

# 单硝酸异山梨酯对动脉粥样硬化兔血管内皮细胞功能的影响及机制探讨

陈旭<sup>1,2</sup>, 杨波<sup>3</sup>, 曹新冉<sup>1</sup>, 郝青青<sup>1</sup>, 徐飞飞<sup>1</sup>, 李敏<sup>1</sup>, 朱贵月<sup>1</sup>, 朱兴雷<sup>1</sup>, 董波<sup>1</sup>

(1. 山东大学附属省立医院心内科, 山东 济南 250021; 2. 莒县人民医院心内科, 山东 日照 276500; 3. 赤峰学院附属医院心内科, 内蒙古 赤峰 024000)

**摘要:**目的 研究单硝酸异山梨酯对动脉粥样硬化兔血管内皮细胞功能的影响及机制。方法 将30只新西兰大白兔随机分为对照组、高脂组、单硝酸异山梨酯组, 每组10只。高脂组给予高胆固醇饲料(1.5%胆固醇+5%猪油的颗粒饲料)喂养, 单硝酸异山梨酯组给予高胆固醇饲料+单硝酸异山梨酯 $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。8周后, 3%戊巴比妥( $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )耳缘静脉注射麻醉, 取腹主动脉做病理切片, 行常规HE染色观察腹主动脉斑块的大小, 行免疫组化染色检测植物血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1), P-选择素(P-selectin), 并且应用全自动生化分析仪及生化测定试剂盒, 测定动脉硬化兔血清总胆固醇(TC)及三酰甘油(TG)的水平。结果 单硝酸异山梨酯组腹主动脉斑块的LOX-1和P-selectin的表达水平明显低于高脂组( $P < 0.05$ ), 但是血清TC、TG与高脂组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 单硝酸异山梨酯具有延缓动脉粥样硬化进展的作用, 其机制可能与下调LOX-1、P-selectin等黏附分子, 减轻斑块炎性细胞浸润进而改善血管内皮细胞功能有关。

**关键词:** 动脉粥样硬化; 炎症; 植物血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1; P-选择素; 单硝酸异山梨酯

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.06.006

## The therapeutic effects of isosorbide mononitrate on endothelial function in plaque of atherosclerosis in rabbit

CHEN Xu<sup>1,2</sup>, YANG Bo<sup>3</sup>, CAO Xinran<sup>1</sup>, HAO Qingqing<sup>1</sup>, XU Feifei<sup>1</sup>,

LI Min<sup>1</sup>, ZHU Guiyue<sup>1</sup>, ZHU Xinglei<sup>1</sup>, DONG Bo<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China; 2. People's Hospital of Juxian, Rizhao, Shandong 276500, China; 3. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng, Inner Mongolia 024000, China)

**Abstract: Objective** To observe the therapeutic effects of Isosorbide Mononitrate on endothelial function in atherosclerosis in rabbits.

**Methods** Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: control group, high cholesterol (1.5% Cholesterol + 5% cocoa butter) group and Isosorbide Mononitrate (ISMN) group (high cholesterol diet + ISMN  $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 10 rabbits for each group). The extent of atherosclerotic plaque was evaluated by HE staining. The expression of LOX-1 and P-selectin was evaluated by immunohistochemistry staining. The serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were measured by a kit. **Results** The extent of atherosclerotic plaque was significantly lower in ISMN group than that of high cholesterol group. The expression of LOX-1 and P-selectin was lower in ISMN group than those of high cholesterol group. But there was no statistical difference of serum TC and TG level between ISMN group and high cholesterol group. **Conclusion** The results suggest that ISMN can alleviate the progress of AS by reducing the expression of adhesive molecule, inhibiting inflammatory response and improving endothelial function.

**Key words:** Atherosclerosis; Inflammation; LOX-1; P-selectin; Isosorbide mononitrate

硝酸酯类药物是临床使用非常广泛的一类药物, 是缓解心绞痛使用最普遍的药物之一。有研究发现长期应用硝酸酯类药物, 可增加氧自由基的产生, 从而对血管内皮功能有潜在的不利影响<sup>[1]</sup>。Thomas等<sup>[2]</sup>研究发现应用单硝酸异山梨酯导致内皮依赖性

舒张功能明显减弱, 而 Müller等<sup>[3]</sup>则认为长期应用硝酸酯类药物, 保护了内皮细胞的功能, 并改善了动脉硬化的病理过程。为了探讨硝酸酯类药物对血管内皮的影响, 本研究建立新西兰大白兔动脉硬化模型, 应用单硝酸异山梨酯治疗, 观察其对血管内皮细胞功能及其对动脉硬化的影响, 现报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 30只普通级新西兰大白兔, 体质量

基金项目: 中国医师协会探索心血管研究基金(DFCMDA201213)

通信作者: 董波, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 动脉硬化相关性心血管疾病的机制及治疗, E-mail: dbsh2004@163.com

(2.58 ± 0.32) kg, 购自济南西岭动物实验场(许可证号:鲁 SCXK20150001), 单硝酸异山梨酯(珠海许瓦兹制药有限公司生产, 批号:221238221639)。油红 O 粉末购自美国 Sigma 公司, 植物血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (LOX-1), P-选择素 (P-selectin) 抗体购自 Abcam 公司, 小鼠 SV 超敏两步法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。

**1.2 动物分组与处理** 30 只新西兰大白兔, 单笼喂养, 常规饲料养 1 周后, 随机分为对照组 (10 只)、高脂组 (10 只)、单硝酸异山梨酯组 (10 只)。高脂组饲以高胆固醇饲料 (1.5% 胆固醇 + 5% 猪油的颗粒饲料), 单硝酸异山梨酯组饲以高胆固醇饲料加单硝酸异山梨酯 0.5 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, 对照组以常规普通饲料饲养。喂养时间为 8 周。分别在喂养第 4 周及第 8 周时, 每组各取 1 只动物, 取血管组织观察动脉硬化病变的情况, 当确认动脉硬化斑块形成后, 再进行研究。最终每组为 8 只动物。

**1.3 血脂测定** 兔喂养 8 周后, 应用 3% 戊巴比妥 1 mL · kg<sup>-1</sup> 麻醉, 从耳缘静脉采血约 3 mL, 留置于试管中, 以 1 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取血清储存于 -20 °C 冰箱中待用, 应用全自动生化分析仪进行血清总胆固醇 (TC) 及三酰甘油 (TG) 检测。

**1.4 组织学检测** 应用 3% 戊巴比妥 1 mL · kg<sup>-1</sup> 麻醉后, 取兔的腹主动脉, 经固定、包埋后连续切片。(1) 常规 HE 染色, 脱水, 甘油明胶封片; (2) 免疫组织化学检测: 兔腹主动脉石蜡切片经脱蜡和水化后, 进行免疫组织化学染色: 组织切片浸泡于 EDTA 抗原修复液 (98 °C) 15 min, 室温冷却, PBS 洗

3 次, 每次 5 min, 然后用 3% 的过氧化氢浸泡 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 山羊血清封闭 4 °C 过夜。分别加一抗, LOX-1 抗体 (1:100), P-selectin 抗体 (1:150) 4 °C 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 分别滴加酶标二抗, 37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色 3 ~ 5 min, 然后用苏木素复染。常规脱水, 甘油明胶封片。

**1.5 统计学方法** 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 多组之间比较采用方差分析, 组间比较采用 LSD 法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 三组之间的血脂情况** 高脂组与单硝酸异山梨酯组的 TC 及 TG 明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 而高脂组与单硝酸异山梨酯组的 TC 及 TG 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组血脂情况比较 / (mmol · L<sup>-1</sup>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	兔数/只	TC	TG
对照组	8	0.82 ± 0.26	1.02 ± 0.30
高脂组	8	28.29 ± 3.14	3.05 ± 0.50
单硝酸异山梨酯组	8	29.72 ± 2.41	3.22 ± 0.37
F 值		404.41	73.85
P 值		<0.001	<0.001

**2.2 单硝酸异山梨酯对动脉硬化的影响** 高脂组及单硝酸异山梨酯组均有动脉硬化斑块形成, 高脂组的斑块内膜及中膜明显增厚, 而单硝酸异山梨酯组动脉内膜亦有不同程度的增厚, 但斑块的程度较高脂组减轻。对照组显示内皮细胞完整, 内膜、中膜及外膜层次清楚、完整, 见图 1。

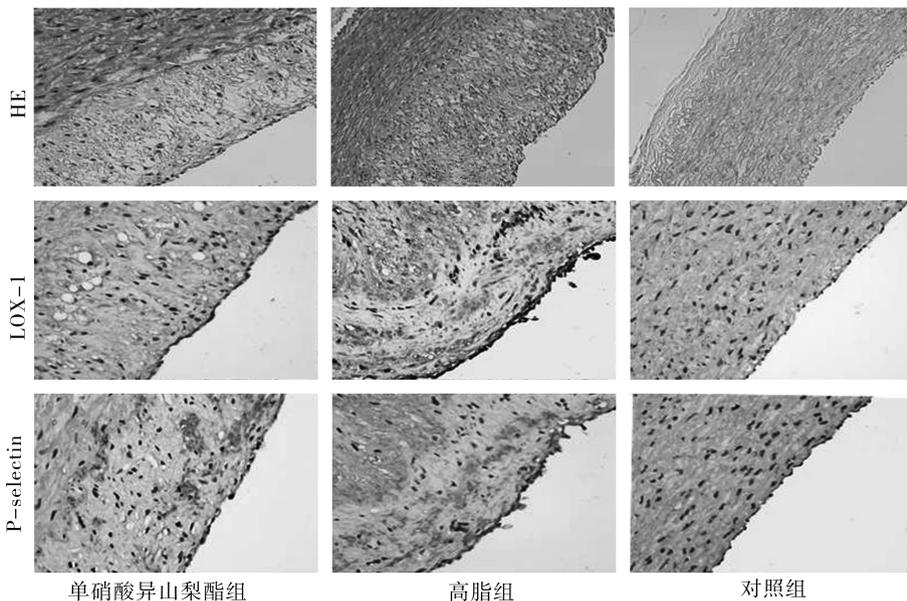


图 1 三组兔腹主动脉 HE 染色及 LOX-1、P-selectin 的免疫组化染色图 (×40)

**2.3 单硝酸异山梨酯对 LOX-1 蛋白的影响** 免疫组化检测了 LOX-1 蛋白表达情况,结果发现高脂组在动脉硬化斑块的内膜及中膜中均有 LOX-1 蛋白表达,其中在内膜上表达明显,分布在内皮细胞上。经过单硝酸异山梨酯治疗后,LOX-1 蛋白表达有明显的减少。高脂组( $32.98\% \pm 2.48\%$ )与单硝酸异山梨酯组( $15.04\% \pm 2.02\%$ )的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2,图 1。

**2.4 单硝酸异山梨酯对 P-selectin 蛋白的影响** 免疫组化的结果显示 P-selectin 主要表达在动脉硬化斑块的内膜,中膜亦有散在的分布,呈团簇样分布,高脂组的表达( $30.42\% \pm 3.27\%$ )明显增强,而单硝酸异山梨酯治疗组( $17.62\% \pm 1.89\%$ )则相对减弱。高脂组与单硝酸异山梨酯组的表达相比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2,图 1。

表 2 各组 LOX-1 及 P-selectin 的比较/(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	兔数/只	LOX-1	P-selectin
对照组	8	$0.99 \pm 0.74$	$0.72 \pm 0.43$
高脂组	8	$32.98 \pm 2.48$	$30.42 \pm 3.27$
单硝酸异山梨酯组	8	$15.04 \pm 2.02$	$17.62 \pm 1.89$
F 值		572.38	367.28
P 值		0.001	0.001

### 3 讨论

动脉粥样硬化是冠心病心绞痛及心肌梗死的主要病因,也是脑血管病的基础。目前的研究发现影响动脉硬化的各种因素包括高血压、高半胱氨酸血症、肥胖、高血脂及高糖血症及肾素血管紧张素系统的激活等,均可促进血管内皮细胞产生黏附分子及炎症因子,促进动脉硬化斑块的形成,并导致斑块的破裂,导致急性的心脑血管病事件<sup>[4-14]</sup>。在动脉硬化疾病进展中,LOX-1 及黏附分子起着重要作用。LOX-1 可诱导黏附分子的产生,导致内皮细胞功能的加重及斑块的进展,LOX-1 与斑块的不稳定性亦有密切关系<sup>[15-16]</sup>。临床研究还发现 LOX-1 与冠心病病人的冠脉病变有一定关系,尤其是血清中可溶性的 LOX-1 与左前降支近端及中端斑块的病变密切相关<sup>[17]</sup>。P-selectin 可促进单核细胞迁移,与炎症反应、动脉粥样斑块的发展密切相关。国外研究发现,敲除 P-selectin 基因的 ApoE 基因的小鼠,动脉粥样硬化斑块的进展明显延缓<sup>[18]</sup>。

硝酸酯类药物广泛用于临床治疗心绞痛、心力衰竭及心肌梗死等疾病,它通过扩张外周血管、降低心脏前后负荷,同时扩张冠状动脉及减少心肌耗氧而发挥作用。硝酸酯类药物是缓解心绞痛使用

最普遍的药物之一,然而有研究发现,应用硝酸酯类,对改善内皮功能有良好的效果<sup>[3]</sup>,但是长期大剂量的应用硝酸酯类药物会导致其扩张血管作用减弱甚至消失,有一定的争议。有学者研究发现长期应用硝酸酯类改善了内皮细胞的功能,改善了动脉硬化的病理过程<sup>[3,19]</sup>。Müller 等<sup>[3]</sup>首先通过高脂饲养建立动脉硬化模型,应用单硝基异山梨醇酯治疗,结果发现单硝基异山梨醇酯抑制了氧自由基的产生,改善了内皮功能,抑制了动脉硬化的进展。而有学者的研究发现长期应用硝酸酯类药物,产生了药物耐受性,增加了氧自由基的产生,从而对血管内皮功能有潜在的不利影响<sup>[1-2]</sup>。Thomas 等<sup>[2]</sup>对 19 名健康受试者进行了随机双盲对照研究,随机分为两组,一组应用 7 d 单硝酸异山梨酯( $120 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ),另一组应用 7 d 安慰剂,结果发现用药组的乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张功能明显减弱,提示硝酸酯类药物应用 7 d 诱导了内皮细胞依赖性舒张功能不全。Sekiya 等<sup>[20]</sup>对 42 例冠心病病人应用单硝酸异山梨酯( $40 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ )治疗 3 个月后的内皮细胞功能及动脉硬化的情况进行了观察,与 12 例健康人比较,应用多普勒技术检测前臂血流介导的血管舒张功能(FMD)的变化结果发现,FMD 在单硝酸异山梨酯组明显降低,提示单硝酸异山梨酯的长期应用似乎损害了内皮依赖的血管舒张功能。

本研究发现,经单硝酸异山梨酯治疗可明显抑制了 LOX-1 蛋白的表达,同时单硝酸异山梨酯治疗能明显降低 P-selectin 蛋白的表达,表明单硝酸异山梨酯治疗能够通过抑制 LOX-1 蛋白及 P-selectin 蛋白的表达而具有保护血管内皮细胞功能及抑制动脉硬化的作用。本研究显示,单硝酸异山梨酯改善了内皮功能,抑制了动脉粥样硬化进展的作用。

综上所述,本研究发现单硝酸异山梨酯对内皮细胞有保护作用,可抑制动脉硬化的进展,这对临床指导治疗具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] RASSAF T, KELM M. Isosorbide-5-mononitrate and endothelial function: a wolf in sheep's clothing [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(41): 3173-3174.
- [2] THOMAS GR, DIFABIO JM, GORI T, et al. Once daily therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction in humans: evidence of a free-radical-mediated mechanism [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(12): 1289-1295.
- [3] MÜLLER S, KÖNIG I, MEYER W, et al. Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(3): 624-631.