

· 论 著 ·

## 奥美沙坦酯对动脉粥样硬化大鼠骨保护素表达的影响\*

陈桂明<sup>1</sup>, 沈哲<sup>1</sup>, 李正章<sup>1</sup>, 孙业富<sup>2</sup>, 仇加高<sup>1</sup>, 罗富银<sup>1</sup>

(1. 苏州大学附属高邮医院/江苏省高邮市人民医院检验科, 江苏高邮 225600;

2. 扬州职业大学医学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:**目的 探讨奥美沙坦酯对动脉粥样硬化模型大鼠骨保护素、血清炎症因子表达的影响。方法 2015 年于江苏省血吸虫病防治研究所收集 24 只 SD 大鼠, 随机均分为 3 组。对照组大鼠饲喂普通饲料。模型组大鼠饲喂高脂饲料(普通饲料+0.2%胆酸钠+ $7 \times 10^5$  IU/(kg·d)维生素 D<sub>3</sub>+2%胆固醇+5%山羊脂肪)。奥美沙坦酯组大鼠饲喂高脂饲料的同时予 3 mg/(kg·d)奥美沙坦酯灌胃。饲养 4 周后观察各组大鼠主动脉病理形态学变化, 分别检测血清血脂(包括总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、三酰甘油)和血清超敏 C 反应蛋白水平, 免疫组织化学染色和蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测骨保护素在主动脉的表达。结果 模型组大鼠血清血脂和超敏 C 反应蛋白水平明显升高, 内膜厚度与内膜/中膜厚度比明显升高, 主动脉中骨保护素表达较对照组显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。奥美沙坦酯组与模型组相比, 血清高密度脂蛋白明显升高, 其他血清血脂和超敏 C 反应蛋白水平明显下降, 主动脉中骨保护素表达减少, 内膜厚度、内膜/中膜厚度比明显降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 奥美沙坦酯可能通过改善血脂、降低动脉骨保护素表达和血清炎症因子水平抑制动脉粥样硬化进展。

关键词: 奥美沙坦酯; 动脉粥样硬化; 骨保护素

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)17-2374-03

## Effect of olmesartan medoxomil on the expression of osteoprotegerin in rats with atherosclerosis\*

CHEN Guiming<sup>1</sup>, SHEN Zhe<sup>1</sup>, LI Zhengzhang<sup>1</sup>, SUN Yefu<sup>2</sup>, QIU Jiagao<sup>1</sup>, LUO Fuyin<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Gaoyou Hospital Affiliated to Suzhou University/People's Hospital of Gaoyou Hospital, Gaoyou, Jiangsu 225600, China; 2. Medical School of Yangzhou

Vocational College, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of olmesartan medoxomil on osteoprotegerin and serum inflammatory factor expression in atherosclerosis model rat. **Methods** From 2015 April in Jiangsu Institute of schistosomiasis control, 24 Sprague-Dawley rats were randomly divided into the following three groups: the control group was fed with standard food, the model group was fed with high fat diet based on standard food(normal food +2% cholesterol +5% goat fat +0.2% acid + $7 \times 10^5$  IU/(kg·d) Vitamin D<sub>3</sub>), and the olmesartan group was given 3 mg/(kg·d) olmesartan gavage daily on the basis of high fat diet. On the fourth week of experiment the level of serum high sensitivity C reactive protein and serum lipids include total cholesterol, low density lipoprotein, high density lipoprotein and triglyceride were detected. The structure and changes of aortic pathology was observed. The expression of osteoprotegerin in aortic was detected by immunohistochemistry staining and Western blot. **Results** Within the model group, the level of serum lipid and high-sensitivity C reactive protein increased significantly, endometrial thickness, intima-to-media thickness ratio and osteoprotegerin expression in aorta was significantly higher than that of normal group, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). The serum high density lipoprotein increased significantly, the level of other serum lipids and high sensitive C reaction protein decreased significantly, endometrial thickness, intima-to-media thickness ratio and osteoprotegerin expression in aorta of the olmesartan treated rats were significantly lower than those of model animals, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Olmesartan may suppress the development of atherosclerosis in model rats by decreasing the expression of osteoprotegerin and the level of serum inflammatory cytokines.

**Key words:** olmesartan; atherosclerosis; osteoprotegerin

骨保护素(OPG)是肿瘤坏死因子受体超家族成员, 是一种糖蛋白, 最初被鉴定为抗骨吸收剂, 进一步研究发现 OPG 的水平升高与心血管疾病和 2 型糖尿病相关<sup>[1-2]</sup>。心血管系统多种细胞如内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞表达和分泌 OPG 进入血液, OPG 可能参与血管钙化。动脉粥样硬化严重威胁人类健康, 主要累及大中动脉, 其主要病理变化为内膜的损伤、炎症因子的聚集、脂质沉积和钙化、泡沫细胞形成、平滑

肌细胞的迁移和增殖等<sup>[3-4]</sup>。奥美沙坦酯具有显著降低炎症的治疗作用, 可以抑制动脉粥样硬化病变的进程, 防止新病灶的形成<sup>[5]</sup>。本研究通过奥美沙坦酯干预动脉粥样硬化大鼠, 观察 OPG 表达的变化, 分析两者之间的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 2015 年 4 月于江苏省血吸虫病防治研究所选取 SD 大鼠 24 只[SYXK(苏)2012-0034], 体质量 180~200 g, 12

\* 基金项目: 江苏大学临床科技发展基金资助项目(JLY20140155)。

作者简介: 陈桂明, 男, 副主任技师, 主要从事生化检验和骨髓形态细胞学检验研究。

周龄, 雄性, 江苏省血吸虫病防治研究所提供。

**1.2 仪器与试剂** 胆酸钠、维生素 D<sub>3</sub> (Sigma 公司), 兔抗大鼠 OPG 多克隆抗体 (Abcam 公司), 超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (上海酶联生物), 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 抗体稀释液 (碧云天公司), 免疫组化链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 试剂盒 (博士德公司), 奥美沙坦酯片 (第一三制药上海有限公司, 批号 SM060OR), 血脂检测试剂 (广州科方生物技术股份有限公司), 7600 全自动生化分析仪 (株式会社日立制作所)。

**1.3 方法**

**1.3.1 复制动脉粥样硬化大鼠模型** 操作方法参照文献[6]并稍作改进, 具体步骤如下: 饲养 SD 大鼠的房间通风良好, 环境温度 20~26 °C, 灯光调节明暗各 12 h。所有大鼠饲喂普通饲料 2 周, 以适应环境。24 只 SD 大鼠, 随机均分为 3 组。对照组大鼠饲喂普通饲料。模型组大鼠先用 7×10<sup>5</sup> IU/(kg·d) 维生素 D<sub>3</sub> 灌胃 4 d 后, 再饲喂高脂饲料 (普通饲料+2%胆固醇+5%山羊脂肪+0.2%胆酸钠)。奥美沙坦酯组大鼠先用 7×10<sup>5</sup> IU/(kg·d) 维生素 D<sub>3</sub> 灌胃 4 d 后, 饲喂高脂饲料的同时给予 3 mg/(kg·d) 奥美沙坦酯溶液灌胃 (奥美沙坦酯组一共灌胃 2 次)。实验大鼠单笼饲养, 自由饮水, 共喂养 4 周。

**1.3.2 血液和组织标本的收集与处理** 于给药 4 周后禁食不禁水, 12 h 后腹腔注射 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 分离暴露心脏, 从主动脉部位抽取血液 5 mL, 室温离心后分离血清, -80 °C 冰箱保存。取主动脉弓, 经磷酸盐缓冲液漂洗后, 部分组织用石蜡包埋、切片, 用于免疫组化染色及苏木精-伊红染色法 (HE) 染色分析, 其余部分 -80 °C 冰箱保存, 用于 Western blot 分析。

**1.3.3 hs-CRP 及血脂水平测定** ELISA 试剂盒检测 hs-CRP, 操作参照说明书进行。在高邮市人民医院检验科采用 7600 全自动生化分析仪检测血脂, 包括血清胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL) 和低密度脂蛋白 (LDL)。

**1.3.4 HE 染色和组织化学染色** 各组动物采集的组织切片行 HE 染色, 显微镜下观察并测量内膜中膜厚度, 分析内膜/中膜厚度比值。取上述石蜡切片行免疫组化链霉亲和素-生物素复合物 (sABC) 法免疫组织化学染色, 检测 OPG 的表达, 操作按试剂盒说明书进行, 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 以棕黄色颗粒状产物为阳性标记。

**1.3.5 Western blot 检测 OPG 在主动脉的表达** 收集主动脉组织, 用眼科剪尽可能剪碎, 放入组织匀浆器中, 加入 4 °C 预冷的蛋白酶抑制剂和细胞裂解 (RIPA) 缓冲液在冰盒中进行研磨后, 将匀浆移入 EP 管内, -80 °C、-4 °C 条件反复冻融 3 次, 15 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 二喹啉甲酸 (BCA) 法定量蛋白水平。配制 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 取 20~30 μg 的总蛋白加样进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参, 待电泳完成后, 采用半干转的方法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液封闭 2 h 后, 用磷酸盐缓冲液洗膜 10 min, 加入 OPG 抗体 (1:100), 4 °C 孵育 24 h。用磷酸盐缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (1:500) 室温孵育 2 h, 用磷酸盐缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后在含有转移蛋白的膜上滴加化学发光 (ECL) 试剂, 显色后检测 OPG 的表达情况。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计学软件对数据进行统计分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较使用完全随机设计的方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 奥美沙坦酯对大鼠 hs-CRP 和血脂的影响** 模型组与对照组相比, 血清 TC、LDL、HDL 和 TG 及 hs-CRP 水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。奥美沙坦酯组与模型组相比, 血清 TC、LDL、hs-CRP 明显下降, HDL 明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 奥美沙坦酯对动脉粥样硬化大鼠血清中各指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)	hs-CRP(mg/L)
对照组	8	2.69±0.64	2.84±0.71	1.71±0.33	0.89±0.08	0.87±0.06
模型组	8	11.88±2.31▲	4.28±1.15▲	2.63±0.97▲	9.15±2.05▲	8.41±1.59▲
奥美沙坦酯组	8	7.54±1.86#	3.09±1.08#	4.18±1.34#	3.68±0.96#	5.84±1.67#

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

**2.2 奥美沙坦酯对动脉粥样硬化大鼠主动脉病理形态的影响**

对照组大鼠主动脉壁各层结构正常, 内膜光滑完好, 中膜弹力纤维正常, 细胞之间结合紧密, 未见粥样硬化斑块。与对照组相比, 模型组主动脉管腔变小, 内膜明显增厚, 可见泡沫细胞积聚, 在内膜和中膜均出现了大量的炎细胞浸润。奥美沙坦酯组内膜内皮下的平滑肌细胞形成少量泡沫细胞, 见图 1。



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为奥美沙坦酯组。

图 1 HE 染色结果 (×100)

模型组与对照组相比, 内膜厚度、内膜/中膜厚度比明显升

高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 奥美沙坦酯组和模型组相比, 内膜厚度、内膜/中膜厚度比均显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

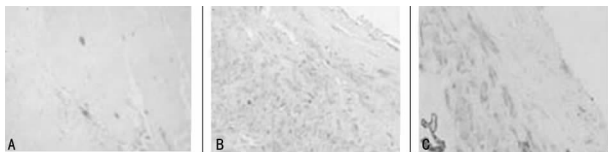
表 2 各组间内膜厚度、内/中膜厚度比的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	内膜厚度(μm)	中膜厚度(μm)	内膜/中膜厚度比
对照组	9.28±2.31	97.87±10.36	9.83±1.05
模型组	35.68±7.91★	101.58±12.35	34.27±5.24★
奥美沙坦酯组	21.57±6.28#	100.94±9.87	20.85±4.13#

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

**2.3 奥美沙坦酯对动脉粥样硬化大鼠主动脉 OPG 的影响** 免疫组化染色结果表明对照组表达 OPG 较少, 模型组与对照组相比, OPG 明显升高; 奥美沙坦酯组 OPG 表达相比模型组

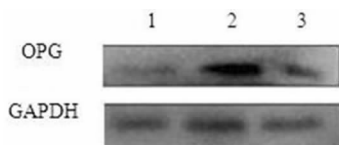
明显下降,见图 2。



注:A为对照组;B为模型组;C为奥美沙坦酯组。

图 2 免疫组织化学染色显示 OPG 在各组中的表达( $\times 100$ )

Western blot 检测结果表明,对照组 OPG 表达很少;模型组与对照组相比,OPG 表达明显增多,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );奥美沙坦酯组与模型组相比,OPG 表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。



注:1为对照组;2为模型组;3为奥美沙坦酯组。

图 3 Western blot 结果显示 OPG 在各组中的表达

### 3 讨论

复制动脉粥样硬化动物模型是相关研究的重要基础,大鼠生理结构与人类相似,饲养方便且病死率低,用于实验研究的抗体种类较为丰富,是理想的动脉粥样硬化模型的试验动物。本试验参考有关文献[6-8],利用高脂饮食和维生素 D<sub>3</sub> 诱发大鼠动脉粥样硬化模型。HE 染色显示对照组动脉内膜、中膜和外膜结构完整,层次清晰。模型组的主动脉管壁三层结构不清晰,内膜粗糙,泡沫细胞聚集,胶原纤维丰富,平滑肌细胞钙化。研究表明,喂饲高脂饮食和胆酸以及维生素 D<sub>3</sub> 可以成功复制动脉粥样硬化大鼠模型。本研究通过奥美沙坦酯干预动脉粥样硬化模型大鼠,奥美沙坦酯组与模型组相比,hs-CRP 水平明显减低,血清 TC、LDL 明显下降,HDL 明显升高,OPG 表达相比模型组明显下降。

OPG 是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一,作为骨代谢的调节因子,也是一种重要的血管调节因子,能够保护血管内皮细胞、抑制血管钙化和动脉粥样硬化。研究显示,血清 OPG 与血管钙化以及动脉粥样硬化进展有关,可作为血管钙化的预测因子。血管钙化不仅是早期动脉粥样硬化病变,而且是一种抵御动脉粥样硬化性疾病活性与进程的生理性防御机制,OPG 对血管钙化的调节机制可促进动脉粥样硬化的进展和不稳定性<sup>[9]</sup>。OPG 也可能通过 T 细胞和树突状细胞促进炎症反应,促进内皮细胞的黏附,降低细胞平滑肌细胞增殖和凋亡,诱导单核细胞趋化性,并通过基质金属蛋白酶和白细胞介素-6 的产生促进动脉粥样硬化的发生和发展<sup>[10]</sup>。奥美沙坦酯通过抑制血管紧张素 II,减少巨噬细胞产生炎症因子如肿瘤坏死因子、白细胞介素-6、干扰素- $\gamma$  以及趋化因子等,改善基质代谢,减轻炎症反应,起到保护血管内皮的作用。本实验研究结果表明,奥美沙坦酯组中 OPG 在粥样硬化动脉上的表达与模型组相比明显减少,所以 OPG 的检测可作为早期诊断动脉粥样硬化的指标。

hs-CRP 是一种由肝脏合成和分泌,主要受白细胞介素-6

等刺激而产生,也可由动脉粥样硬化损伤区的局部血管平滑肌细胞和巨噬细胞产生。高水平的 hs-CRP 能够促进血管内皮细胞迁移、增生,促进血管内膜增厚,破坏弹性纤维,增加大动脉僵硬度,促进动脉粥样硬化的进展,故血中 hs-CRP 高低在一定程度上反映局部动脉内皮炎症轻重程度<sup>[11]</sup>。本研究中,奥美沙坦酯组与模型组相比,血清 TC、LDL、hs-CRP 明显下降,HDL 明显升高,进一步证实奥美沙坦酯能减轻动脉炎症,延缓动脉粥样硬化,保护内皮功能。

### 参考文献

- [1] Benslimane-Ahmim Z, Poirier F, Delomenie C, et al. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin[J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(3): 575-593.
- [2] O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C, et al. Osteoprotegerin and biomarkers of vascular inflammation in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26(6): 496-502.
- [3] Karatolios K, Pankuweit S, Goettsch C, et al. Osteoprotegerin(OPG) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) levels in malignant and benign pericardial effusions[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(3): 237-242.
- [4] Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, et al. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(20): 11201-11206.
- [5] Caidahl K, Ueland T, Aukrust P. Osteoprotegerin: a biomarker with many faces[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(9): 1684-1686.
- [6] Doaa M, Khair AE, Fatma A, et al. A comparative study on the effect of high cholesterol diet on the hippocampal CA1 area of adult and aged rats[J]. *Anat Cell Biol*, 2014, 47(2): 117-126.
- [7] 赵娟,李相军,孙波,等. 维生素 D<sub>3</sub> 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(21): 3569-3571.
- [8] Pang JJ, Xu QH, Xu XB, et al. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D<sub>3</sub>-induced atherosclerosis in the rat[J]. *Peptides*, 2010, 31(4): 630-638.
- [9] Alka C, Alka B, Akba F, et al. Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in type 1 and type 2 diabetic patients[J]. *Turk J Med Sci*, 2015, 45(6): 1306-11.
- [10] Stöpień E, Fedak D, Klimeczek P, et al. Osteoprotegerin, but not osteopontin, as a potential predictor of vascular calcification in normotensive subjects[J]. *Hypertens Res*, 2012, 35(5): 531-538.
- [11] 徐素文,刘培庆. C-反应蛋白与动脉粥样硬化炎症的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(12): 2487-2490.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-06)