

阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔模型 TLR4 和 COX-2 协同表达的影响

李茂清, 徐碧红, 彭志勇, 钟俊杰, 许梓荣

基金项目: 广东省中医药局科研课题(编号:20151114)

作者单位: 514000 广东,梅州市残联康复医院康复科(李茂清,彭志勇,钟俊杰,许梓荣); 529000 广东,江门市五邑中医院质控科(徐碧红)

作者简介: 李茂清(1978-),男,医学博士,副主任中医师,研究方向:慢性疾病的基础与临床。E-mail:329473003@qq.com

[摘要] **目的** 观察 Toll 样受体 4、环氧化酶 II 在兔动脉粥样硬化模型中的表达水平,探讨两者在动脉粥样硬化下协同表达情况和阿托伐他汀治疗对表达的影响。**方法** 将 36 只体质量范围在 1.8~2.4 kg 的 3 月龄健康雄性新西兰实验兔随机分为对照组、模型组、治疗组三组,每组 12 只。予高脂饲料对模型组和治疗组两组造模 8 周,治疗组在造模后以阿托伐他汀 2 mg/(kg·d)干预 8 周。监测实验进程各组 0 周、8 周、16 周外周血脂水平变化,对比各组 16 周冠状动脉组织切片、Toll 样受体 4 和环氧化酶 II mRNA 表达、不良事件发生等情况。**结果** 与对照组比较,模型组血总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平升高,Toll 样受体 4 和环氧化酶 II 表达增强(P 均 <0.01);治疗组经阿托伐他汀治疗后,血液中总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平下降和高密度脂蛋白胆固醇水平上升(P 均 <0.05),Toll 样受体 4、环氧化酶 II 表达下调(P 均 <0.01);经对模型组和治疗组动脉粥样硬化组织光镜检查结果进行分级,动脉粥样硬化模型组最严重,治疗组其次,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 动脉粥样硬化中 Toll 样受体 4、环氧化酶 II 表达协同升高可能是其发病机制之一,阿托伐他汀可有效降低两项指标在模型体内表达水平。

[关键词] 动脉粥样硬化; Toll 样受体 4; 环氧化酶 II; 阿托伐他汀

[中图分类号] R 54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)01-0005-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.01.02

Effects of atorvastatin on the expressions of TLR4 and COX-2 in atherosclerotic rabbits LI Mao-qing, XU Bi-hong, PENG Zhi-yong, et al. Department of Rehabilitation, Rehabilitation Hospital of Meizhou City, Guangdong 514000, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression levels of Toll-like receptors 4(TLR4) and cyclooxygenase-2(Cox-2) in atherosclerotic rabbits and to explore the effects of atorvastatin on the expressions of TLR4 and COX-2. **Methods** A total of 36 New Zealand white rabbits (1.8~2.4 kg) were randomly divided into the normal group($n=12$), the model group($n=12$) and the treatment group($n=12$). Except for the normal group, the other groups were fed with high-fat diet for 8 weeks to establish the atherosclerotic model. After the model was successfully established, the treatment group was fed with atorvastatin 2 mg/(kg·d) for 8 weeks. The levels of peripheral blood lipid were monitored at the time points of 0, 8 and 16 weeks after the treatment. The expressions of TLR4 and COX-2 and the adverse events were compared among the three groups 16 weeks after the treatment. **Results** Compared with those in the control group, the levels of serum TC, TG and LDL, and the expressions of TLR4 and COX-2 were significantly elevated in the model group($P<0.01$). After the treatment of atorvastatin, the levels of serum TC, TG and LDL were decreased and the HDL level was increased($P<0.05$), and the expressions of TLR4 and COX-2 were reduced significantly in the treatment group($P<0.01$). The grading of atherosclerosis under light microscopy was the most severe in the model group, followed by the treatment group, with significant differences between the two groups and the control group($P<0.01$). **Conclusion** The co-expression of TLR4 and COX-2 may play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Atorvastatin can effectively reduce the expression levels of TLR4 and COX-2 of atherosclerosis in the rabbit model.

[Key words] Atherosclerosis; Toll-like receptor 4; Cyclooxygenase II; Atorvastatin

动脉粥样硬化是动脉壁的一种慢性炎症性疾病^[1],炎症状态可导致血管壁细胞改变和斑块的形成,在动脉粥样硬化的发展中有重要作用。研究证实,在脑卒中的发生发展过程中,动脉斑块、管腔狭窄、血脂和血流变学异常起着重要作用^[2]。Ferronato 等^[3]研究报告提出,中风患者外周血中环氧化酶 II (cyclooxygenase-2, COX-2) 和 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors4, TLR4) 协同表达升高,并且 TLR4 表达出现升高趋势的时点早于 COX-2,这提示了中风后继发性周围炎症进程中,TLR4 对机体炎症影响的机制可能依赖于 COX-2 信号转导途径的参与和表达。动脉粥样硬化进程中是否存在 COX-2 和 TLR4 两指标的协同表达,并与病情的严重程度是否相关尚未明确。2015-10~2016-03 期间我们通过动物实验观察兔动脉粥样硬化模型中 TLR4、COX-2 的表达水平,探讨阿托伐他汀治疗对两者的影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 3 月龄新西兰兔(购于长沙天力生物技术有限公司)36 只,体质量为 1.8~2.4 kg。适应性喂养 1 周后,采取随机数字表法均分为对照组、模型组、阿托伐他汀干预组三组,每组 12 只。对照组以普通颗粒饲料定量喂养,其余二组以高脂饲料定量喂养。

1.2 主要试剂和仪器 Trizol、RT-PCR 试剂盒使用美国 Invitrogen 公司产品,PCR 引物根据资料(Gene ID:100009497^[4]、Gene ID:808233^[5])所公布的 TLR4、COX-2 基因序列采用 Primer 5.0 进行引物设计,TLR4 引物序列上游为 5'-GCCTTCTAATGGACTTTCTGCC-3',下游为 5'-AGGCAAAGAGATGAAGTAGGGA-3';COX-2 引物序列上游为 5'-AAGTTGCAGGATTGGGGGAG-3',下游为 5'-CCAGGTCGTTTGACAACCTGC-3';内参照 GAPDH 上游为 5'-AATGGGCAGCCGTAGGAAA-3',下游为 5'-GCGCCCAATACGACCAAA-TC-3'。反应条件:预变性 94 ℃,2 min;变性 94 ℃,30 s;退火:TLR4 52 ℃,COX-2 58 ℃,β-actin 62 ℃;延伸:72 ℃ 1 min,35 个循环。ABI PRISM 7500 型荧光定量 PCR 仪分析产物。

1.3 兔动脉粥样硬化模型实验方案 参照文献^[6,7]以高脂饲料定量喂养进行兔动脉粥样硬化模型造模,高脂饲料组成为 78% 普通饲料 + 2% 胆固醇 + 5% 猪油 + 15% 蛋黄粉,另外在连续造模开始的第 1~9 天每天加用维生素 D 31 g,共造模 8 周。对比造模前后血清总胆固醇(TC)、三酸甘油酯(TG),两指标增幅均大于原造模时点前水平 10 倍以上视为造

模成功。治疗组在造模后予阿托伐他汀 2 mg/(kg·d)(北京嘉林药业股份有限公司,国药准字 H200938-19),按照体表面积法进行转换,剂量为 30 mg/kg,每天灌胃给药 1 次,连续 8 周。监测实验进程各组 0 周、8 周、16 周外周血 TLR4、COX-2 表达情况,对比各组 16 周冠状动脉组织切片情况,记录不良事件发生情况。

1.4 观察指标与检测方法

1.4.1 常规生化指标检测 采用 20% 氨基甲酸乙酯(5 ml/kg)通过耳缘静脉注射麻醉新西兰兔,做颈总动脉插管,采血 3 ml 在 4 ℃ 放置 24 h,室温下 3 000 r/min 离心 10 min, -80 ℃ 保存备用。抽血时点为造模时点前、造模 8 周、给药 8 周(相当于造模 16 周),抽血范围为全部实验个体。采用日本日立株式会社 7170 型全自动生化分析仪测定新西兰兔的血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。

1.4.2 组织病理切片分析及组织 Toll 样受体 4、环氧化酶 II 表达检测 给药结束后处死动物,开胸完整暴露心脏,分离出冠状动脉,剥净动脉外膜的周围脂肪和结缔组织,部分样品常规石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)染色。光镜检查以评估纤维帽完整性,斑块内出血,钙沉积,炎症浸润,新生血管脂质核心和腔内血栓情况。按照文献^[8]方法从组织切片样本中提取总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,SYBR Green 荧光染色,在 PCR 分析仪上进行拍照和记录,利用电泳条带灰度值进行分析。

1.4.3 颈动脉粥样硬化严重程度分型 参考相关文献^[9],自拟颈动脉粥样硬化严重程度标准。正常:内膜无增厚,颈动脉内中膜的厚度 < 0.3 mm;Ⅰ级:内膜局限性增厚,但内中膜的厚度 ≤ 0.5 mm;Ⅱ级:动脉硬化斑块形成,但未造成明显狭窄;Ⅲ级:20% ≤ 管腔狭窄 < 50%;Ⅳ级:50% ≤ 管腔狭窄 ≤ 99%;Ⅴ级:血管完全闭塞。

1.5 不良事件等级记录 主要记录胃肠道功能紊乱等级程度及动物死亡事件。评级标准:Ⅰ级,目前进食量为原进食定量的 90%~75%;Ⅱ级,目前进食量为原进食定量的 75%~50%;Ⅲ级,目前进食量为原进食定量的 50%~25%;Ⅳ级,目前进食量为原进食定量的 25%~0%;Ⅴ级,动物死亡。

1.6 统计学方法 应用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因

素方差分析,两两比较采用 q 检验;多组多时点资料比较采用重复测量数据两因素多水平方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组新西兰兔实验过程中血脂水平变化比较
对照组在实验过程 0 周、8 周、16 周中血脂监测指标呈低水平波动。模型组在造模 8 周后,血脂指标 TC、TG、LDL 出现上升趋势($P < 0.01$),16 周复查指标水平呈现波动下降趋势($P > 0.05$),表现符合模

型造模后特殊病理变化和停止造模后动物模型自身修复平衡不足以影响实验结果判断的特征。治疗组造模 8 周变化与模型组基本一致,后期经阿托伐他汀治疗干预 8 周后 TC、TG、LDL 出现下降趋势($P < 0.01$),HDL 出现上升趋势($P < 0.01$)。治疗组与模型组 16 周时点 TC、TG、LDL 比较下降显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),HDL 升高明显($P < 0.05$)。三组三时点重复测量方差分析结果显示,组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 三组新西兰兔实验过程中血脂水平变化比较[$(\bar{x} \pm s)$,mmol/L]

组 别	例数	时点	TC	TG	LDL	HDL
对照组	12	0 周	1.99 ± 0.30	0.74 ± 0.18	0.93 ± 0.40	1.30 ± 0.42
		8 周	2.13 ± 0.47	0.80 ± 0.15	1.27 ± 0.27	1.29 ± 0.40
		16 周	2.22 ± 0.43	0.73 ± 0.21	1.09 ± 0.23	1.31 ± 0.38
模型组	12	0 周	2.09 ± 0.29	0.73 ± 0.16	1.00 ± 0.27	1.32 ± 0.41
		8 周	36.08 ± 6.01 *	11.73 ± 1.85 *	19.70 ± 2.75 *	0.95 ± 0.34 *
		16 周	33.75 ± 4.99 *#	10.04 ± 3.56 *#	16.54 ± 2.36 *#	1.12 ± 0.36 Δ
治疗组	12	0 周	1.93 ± 0.44	0.79 ± 0.15	0.97 ± 0.31	1.29 ± 0.41
		8 周	40.28 ± 5.42 *	9.47 ± 2.72 *	17.25 ± 1.79 *	0.94 ± 0.33 *
		16 周	27.91 ± 3.71 *#	6.49 ± 2.00 *#	14.00 ± 1.46 *#	1.24 ± 0.35 Δ
$F_{\text{组别}}$		—	929.405	150.736	482.660	10.149
$F_{\text{时点}}$		—	429.900	134.094	799.484	9.525
$F_{\text{组别} \times \text{时点}}$		—	117.028	36.220	193.327	1.503
$P_{\text{组别}}$		—	0.000	0.000	0.000	0.000
$P_{\text{时点}}$		—	0.000	0.000	0.000	0.000
$P_{\text{组别} \times \text{时点}}$		—	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组同期比较,* $P < 0.01$;同组三个时点比较, $\Delta P < 0.05$,# $P < 0.01$

2.2 三组新西兰兔主动脉组织样本 TLR4、COX-2 表达情况比较
模型组 TLR4、COX-2 表达较对照组增强($P < 0.01$),而治疗组经阿托伐他汀干预 8 周(16 周)后,TLR4、COX-2 较模型组下调($P < 0.01$),但仍然高于对照组表达水平($P < 0.01$)。见表 2,图 1,2。

表 2 三组新西兰兔主动脉组织样本 TLR4、COX-2 表达情况比较[$(\bar{x} \pm s)$]

组 别	动物数	TLR4	COX-2
对照组	12	0.95 ± 0.013	0.62 ± 0.034
模型组	12	1.22 ± 0.030 *	0.98 ± 0.035 *
治疗组	12	1.05 ± 0.024 * Δ	0.85 ± 0.029 * Δ
F	—	635.934	229.908
P	—	0.000	0.000

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

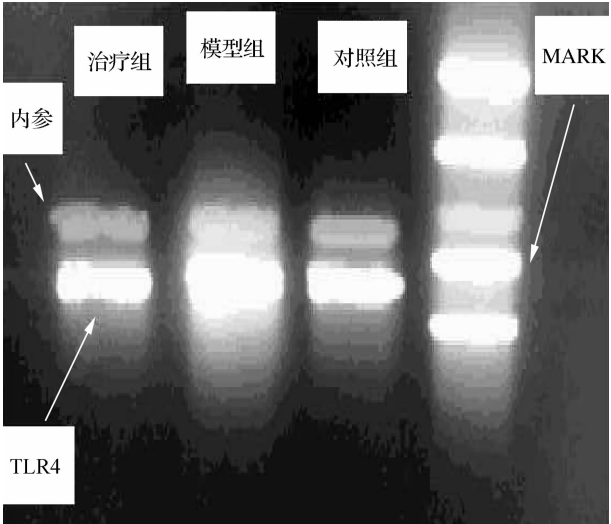


图 1 TLR4 指标 RT-PCR 检测结果图

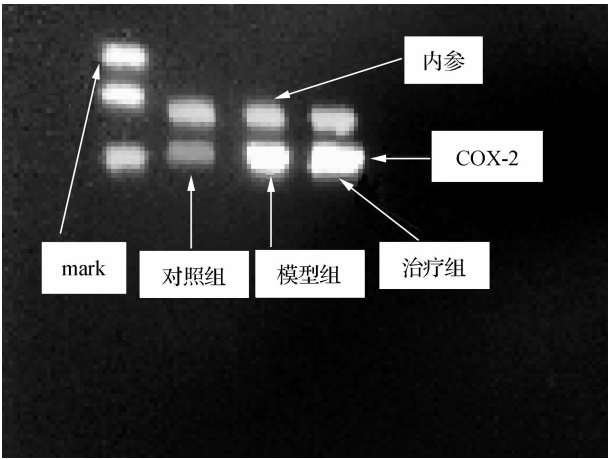


图2 COX-2 指标 RT-PCR 检测结果图

2.3 三组新西兰兔动脉粥样硬化严重程度分级结果比较 参照文献^[8]将模型组和治疗组动脉粥样硬化组织光镜检查结果进行分级,动脉粥样硬化模型组最严重,治疗组其次,与对照组比较,经非参数H检验差异有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

表3 三组新西兰兔动脉粥样硬化严重程度分级结果比较(n)

组别	动物数	正常	I级	II级	III级	IV级	V级
模型组	12	0	1	1	2	6	2
治疗组	12	0	6	4	1	1	0
对照组	12	12	0	0	0	0	0

注: $H=29.156,P=0.000$

2.4 药物不良反应 治疗组动物均出现不同程度的胃肠功能紊乱和食欲减退症状,未出现药物严重不良副作用或死亡现象。估计胃肠功能紊乱和食欲减退症状与药物的灌胃操作相关的可能性大。

3 讨论

3.1 尽管动脉粥样硬化的高危因素已得到了很大的控制,但其所导致的心血管疾病仍是导致死亡的主要原因之一^[10]。动脉粥样硬化病变病情的发展与多种基因/蛋白表达相关,其中COX-2和TLR4为目前研究的热点。COX-2作为一种诱导酶,在组织中并不常见,但它是体内合成前列腺素家族的导介物质。在机体受到感染、外伤等刺激下活化环氧合酶,使花生四烯酸大量转变为PGE2、PGF2 α 及血栓素等前列腺素,与动脉粥样硬化的形成有密切关系^[11,12]。TLR4广泛表达于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞、内皮细胞和上皮细胞等中,在非细菌性炎症疾病(如风湿性关节炎、糖尿病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、缺血/再灌注损伤及组织损伤和修复再生等)或病情进展过程中有重要参与作用。现有

研究证据提示,TLR4与动脉粥样硬化的炎症发展密切相关,例如TLR4 mRNA在动脉粥样硬化斑块组织中均有强烈表达^[13];在动脉粥样硬化时,CD36-TLR4-TLR6激活被认为是致动脉粥样硬化的脂质和淀粉刺激的无菌炎症的一个共同的分子机制^[14]。阿托伐他汀通过对HMG-CoA还原酶的抑制作用使血浆中和组织细胞内胆固醇浓度均降低,同时能抑制肝脂肪酶活性和抑制极低密度、低密度脂蛋白合成及激活脂蛋白脂肪酶的作用,减少脂质在血管内皮层的沉积,抑制血小板的活性和聚集,从而起到稳定斑块及缩小粥样斑块的作用^[15]。阿托伐他汀是否具有通过调节TLR4和COX-2的表达从而改善动脉粥样硬化病变情况的作用尚未明确。

3.2 本实验结果显示,(1)动脉粥样硬化兔模型造模成功,造模后动脉血管出现不同程度的粥样硬化病变,表现为光镜下粥样硬化特异性改变,血液血脂指标水平特征性变化,TLR4和COX表达协同上调。(2)TLR和COX-2在动脉粥样硬化病变中表达水平的高低与病变严重程度有一定关联性。(3)阿托伐他汀治疗可有效降低TLR4和COX-2在动脉粥样硬化病变中表达水平,同期血脂指标出现相应变化。

综上所述,兔动脉粥样硬化模型中病变动脉组织TLR4、COX-2表达协同升高,阿托伐他汀可有效降低指标表达水平,可能是其治疗机制之一。这为今后研究该药除了降脂之外,改善动脉粥样硬化病变提供了理论指标评判依据。

参考文献

1 顾丽萍,张小平.麝香保心丸对老年亚临床动脉粥样硬化患者外周血单核细胞环氧化酶2表达的影响[J].中国药物与临床,2015,15(3):354-355.

2 王华,黄玲,陈平,等.阿托伐他汀钙片与通心络胶囊联用对颈动脉内膜中层厚度及炎症标志物的影响[J].中国临床新医学,2011,4(12):1129-1131.

3 Ferronato S, Lira MG, Olivato S, et al. Upregulated expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood of ischaemic stroke patients correlates with cyclooxygenase 2 expression[J]. Eur J Vasc, 2011, 41(3): 358-363.

4 TLR4 toll-like receptor 4 [Oryctolagus cuniculus (rabbit)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100009497>.

5 COX2 cytochrome c oxidase subunit II [Oryctolagus cuniculus (rabbit)]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/808233>.

6 张璐.调脂通脉颗粒对动脉粥样硬化兔模型炎症因子表达影响的研究[D].北京中医药大学,2014.

7 葛金文,刘吉勇,朱惠斌,等.阿托伐他汀对动脉粥样硬化兔氧化应激炎症反应的影响[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(12):979-983.

8 李金明.实时荧光PCR技术[M].北京:人民军医出版社,2007:

74-76.

9 杜海萍. 颈动脉粥样硬化与冠状动脉病变严重程度的相关性研究 [D]. 山西医科大学, 2012.

10 李建军. 心血管病进展与 2011 回顾炎症与冠状动脉粥样硬化性疾病研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2012, 33 (1): 10-13.

11 黄彦生, 王丽霞, 王留义, 等. 阿托伐他汀对老年亚临床动脉粥样硬化患者单核细胞环氧化酶 2 活性的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15 (10): 1027-1029.

12 Marnane M, Prendeville S, McDonnell C, et al. Plaque inflammation and unstable morphology are associated with early stroke recurrence in symptomatic carotid stenosis [J]. Stroke, 2014, 45 (3): 801-806.

13 朱杰, 王中群, 王昭军, 等. 维生素 K2 对 Apo E 小鼠动脉粥样硬化内膜钙化和 Toll 样受体 2 及 4 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (3): 217-223.

14 Baldan A, Ferronato S, Olivato S, et al. Cyclooxygenase 2, toll-like receptor 4 and interleukin 1beta mRNA expression in atherosclerotic plaques of type 2 diabetic patients [J]. Inflamm Res, 2014, 63 (10): 851-858.

15 周佩洋, 高平, 王普清, 等. 不同剂量阿托伐他汀在症状性颅内动脉粥样硬化性狭窄中的影像学评估 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 24 (11): 1132-1136.

[收稿日期 2016-06-16] [本文编辑 刘京虹]

课题研究 · 论著

JAB1 在胆囊癌中的表达及临床病理意义

顾国建, 顾风华, 练玲芝

基金项目: 太仓市重点研发计划(社会发展)课题(编号:TC2015SFYL10)

作者单位: 215400 江苏, 苏州大学附属太仓市第一人民医院病理科

作者简介: 顾国建(1976-), 男, 大学本科, 学士学位, 副主任医师, 研究方向: 消化道肿瘤病理诊断。E-mail: zlhggj@163.com

通讯作者: 顾风华(1965-), 女, 大学本科, 学士学位, 副主任医师, 研究方向: 消化道肿瘤病理诊断。E-mail: gufenhua@yeah.net

【摘要】目的 研究 C-Jun 激活域结合蛋白 1 (C-Jun activation domain binding protein 1, JAB1) 在胆囊癌组织中的表达, 探讨其临床病理意义。方法 采用免疫组化方法检测 JAB1 在 65 例胆囊癌组织和 15 例慢性胆囊炎组织中的表达情况。结果 胆囊癌组织中 JAB1 蛋白阳性率为 60.0%, 显著高于慢性胆囊炎组织 (13.3%) ($P < 0.05$)。结论 JAB1 蛋白表达增高与胆囊癌发生、发展密切相关, 检测 JAB1 蛋白有助于胆囊癌的早期诊断及判断患者预后。

【关键词】胆囊癌; C-Jun 激活域结合蛋白 1; 免疫组织化学

【中图分类号】R 735.8 【文献标识码】A 【文章编号】1674-3806(2017)01-0009-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.01.03

The expression of JAB1 in gallbladder carcinoma and its clinical significance GU Guo-jian, GU Feng-hua, LIAN Ling-zhi. Department of Pathology, the First People's Hospital of Taicang Affiliated to Suzhou University, Jiangsu 215400, China

【Abstract】Objective To investigate the expression of C-Jun activation domain binding protein 1 (JAB1) in human gallbladder carcinoma (GA). Methods The expressions of JAB1 protein were detected in 65 cases with GA and in 15 cases with chronic cholecystitis by immunohistochemical method. Results The positive expression level of JAB1 in the pateints with GA (60.0%) was significantly higher than that in the pateints with chronic cholecystitis (13.3%) ($P < 0.05$). Conclusion Elevated expression of JAB1 is closely correlated with GA, and the detection of JAB1 may be helpful to evaluate the early diagnosis and prognosis of GA.

【Key words】Gallbladder carcinoma; C-Jun activation domain binding protein 1 (JAB1); Immunohistochemistry

胆囊癌是最常见的胆道肿瘤, 其早期诊断困难, 恶性程度高、预后差^[1]。目前, 胆囊癌治疗主要以手术为主, 化疗为辅, 但其复发率高, 易转移, 5 年生存率不足 10%^[2]。因其病情隐匿, 很多患者发现时