

# 普伐他汀对家兔动脉粥样硬化纤溶酶原激活物抑制物-1 基因表达的影响

陈良华 陆国平 吴春芳 龚兰生

**【摘要】** 目的 研究普伐他汀对家兔动脉粥样硬化纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)基因表达的影响。方法 27 只家兔分为正常对照组、胆固醇喂养组、普伐他汀组,饲养 12 周时处死。取靠近升主动脉起始部的动脉做常规病理切片,取近端胸主动脉抽提总 RNA,应用逆转录多聚酶链式反应测定 PAI-1 mRNA 的表达。结果 普伐他汀显著降低血浆总胆固醇水平,抑制动脉粥样硬化的形成。而 3 组动脉壁 PAI-1 mRNA 的相对值分别为  $0.510 \pm 0.075$ 、 $1.321 \pm 0.056$ 、 $0.675 \pm 0.040$ , 相互间有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。结论 普伐他汀能抑制动脉粥样硬化时 PAI-1 基因的过度表达,这种作用可能是降低胆固醇效益的机制之一。

**【关键词】** 普伐他汀; 动脉粥样硬化; 纤溶酶原激活物抑制物 1

**Effect of pravastatin on arterial gene expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in atherosclerotic rabbits** CHEN Lianghua\*, LU Guoping, WU Chunfang, et al. \*Department of Cardiology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China

**【Abstract】 Objective** To examine the effect of pravastatin on arterial gene expression of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in atherosclerotic rabbits. **Methods** Twenty seven rabbits were divided into 3 groups, i. e., control, cholesterol diet, and pravastatin group, which were fed for 12 weeks. A segment of ascending aorta (0.5 cm) was obtained for pathologic morphology study, and another one from thoracic aorta (1 cm) for the measurement of PAI-1 mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Pravastatin could remarkably lower plasma total cholesterol and inhibit the formation of atherosclerosis. The relative values of arterial PAI-1 mRNA in 3 groups were  $0.510 \pm 0.075$ ,  $1.321 \pm 0.056$ ,  $0.675 \pm 0.040$ , respectively, with significant difference among them ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Pravastatin can inhibit excessive expression of arterial PAI-1 gene in atherosclerosis and this action may be one of the important mechanisms involved in cholesterol lowering effect.

**【Key words】** Pravastatin; Atherosclerosis; Plasminogen activator inhibitor 1

纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)是纤溶系统主要的抑制因素,其水平的增高必然导致纤维蛋白在体内沉积,尤其在血管壁内。后者可刺激血管平滑肌细胞增生并与低密度脂蛋白(LDL)特别是脂蛋白(a)  $Lp(a)$  结合而促进动脉粥样硬化(AS)斑块形成和发展,因而血浆 PAI-1 水平的升高认为是冠心病的危险因素<sup>[1]</sup>。有研究表明,动物及人 AS 性斑块中 PAI-1 基因表达明显增加<sup>[2-4]</sup>。吉非罗齐能改善血脂紊乱,降低升高的 PAI-1 水平从而减小冠脉事件的危险<sup>[5]</sup>。但调脂药对局部尤其 AS 斑块中 PAI-1 基因表达是否有影响尚未见报道。本研究通过家兔 AS 模型观察普伐他汀是否具有降低 AS 斑块中 PAI-1 基因过度表达的作用。

## 材料与方法

### 一、材料

新西兰纯种雄性大白兔由上海陈行实验用兔繁殖饲养场提供;胆固醇由上海生物化学试剂总公司提供;普伐他汀购自中美上海施贵宝制药有限公司;TRIzol RNA 抽提试剂由 GIBCO<sub>BRL</sub> 提供;PAI-1 活性测定试剂购自上海实业一医大生物技术有限公司;各种 RT-PCR 试剂购自华美生物技术公司。PAI-1 引物根据文献[6]的 cDNA 序列合成,上游:5' ATGGAATTCCTGGAACAAGAATGAGATCAG 3',下游:5' TGAGCCATCATGGGCACAGAG 3',扩增片段大约 360 bp;β-actin 引物由中科院上海细胞生物研究所提供,上游:5' ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTG 3',下游:5' CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC 3',扩增片段 828 bp。

## 二、方法

1. 实验分组 27 只白兔分为 3 组 :正常对照组 (7 只) 普通饲料喂养 ;胆固醇喂养组 (10 只) ,高脂高胆固醇饲养 (胆固醇用量每只 1 g/d ,猪油为每只 10 g/d ,拌于普通饲料中) ;普伐他汀组 (10 只) ,高脂高胆固醇饲养加普伐他汀 (每只 10 mg/d)。

2. 血浆总胆固醇及 PAI-1 活性测定 :于高脂饲养前、饲养 6 周、12 周时抽取血标本 ,分离血浆 ,用胆固醇氧化酶法测定血浆总胆固醇浓度 ,用发色底物法测定血浆 PAI-1 活性。

3. 病理形态学检查 :12 周时处死动物 ,选取靠近升主动脉根部约 0.5 cm 左右的动脉段 ,置于 10% 中性福尔马林溶液中浸泡固定 ,常规酒精脱水 ,石蜡包埋 ,制成 6 μm 厚连续切片 ,光镜下观察形态学变化 ,计算平均最大脂纹厚度。

4. 胸主动脉总 RNA 抽提及 RT-PCR 反应 :动物处死后选取靠近升主动脉起始处的胸主动脉约 1 cm ,迅速液氮冷冻并置于液氮罐中保存备用。将其迅速剪碎后加 1 ml TRIzol 试剂 ,置于组织匀浆器中匀浆 ,抽提总 RNA ,采用紫外分光光度计测定其浓度。取 2 μg 总 RNA 进行 RT 反应 ,RT 体系 20 μl 含 2 μg 总 RNA、随机引物 100 ng、RNAsin 40U、M-MLV 逆转录酶 200U、NTP 1 mmol ,每一标本取 RT 产物各 5 μl 进行 PAI-1 与 β-actin 的 PCR 反应。PCR 反应体系含相应上、下游引物 30 pmol、Taq 酶 2U。PAI-1 PCR 反应条件 :94℃、15s , 54℃、30 s , 72℃、30 s , 29 个循环。β-actin PCR 反应条件 :94℃、30 s , 54℃、1 min , 72℃、1 min。首次循环均 94℃、3 min ,结束前 72℃、10 min。各取 PCR 产物 10 μl 经 2% 琼脂糖凝胶电泳 ,溴化乙锭染色、照相并经光密度仪扫描分析 ,以 β-actin 光密度值进行标准校正 ,计算 PAI-1 产物的相对量。计算公式 :PAI-1 相对量 = PAI-1 产物电泳条带密度/β-actin 产物电泳条带密度。

## 三、统计学处理方法

所有指标用均数 ± 标准差表示 ,多组间差异比

较用方差分析 ,两组之比较用 Student-Newman-Keuls 检验 ,以  $P < 0.05$  差异有显著性。

## 结 果

1. 血浆总胆固醇浓度及体重变化 :从表 1 中可见 ,新西兰家兔喂饲胆固醇 6 周后 ,血浆总胆固醇水平显著升高 ,12 周时增高更为明显 ,而普伐他汀则明显降低升高的血浆总胆固醇水平。3 组家兔处死前 ,体重均显著增加 ,但组间无统计学差异。

2. 血浆 PAI-1 活性的改变 :表 2 显示 3 组在 0 周、6 周及 12 周时血浆 PAI-1 活性的变化。胆固醇喂养组在 6 周时即可见 PAI-1 活性升高 ( $P < 0.05$ ) ,12 周时尤为明显 ( $P < 0.01$ ) ,而普伐他汀则可显著降低 PAI-1 活性 ,即从 14.0 AU/ml 降至 8.6 AU/ml。

3. 病理形态学改变 :肉眼观察可见胆固醇喂养组主动脉管壁有大量黄色脂样物向管腔凸出 ,从升主动脉起始部到胸主动脉远端脂纹逐渐减轻 ,普伐他汀组脂纹数量明显减少。光镜下胆固醇喂养组动脉管腔不规则 ,内膜明显增厚 ,管壁弥漫性隆起 ,内含大量泡沫细胞 ,几乎覆盖整个管腔 ,中膜平滑肌细胞增生明显。普伐他汀组动脉病变较胆固醇喂养组明显减轻 ,虽与正常对照组相比管腔扩大 ,中层平滑肌细胞有所增生 ,但内膜增厚不明显 ,呈局限性隆起 ,泡沫细胞数量减少。平均最大脂纹厚度 (以占整个血管壁厚度的百分数表示) 3 组分别为  $0$ 、 $(50 \pm 10)\%$ 、 $(15 \pm 8)\%$  ,相互间比较差异有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ ) 表明普伐他汀组能抑制 AS 斑块的形成。

4. 动脉壁 PAI-1 mRNA 表达改变 :所有 PAI-1 及 β-actin 的扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 ,所示条带分别为大约 360bp 和 828bp ,符合设计的片段大小 (图 1) 。3 组动脉壁 PAI-1mRNA/β-actin mRNA 比值分别为  $0.510 \pm 0.075$ 、 $1.321 \pm 0.056$ 、 $0.675 \pm 0.040$  ,相互间有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) ,表明动脉粥样硬化血管局部 PAI-1 过度表达 ,而普伐他汀能抑制这种过度表达。

表 1 血浆总胆固醇浓度及体重变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

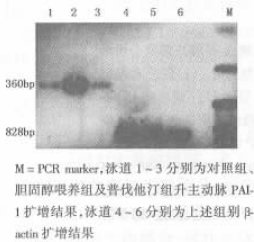
组别	n	血浆总胆固醇浓度 (mmol/L)			体重 (kg)	
		0 周	6 周	12 周	开始	结束
正常对照组	7	1.26 ± 0.36	1.02 ± 0.19	1.05 ± 0.15	2.4 ± 0.3	3.2 ± 0.4
胆固醇喂养组	10	1.20 ± 0.32	11.84 ± 0.93*	26.40 ± 1.20*	2.7 ± 0.6	3.4 ± 0.1
普伐他汀组	10	1.17 ± 0.33	4.62 ± 0.51*△	11.31 ± 0.90*△	2.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2

注 :与 0 周时比较 , \*  $P < 0.01$  ;与胆固醇喂养组比较 , △  $P < 0.01$

表 2 血浆 PAI-1 活性变化(AU/ml  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	0 周	6 周	12 周
正常对照组	7	5.6±2.0	6.8±1.4	4.8±2.2
胆固醇喂养组	10	4.9±3.0	7.7±1.1*	14.0±2.5**
普伐他汀组	10	5.4±2.0	6.9±2.5	8.6±2.0* <sup>△</sup>

注:与 0 周时比较, \* P<0.05; \*\* P<0.01;与胆固醇喂养组比较,<sup>△</sup>P<0.01



M = PCR marker,泳道 1~3 分别为对照组、胆固醇喂养组及普伐他汀组升主动脉 PAI-1 扩增结果,泳道 4~6 分别为上述组别  $\beta$ -actin 扩增结果

图 1 普伐他汀对家兔动脉粥样硬化 PAI-1 表达的影响

### 讨 论

尽管降低胆固醇在冠心病的一级预防及二级预防中均已取得了肯定的效果,但其机制尚不十分清楚。冠状动脉造影发现冠状动脉粥样硬化的消退程度很小,因而降低胆固醇的效益并不能仅以粥样硬化性病变的消退来解释,必然存在其他的机制。其中改善内皮功能不全可能是一个重要机制<sup>[7]</sup>。

近年来的许多研究表明 AS 斑块中 PAI-1 mRNA 表达增强,且与 AS 的严重程度正相关,而组织型纤溶酶原激活物(TPA) mRNA 表达降低,玻璃体连接蛋白(vitronectin) mRNA 表达亦增加,后者与 PAI-1 相结合,增强 PAI-1 的稳定性,即加强 PAI-1 的生物作用。因而粥样硬化性血管局部纤溶活性减弱,抗纤溶活性增强,使纤维蛋白易于沉积,促进了 AS 的发展<sup>[2,4]</sup>。PAI-1 与 AS 确实存在某种发病学上的关联。吉非罗齐改善冠心病患者预后的同时能降低血中 PAI-1 升高的水平<sup>[5]</sup>,提示 PAI-1 水平的降低可能是调脂药物防治冠心病的作用机制之一。实际上,有学者也将血管壁 PAI-1 表达增加作为内皮功能不全的一个表现<sup>[8]</sup>。

本研究表明,新西兰白兔喂食胆固醇 3 个月后可见血浆 PAI-1 活性明显升高,主动脉 PAI-1 mRNA 表达增强。Sava 等<sup>[2]</sup>发现新西兰白兔喂养胆固醇(2%) 8 周后血浆 PAI-1 活性增高 2 倍,通过 Northern

blot 的方法证实主动脉 PAI-1 mRNA 表达增加,与我们的研究结果基本相符。我们还发现应用普伐他汀治疗则可降低血浆 PAI-1 活性并减少血管壁 PAI-1 mRNA 的过度表达。Sava 等<sup>[2]</sup>认为这种血浆 PAI-1 活性的增高可能来源于肝实质细胞及肝内皮细胞。实际上,我们也观察到普伐他汀能抑制肝脏 PAI-1 基因的过度表达。而血管壁中 PAI-1 mRNA 表达增强主要作用于局部,促进 AS 的发展及血栓形成。

AS 时局部血管壁 PAI-1 mRNA 表达增加的机制,目前尚不清楚。体外研究发现很多因素都能刺激血管壁细胞(主要是内皮细胞及平滑肌细胞)PAI-1 的分泌。其中主要有 LDL、VLDL、Lp(a)、转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ )、肿瘤坏死因子、血小板源性生长因子、白细胞介素-1 与血管紧张素 II 等<sup>[9]</sup>,在体内哪一个占主导地位尚未明了。我们曾在体外观察到普伐他汀在不改变培养基质的情况下并无直接抑制肝细胞分泌 PAI-1 的作用<sup>[10]</sup>,但对血管内皮细胞及平滑肌细胞的相关研究有待证实。

本研究结果表明,普伐他汀在降低升高的血浆总胆固醇水平的同时能使血浆 PAI-1 活性减低并抑制 AS 时动脉壁局部 PAI-1 基因的过度表达,这种作用可能与降低冠心病患者血浆获得临床效益有关。

### 参 考 文 献

- Juhan-Vague I, Alessi MC. Plasminogen activator inhibitor and atherosclerosis. *Thromb Hemost*, 1993, 70: 138-143.
- Sava H, Sobel BE, Fujii S. Potentiation by hypercholesterolemia of the induction of aortic intramural synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by endothelial injury. *Circ Res*, 1993, 73: 671-680.
- Robbie LA, Booth NA, Brown PAJ, et al. Inhibitors of fibrinolysis are elevated in atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16: 539-545.
- Chomiki N, Henry M, Alessi MC, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 expression in human liver and healthy or atherosclerotic vessel walls. *Thromb Haemostas*, 1994, 72: 44-53.
- Andersen P, Smith P, Seljeflot I, et al. Effects of gemfibrozil on lipids and haemostasis after myocardial infarction. *Thromb Haemostas*, 1990, 63: 174-177.
- Rea TJ, DeMattos RB, Pape ME. Hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in rabbits. *J Lipid Res*, 1993, 34: 1901-1910.
- 陈良华. 降低胆固醇在冠心病防治中的作用. *国外医学内科学分册*, 1997, 24: 291-294.
- Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC. Deficient t-PA release and elevated PAI inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*, 1987, 57: 67-72.
- 陈良华, 陆国平. 纤溶酶原激活物抑制物-1 与动脉粥样硬化. *心血管病学进展*, 1999, 20: 23-26.
- 陈良华, 龚兰生, 陆国平, 等. 普伐他汀对 HepG2 细胞纤溶酶原激活物抑制物-1 分泌的影响. *中国循环杂志*, 1999, 14: 158-160.

(收稿日期: 1999-09-29)

(本文编辑: 宁田海)