF级SD大鼠32只,♂,8周龄,体质量(200±10)g,由西南医科大学医学实验中心提供和饲养,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2018-17,使用许可证号:SYXK(川)2018-065。饲养环境室温:21~22℃,相对湿度:50%~60%,本研究方案已获得西南医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC:20170917006),所有大鼠均按照3R原则给予人道主义关怀。

## 1.4 高脂饲料

高脂饲料配方:在81.3%比例的基础饲料中均匀混入丙基氧嘧啶-胆酸钠-胆固醇-猪油的混合物,混合物比例分别为0.2%、0.5%、3%、10%,经消毒灭菌后制成颗粒状饲料。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

经适应性喂养1周的大鼠随机分为4组,即对照组(灌胃生理盐水)、模型组(灌胃生理盐水)、他汀组(灌胃阿托伐他汀2 mg/kg)、他汀+CORM-3组(灌胃阿托伐他汀2 mg/kg+腹腔注射CORM-3 10 mg/kg),每组8只。对照组大鼠持续予以基础饲料喂养,其余3组大鼠均以高脂饲料喂养2周,并在高脂饮食基础上复制AS易损斑块模型,继续经高脂饲料喂养10周后,给予相应药物进行干预,每天给药1次,连续干预2周。阿托伐他汀的给药剂量是按照实验动物与人体用药量的折算系数换算的临床常规用量;CORM-3的给药剂量是参考文献[10]中的剂量,二者均以生理盐水为溶剂进行稀释。

### 2.2 造模

对照组大鼠右颈总动脉只分离暴露但不予损伤,各时间点的干预操作与其余组相同,但所用药物均用生理盐水代替。其余3组大鼠参照文献[14-15]方法复制AS易损斑块模型,经腹腔一次性注射维生素D<sub>3</sub>注射液70万 u/kg并以高脂饲料饲养2周后,在无菌环境下进行以

下操作:首先经腹腔注射50 mg/kg戊巴比妥钠进行麻醉手术,充分麻醉后沿其颈前正中线位置将其皮肤切开,使其右侧劲总动脉充分暴露,排空血液并以微动脉夹阻断右颈总动脉近心端及远心端,以液氮对该段血管冷冻损伤约15 s,去除动脉夹恢复血流,缝合伤口。术后继续高脂饲料喂养并经皮下注射牛血清白蛋白(40 mg/kg,每周3次,共计3周),并经腹腔注射卵清白蛋白(2.5 mg/kg,每3 d 1次,共计5次);并于第5、7周各追加腹腔注射维生素D<sub>3</sub> 30万 u/kg,第6周不给药和维生素D<sub>3</sub>,仅持续予以高脂饲料饲养。10周后,光镜下观察血管内膜、纤维帽、脂质沉积、炎症细胞、胶原含量等形态结构的变化,并结合血清学炎症、氧化应激指标综合判断AS易损斑块模型是否复制成功<sup>[16]</sup>。

### 2.3 血浆中血脂指标的检测

于最后一次给药24 h后,经腹腔动脉取血5 mL后,立即以3 000 r/min离心5 min后分离出血浆,然后通过TBA-40FR全自动生化分析仪测定其中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的浓度。

### 2.4 血浆炎症、氧化应激指标的检测

经腹主动脉取血后分离出血浆,采用酶联免疫吸附试验检测其中相关炎症指标hs-CRP、IL-10、MCP-1、MMP-9水平,采用化学比色法检测相关氧化损伤指标MDA、ox-LDL水平,均按照试剂盒说明书操作。

### 2.5 Western blot法检测HO-1的表达

经腹主动脉取血后离心,小心吸取白细胞层,加入3倍体积红细胞裂解液,反复轻晃5~10 min,经1 000 r/min离心3 min后吸弃上清液,然后再加入3倍体积的红细胞裂解液,重复进行上述操作,到出现白色沉淀物为止。按照HO-1抗体试剂盒说明书进行操作,采用Western blot法检测HO-1蛋白表达量,以GAPDH为内参,通过Quantity图像分析软件对相对表达量进行分析,并且以目标蛋白与内参的灰度比值来表示。

### 2.6 右颈总动脉病理组织学检查

取血完毕后处死各组大鼠,取造模的靶血管段,于西南医科大学附属医院病理科经10%甲醛进行固定、包埋和脱水处理后行苏木精-伊红(HE)染色,然后在光镜下观察纤维帽厚度、脂质含量、胶原含量、炎症细胞浸润等AS易损斑块特征的病理形态学变化。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,方差齐时采用LSD法进行组间比较;反之,则采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血脂指标变化

与对照组比较,模型组大鼠血浆中LDL-C浓度含量明显升高,而HDL-C浓度则明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,他汀组和他汀+CORM-3组大鼠血浆中

LDL-C 浓度明显降低, HDL-C 浓度则明显升高 ( $P < 0.05$ )。他汀组与他汀+CORM-3 组比较, LDL-C、HDL-C 浓度差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组大鼠血浆中 LDL-C、HDL-C 浓度的测定结果见表 1。

表 1 各组大鼠血浆中 LDL-C、HDL-C 浓度的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 1 Results of plasma LDL-C and HDL-C concentration in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	LDL-C, mmol/L	HDL-C, mmol/L
对照组	2.02 ± 0.18	2.43 ± 0.07
模型组	5.30 ± 0.17*	1.08 ± 0.08*
他汀组	3.68 ± 0.11**	1.58 ± 0.08**
他汀+CORM-3 组	3.56 ± 0.13**	1.49 ± 0.07**

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, # $P < 0.05$

### 3.2 血浆中炎症与氧化应激指标变化

与对照组比较, 其余 3 组大鼠血浆中 hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 他汀组、他汀+CORM-3 组大鼠血浆中 hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与他汀组比较, 他汀+CORM-3 组大鼠血浆中 hs-CRP、MCP-1、MMP-9、MDA、ox-LDL 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠血浆中炎症指标的测定结果见表 2, 氧化应激指标的测定结果见表 3。

表 2 各组大鼠血浆中炎症指标的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 Results of plasma inflammation indexes in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	hs-CRP, pg/mL	IL-10, pg/mL	MCP-1, pg/mL	MMP-9, pg/mL
对照组	2.06 ± 0.18	181.24 ± 6.96	276.25 ± 6.62	949.09 ± 45.43
模型组	4.49 ± 0.11*	60.07 ± 5.70*	411.72 ± 12.18*	1 743.05 ± 54.39*
他汀组	3.49 ± 0.10**	97.68 ± 3.71**	350.09 ± 10.33**	1 334.14 ± 82.87**
他汀+CORM-3 组	2.51 ± 0.03*** <sup>Δ</sup>	140.96 ± 2.81*** <sup>Δ</sup>	301.62 ± 4.88*** <sup>Δ</sup>	1 108.73 ± 54.73*** <sup>Δ</sup>

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ ;与他汀组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, # $P < 0.05$ ; vs. statin group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

表 3 各组大鼠血浆中氧化应激指标的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 3 Results of oxidative stress indexes in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	MDA, nmol/mL	ox-LDL, pg/mL
对照组	9.35 ± 0.41	0.78 ± 0.05
模型组	20.83 ± 0.54*	4.22 ± 0.06*
他汀组	15.34 ± 0.54**	2.84 ± 0.05**
他汀+CORM-3 组	11.49 ± 0.75*** <sup>Δ</sup>	1.45 ± 0.04*** <sup>Δ</sup>

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ ;与他汀组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, # $P < 0.05$ ; vs. statin group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

### 3.3 HO-1 蛋白表达变化

对照组、模型组、他汀组、他汀+CORM-3 组大鼠的 HO-1 蛋白相对表达量分别为  $0.050 \pm 0.008$ 、 $0.093 \pm 0.007$ 、 $0.226 \pm 0.015$ 、 $0.397 \pm 0.012$ 。与对照组比较, 其余 3 组大鼠的 HO-1 蛋白相对表达量均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 他汀组、他汀+CORM-3 组大鼠的 HO-1 蛋白相对表达量均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与他汀组比较, 他汀+CORM-3 组大鼠的 HO-1 蛋白相对表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠 HO-1 蛋白表达的电泳图见图 1, 相对表达量测定结果见图 2。

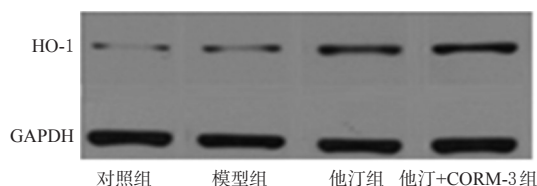
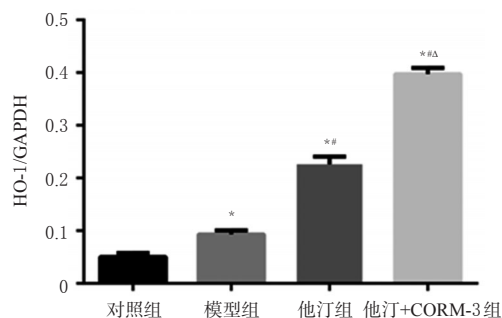


图 1 各组大鼠 HO-1 蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoregram of protein expression of HO-1 in rats of each group



注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型组比较, # $P < 0.05$ ;与他汀组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, # $P < 0.05$ ; vs. statin group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

图 2 各组大鼠 HO-1 蛋白相对表达量的测定结果

Fig 2 Results of protein relative expression of HO-1 in rats of each group

### 3.4 颈总动脉组织病理学变化

对照组大鼠右侧颈总动脉镜下病理学提示, 各层结构排列整齐, 未见明显 AS 易损斑块形成; 模型组大鼠右侧颈总动脉镜下病理学提示, 内皮存在明显隆起的 AS 易损斑块, 纤维帽薄且不完整, 其下含有大量的脂质沉积, 且脂核较明显, 斑块内胶原纤维含量较少且存在大量的炎症细胞浸润情况, 内膜增厚, 结构明显紊乱; 他汀组与模型组大鼠右侧颈总动脉镜下病理学提示, 他汀组与模型组相似, 均可见内皮明显增厚隆起, 纤维帽薄且不完整, 存在大量泡沫细胞, 中膜平滑肌纤维排列紊乱, 但他汀组颈总动脉炎症细胞浸润减少; 他汀+CORM-3 组 AS 病变较模型组和他汀组显著减轻, 脂核已不明显, 纤维帽虽薄但内皮覆盖较完整, 炎症细胞浸润明显减少。各组大鼠右颈总动脉组织病理学变化见图 3。

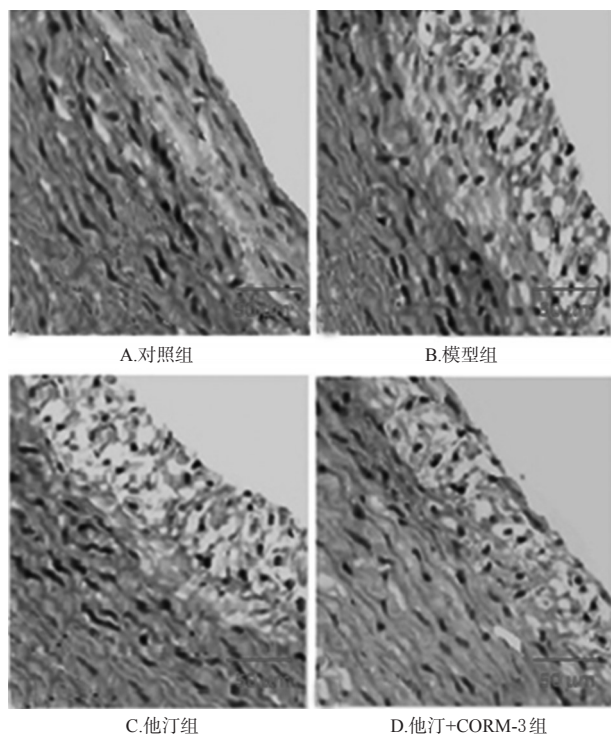


图3 各组大鼠右颈总动脉组织病理学变化(HE, ×400)  
 Fig 3 Histopathological changes of right common carotid artery in rats of each group(HE, ×400)

#### 4 讨论

鼠与人类同属杂食性动物,可以复制出与人体AS相似的模型,且在内皮受损及炎症刺激基础上更易于复制出易损斑块,考虑到雌性大鼠体内雌激素水平对复制AS易损斑块模型干扰较大,因此,本研究选用雄性SD大鼠,并借鉴文献[14-15]采用了如下综合方法:在高脂饲料喂养+多次注射维生素D<sub>3</sub>基础上,特地用液氮冷冻右侧颈总动脉造成靶血管内皮损伤和局部无菌性炎症,随后数次注射异种蛋白进一步激发免疫性炎症反应,历经12周后,检测模型组大鼠显示右颈总动脉出现典型形态的不稳定AS易损斑块,同时测得血浆中多种炎症与氧化应激指标均明显升高,这些变化证明采用的综合方法成功复制出了大鼠AS易损斑块模型<sup>[16]</sup>,为后续的干预实验奠定了基础。

HO-1是一种具有抗AS作用的酶,在AS斑块形成过程中是有一定表达的,但表达量不足以发挥抗AS的作用,因此诱导HO-1的表达使其发挥抗炎、抗氧化应激、保护血管内皮等对稳定AS易损斑块尤其重要<sup>[8]</sup>。因此本研究在复制AS易损斑块模型后设置了他汀、他汀+CORM-3两个干预组,两组阿托伐他汀用量相等,均约等于临床常规剂量。结果显示,与对照组及模型组比较,他汀组和他汀+CORM-3组取得的调脂效果相同,且都能增加HO-1蛋白表达,但他汀+CORM-3组诱导HO-1蛋白表达的效果强于他汀组,同时,两组在改善炎症、氧化应激与AS易损斑块方面效果也有明显差异。

相较于模型组,他汀组促炎症与氧化应激的指标虽明显降低且抗炎因子IL-10水平增加,但AS易损斑块却无明显改善;他汀+CORM-3组在促炎症与氧化应激的指标更显著降低的同时AS易损斑块也明显改善,表明阿托伐他汀联合CORM-3在抗炎、抗氧化和稳定易损斑块等效果上强于单用阿托伐他汀。

他汀类药物主要通过调脂作用抑制AS<sup>[17]</sup>,其稳定或逆转AS易损斑块的过程缓慢,短期干预常难有显著改善。然而又有研究发现,他汀类药物能通过p38腺苷酸活化蛋白激酶(p38MAPK)、核转录因子κB(NF-κB)、Nrf-2/ARE等细胞信号转导途径诱导HO-1蛋白表达,后者可能是他汀类药物抗炎、抗氧化应激等“调脂外作用”的主要介导者,可先于调脂作用显现出对AS易损斑块的稳定效果<sup>[18]</sup>。HO-1实质是细胞内一种可诱导型抗氧化酶,其主要作用是催化游离血红素降解成胆红素和CO等产物。现已明确,胆红素是一种细胞内源性抗氧化剂,对多种自由基均能有效清除以抑制氧化应激损伤;CO则是重要的细胞内气体信号分子,主要通过抑制Toll样受体4(TLR4)/NF-κB信号通路产生抗炎及抗氧化等作用<sup>[19]</sup>。HO-1/胆红素/CO共同组成了组织细胞应对炎症和氧化应激损伤所不可或缺的内源性保护系统,先天缺乏HO-1基因或后天阻滞HO-1表达与活性均可促发严重的AS病变,而合理上调HO-1表达则已成为包括AS在内的许多疾病的有效防治靶点<sup>[18]</sup>。

有研究表明,他汀类药物诱导HO-1表达具有明显的剂量依赖性<sup>[20]</sup>。正如本研究中他汀组所用常规剂量的阿托伐他汀,尽管能诱导HO-1表达,但毕竟上调的幅度有限,其抗炎、抗氧化作用较弱,短期内难以快速显现出稳定AS易损斑块的效果。此外,多数国人因横纹肌溶解、肝毒性等副作用对大剂量他汀类药物耐受性较差也是一个不可忽视的限制性因素<sup>[6,21]</sup>,如何弥补这一缺陷值得探讨。基于CO是HO-1发挥抗炎、抗氧化以及抗细胞凋亡等作用的主要效应分子,理论上诱导HO-1的表达缺乏可以通过补充外源性CO来替代并取得相似的生物学效应。为此,本研究特别设计了他汀+CORM-3组,其中CORM-3为低毒的新型水溶性CO供体分子,在体内可不经代谢而持续24h以上释放CO作用于靶点组织发挥抗炎作用,且CORM-3本身也能诱导HO-1表达<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示,他汀+CORM-3组调脂效果虽与他汀组相当,但诱导的HO-1相对表达量明显高于他汀组,由此提示加用CORM-3能通过释放CO和增加HO-1诱导表达双重机制发挥更强的抗炎、抗氧化应激损伤作用。该作用再与阿托伐他汀的调脂作用相叠加从而协同增强了稳定AS易损斑块的最终效果,具体表现在右颈总动脉AS易损斑块病变程度减轻、脂核缩小、斑块内炎症细胞浸润减少、斑块表面内皮覆盖较完整等。

目前离体和在体实验均表明,CO有助于抑制炎症和氧化应激损伤。但由于第一代CO供体物质(CORM-1)及第二代CO供体物质(CORM-2)均需在理化因素刺激下才能有效释放CO,其难以操控的安全阈值限制了二者在生物系统中的应用。相比之下,新开发的CORM-3不受理化因素的影响,溶于水溶液中可稳定而持续低浓度释放CO,其安全性大大提升,因此具有很好的应用前景<sup>[12]</sup>。

综上所述,常规剂量的阿托伐他汀联合CORM-3治疗AS时有望能协同增强抗炎、抗氧化应激损伤、稳定AS易损斑块,从而有效降低心血管不良事件,但这一推论尚需获得临床试验证实。

## 参考文献

[1] YANG HJ, KIM GW, KIM H, et al. Epidemiology and outcomes in out-of-hospital cardiac arrest: a report from the NEDIS-based cardiac arrest registry in Korea[J]. *Korean Med Sci*, 2015, 30(1):95-103.

[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] AKDIM F, VAN LEUVEN SI, KASTELEIN JJ, et al. Pleiotropic effects of statins: stabilization of the vulnerable atherosclerotic plaque?[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(10):1003-1012.

[4] BARONE E, DI DOMENICO F, BUTTERFIELD DA. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4):605-616.

[5] LOBODA A, JAZWA A, JOZKOWICZ A, et al. Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1):26-30.

[6] HPS2-THRIVE Collaborative Group. HPS2-THRIVER randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment[J]. *Eur Heart J*, 2013. DOI: 10.1093/eurheartj/eht055.

[7] BAK SU, KIM S, HWANG HJ, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) axis suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation by inhibiting redox-sensitive NF-kappaB activation[J]. *BMB Rep*, 2017, 50(2):103-108.

[8] CAO S, DU J, HEI Q. Lycium barbarum polysaccharide

protects against neurotoxicity via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5):4919-4927.

[9] 刘瀚旻, 谢亮. 一氧化碳在心血管系统中的调控作用[J]. *生理科学进展*, 2017, 48(1):52-57.

[10] MOTTERLINI R, HAAS B, FORESTI R. Emerging concepts on the anti-inflammatory actions of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) [J]. *Med Gas Res*, 2012, 2(1):28.

[11] SONG L, LI J, YUAN X, et al. Carbon monoxide-releasing molecule suppresses inflammatory and osteoclastogenic cytokines in nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via the heme oxygenase-1 pathway[J]. *Int Mol Med*, 2017, 40(5):1591-1601.

[12] 刘轶林, 洪纓, 王晶. 新型一氧化碳供体CORMs及其生物活性的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2012, 43(2):150-154.

[13] CHAN JC, KONG AP, BAO W, et al. Safety of atorvastatin in Asian patients within clinical trials[J]. *Cardiovasc Ther*, 2016, 34(6):431-440.

[14] 张安邦, 黄昕, 李令根, 等. 复合方法制备SD大鼠动脉粥样硬化模型[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2015, 21(3):282-285.

[15] 王双双, 王丽丽, 杨升华, 等. 改良液氮冷冻法建立易损动脉粥样硬化斑块模型[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(21):6082-6085.

[16] 王聪霞, 张岩. 易损性动脉粥样硬化斑块评价指标的研究进展[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(3):307-312.

[17] 黄正桥, 刘建, 朱莹. 阿托伐他汀钙联合普罗布考治疗动脉粥样硬化的临床观察[J]. *中国药房*, 2017, 28(23):3220-3223.

[18] PIECHOTA-POLANCZYK A, JOZKOWICZ A. The role of statins in the activation of heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases[J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(6):674-686.

[19] 张茵燕, 殷小平. 一氧化碳对TLR4/NF-κB信号通路影响的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12(1):48-51.

[20] MIRJANIC-AZARIC B, RIZZO M, JÜRGENS G, et al. Atorvastatin treatment increases plasma bilirubin but not HMOX1 expression in stable angina patients[J]. *Scand Clin Lab Invest*, 2015, 75(5):382-389.

[21] STULC T, CESKA R, GOTTO AM. Statin intolerance: the clinician's perspective[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2015, 17(12):69.

(收稿日期:2018-09-10 修回日期:2018-12-06)

(编辑:邹丽娟)