

张涛,蒋知新,杜大勇,等.秋水仙碱对新西兰兔不稳定斑块形成的影响研究[J].中国实验动物学报,2023,31(3):365-373.
Zhang T, Jiang ZX, Du DY, et al. Effect of colchicine on unstable plaque formation in New Zealand rabbits [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 365-373.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.03.011

秋水仙碱对新西兰兔不稳定斑块形成的影响研究

张涛¹,蒋知新³,杜大勇²,柳杨²,李巍²,李运田^{1,2*}

(1.南方医科大学第二临床医学院,广州 510000; 2.中国人民解放军第三〇五医院心脏中心,北京 100017; 3.中国人民解放军第三〇五医院中心实验室,北京 100017)

【摘要】 目的 探究秋水仙碱对新西兰兔动脉粥样硬化不稳定斑块形成的影响及其作用机制。方法 雄性新西兰白兔32只,3月龄,按空白对照组($n=8$)、模型组($n=8$)、秋水仙碱组($n=8$)、匹伐他汀组($n=8$)进行分组。实验组高脂饲料诱导2周后行颈动脉液氮冻伤,术后8周和术后12周分别检测兔血清血脂水平及高敏C反应蛋白(high sensitive C-reactive protein,hsCRP)、白介素6(interleukin 6,IL-6)表达水平。术后12周处死,取颈动脉做石蜡切片,HE染色观察血管组织形态,实时定量PCR(RT-qPCR)检测斑块内腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)、沉默信号调节因子1(sirtuin 1,SIRT1)、过氧化物酶体增殖激活物受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α ,PGC-1 α)基因表达水平,免疫印迹(Western Blot)检测斑块内p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平,并做p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 免疫组织化学染色,斑块内丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测。血管内超声(intravascular ultrasound,IVUS)评估斑块形成情况。结果 术后12周时模型组、秋水仙碱组、匹伐他汀组血脂水平、炎症指标较同时期空白对照组均明显升高($P<0.05$),与模型组相比秋水仙碱组甘油三酯(triglycerides,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein-cholesterol,LDL-C)、hsCRP、IL-6明显降低($P<0.05$)。液氮冻伤术后均可见内膜增生,模型组可见典型动脉粥样硬化不稳定斑块形成;斑块内及增生内膜可见p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 的表达增加,其中秋水仙碱组表达最高($P<0.05$)。IVUS观察发现模型组颈动脉管腔中重度狭窄,伴有斑块破裂及内膜下血肿,而秋水仙碱组、匹伐他汀组仅表现为管腔中度狭窄,无斑块破裂征象;与模型组、匹伐他汀组相比秋水仙碱组MDA含量下降、SOD活性上升。结论 秋水仙碱能够延缓新西兰兔动脉粥样硬化不稳定斑块的形成,其机制可能通过降低脂蛋白活性和胆固醇吸收,活化AMPK从而激活去乙酰化酶,增加SIRT1、PGC-1 α 表达,提高斑块炎症因子释放阈值,从而抑制氧化应激及炎症反应。

【关键词】 秋水仙碱;斑块稳定性;AMPK;SIRT1;PGC-1 α ;动脉粥样硬化;液氮冻伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2023)03-0365-09

Effect of colchicine on unstable plaque formation in New Zealand rabbits

ZHANG Tao¹, JIANG Zhixin³, DU Dayong², LIU Yang², LI Wei², LI Yuntian^{1,2*}

(1. the Second Clinical Medical School of Southern Medical University, Guangzhou 510000, China.

2. Department of Cardiology, the 305 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100017.

3. Central Laboratory, the 305 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100017)

Corresponding author: LI Yuntian. E-mail: lyt305@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of colchicine on atherosclerotic unstable plaque formation in high fat diet-fed New Zealand rabbits and the underlying mechanism. **Methods** A total of 32 male New Zealand rabbits at 3 months

【基金项目】 全军冠心病诊疗中心建设资助项目(09GXB),军队保健专项科研课题(12BJZ29)。

Funded by Construction Project of PLA Coronary Heart Disease Diagnosis and Treatment Center (09GXB), Special Scientific Research Project of Military Health Care (12BJZ29).

【作者简介】 张涛(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:心血管内科。Email:1391085687@qq.com

【通信作者】 李运田(1965—),男,教授,博士,研究方向:冠心病。Email:lyt305@126.com

of age were randomly assigned into a control group ($n = 8$), model group ($n = 8$), colchicine group ($n = 8$), and pitavastatin group ($n = 8$). Serum blood lipids, high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), and interleukin-6 (IL-6) were measured at 8 and 12 weeks postoperatively. Rabbits were sacrificed at 12 weeks postoperatively, and blood vessels were collected to prepare paraffin-embedded sections, followed by observation of blood vessel morphology by HE staining. AMP-activated protein kinase (AMPK), sirtuin 1 (SIRT1), and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA levels in unstable plaques were measured by qRT-PCR. p-AMPK, SIRT1, and PGC-1 α protein levels were measured by Western Blot and immunohistochemistry. Malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activities in unstable plaques were determined by chromogenic reaction. Intravenous ultrasound was performed to visualize plaque formation. **Results** Relative levels of blood lipids and inflammatory indicators in model, colchicine, and pitavastatin groups at 12 weeks postoperatively were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Triglycerides, low-density lipoprotein-cholesterol, hsCRP, and IL-6 levels in the colchicine group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). Neointimal hyperplasia was observed in model, colchicine, and pitavastatin groups, and typical atherosclerotic plaque formation was seen in the model group. Upregulation of p-AMPK, SIRT1, and PGC-1 α was detected in rabbit plaques and hyperplastic intima, which was most pronounced in the colchicine group ($P < 0.05$). Intravenous ultrasound scans showed moderate-severe lumen stenosis, plaque rupture, and subintimal hemorrhage in the model group. Moderate lumen stenosis was seen in colchicine and pitavastatin groups without plaque rupture. Decreased MDA content and increased SOD activity were found in the colchicine group compared with model and pitavastatin groups. **Conclusions** Colchicine delays atherosclerotic plaque formation in high fat diet-fed New Zealand rabbits by reducing lipid accumulation in plaques, AMPK-induced activation of deacetylase, upregulation of SIRT1 and PGC-1 α , and inhibition of oxidative stress and inflammatory responses by enhancing the release threshold of proinflammatory factors in plaques.

[Keywords] colchicine; plaque stability; AMPK; SIRT1; PGC-1 α ; atherosclerosis; liquid nitrogen frostbite

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是世界上死亡率最高的疾病之一, 急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 作为冠心病的一种严重类型, 是冠心病死亡的主要原因^[1]。ACS 的病理生理基础是不稳定斑块破裂, 继发完全/不完全闭塞性血栓形成, 其中不稳定斑块的形成和发生破裂是 ACS 的潜在罪魁祸首。动脉粥样硬化不稳定斑块的形成目前认为是较大的脂质核心形成、内皮损伤剥脱伴血小板聚集、斑块破裂、氧化应激及炎症损伤等综合作用的结果。临床对于 ACS 的治疗主要强调降脂和防止血栓形成, 但治疗后心血管事件复发风险仍旧很高, 其原因可能与血管炎症未得到进一步控制有关; 近年来, 越来越多的证据表明炎症和氧化应激参与了是动脉粥样硬化斑块, 尤其是不稳定斑块的形成^[2-3]。

秋水仙碱是临床上治疗急性痛风发作的经典药物, 临床观察发现, 其可减少慢性冠心病患者的动脉粥样硬化性心血管事件, 同时具有良好的安全性^[4]。2020 年发表的 LoDoCo2 实验, 在 5522 例患者中评估秋水仙碱治疗慢性冠心病的安全性和有效性, 与安慰剂组相比, 秋水仙碱组的主要心血管终点事件风险降低了 31%^[5]。其机制可能与秋水

仙碱具有明确的抑制氧化应激和炎症反应作用有关^[6]。然而, 对于氧化应激和炎症反应更加明显的 ACS 患者应用秋水仙碱进行治疗尚未见相关报道。

本研究通过构建新西兰兔液氮冻伤动物模型, 模拟 ACS 不稳定斑块形成过程, 观察秋水仙碱对不稳定斑块形成过程中氧化应激和炎症反应水平的影响, 探讨其可能的作用机制, 为秋水仙碱用于 ACS 的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性普通级新西兰白兔 32 只, 3 月龄, 体重 (3.0 ± 0.5) kg, 购自北京芳元缘动物养殖中心【SCXK(京)2020-0001】。分笼喂养于北大医院实验动物中心【SYXK(京)2019-0009】, 相对湿度 50% ~ 60%, 明暗环境周期 12 h/12 h, 环境温度 22 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$, 随时提供自来水和食物。该动物实验经北京大学第一医院实验动物中心伦理委员会批准 (J202157)。

1.1.2 主要试剂与仪器

兔高脂饲料 (1% 胆固醇、8% 猪油、10% 蛋黄粉 +

兔基础饲料)购自北京科澳生物科技股份有限公司;医用液氮由中国人民解放军三〇五医院中心实验室提供;p-AMPK 抗体购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司(2535T);SIRT1 抗体购自美国 Novus Biologicals 抗体公司(NBP1-51641);PGC-1 α 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(bs-1832R); β -ACTIN 抗体购自碧云天生物技术有限公司(AF5003);DAB 显色试剂盒、免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(ZLI-9017;PV-9000);秋水仙碱和匹伐他汀均购自美国 MedChemExpress (MCE) 公司(HY-16569; HY-B0144)。新锐全自动生化分析仪(XR220 Pluse, 中山新锐医疗科技有限公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);低温高速离心机(德国 Sigma 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

动物适应性喂养 1 周后,按每组 8 只随机分组为四组:对照组(Control)、模型组(AS)、秋水仙碱组(Colchicine)、匹伐他汀组(Pitavastain)。

1.2.2 动物模型建立

实验对照组新西兰兔不行液氮冻伤手术,予兔基础饲料喂养;模型组、秋水仙碱组、匹伐他汀组利用液氮冻伤血管内膜+高脂饮食的方法建立 AS 模型。

手术操作前 12 h 实验动物禁食,称重。麻醉选用 0.3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 耳缘静脉注射,麻醉生效后固定动物于兔台,去除颈部下颌骨至锁骨毛发,充分暴露颈部皮肤后,分离肌肉组织,暴露左侧颈总动脉,拿血管夹依次夹闭颈总动脉近心端、远心端,二者间隔约 4 cm,取金属注射器(普通注射器遇冷变形不可用)外接留置针软管,于远心端 45° 斜刺入管腔,抽尽动脉段血液后用生理盐水冲洗 2 ~ 3 次,排空动脉段液体后金属注射器抽取液氮,迅速从留置针注入,反复 3 次,历时 2 min,通过液氮刺激内皮损伤,造就 AS 模型。造模完成后先去除远心端血管夹,压迫止血 3 min,再去除近心端血管夹,压迫止血 5 min,止血后依次缝合筋膜肌肉和皮肤,于缝合伤口处涂抹适量青霉素钠粉末,术后连续 3 d 肌注 40 万单位青霉素钠抗感染。术后第 8 周末行药物干预,秋水仙碱组:灌胃给予秋水仙碱 2 mg/(kg·d),匹伐他汀组:灌胃给予匹伐他汀 1 mg/(kg·d),每天 1 次,时间持续 4 周。

1.2.3 生化指标检测和病理学观察

应用酶标仪比色法检测血清甘油三酯(TC)、血清总胆固醇(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量。SOD 和 MDA 参照试剂盒说明书进行测定。采用 ELISA 试剂盒检测血清炎症介质 hs-CRP 和 IL-6 含量,样品 4℃ 自然解冻 30 min 后,上清液于 4℃、3000 r/min 离心 5 min,在显色剂和终止液之前,将血清 5 倍稀释液加入孔中,450 nm 处测量吸光度。颈动脉石蜡切片行苏木精-伊红染色,200 倍光镜下观察各组新西兰兔颈动脉组织病理学变化,用 Image J 软件定量分析内中膜厚度(IMT)和血管管腔狭窄率。

1.2.4 免疫组化

颈总动脉血管组织石蜡包埋后行 5 μ m 连续切片,将切片行脱蜡水化,室温下抗原修复,滴加 0.1% 胰蛋白酶反应 20 min,依次滴加 p-AMPK/SIRT1/PGC-1 α 一抗和酶标二抗进行孵育,DAB 显色并行苏木紫复染、脱水、透明、封片,切片染色后随机选取 4 个不同部位视野,400 倍镜下观察并记录图片,图片分析采用 Image J 软件计算 4 个不同视野的阳性面积百分比并求平均值,细胞质内或细胞膜内染色成棕黄色颗粒被认为是阳性表达。免疫组化染色步骤严格按照中杉金桥 PV-9000 试剂盒说明书。

1.2.5 RT-qPCR

按日本 TaKaRa 公司生产的 MiniBEST Universal RNA EXtraction Kit 试剂盒(Code No. 9767)和 One Step TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit II 试剂盒(Code No.RR086A)说明书操作进行 RNA 提取、扩增,并以 GAPDH 基因作为内参,采用相对定量法法计算表达量。AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、GAPDH 基因序列参考有关文献,由上海生工公司合成。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence formation

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
AMPK	F: TGACAGGCCATAAAGTGGCA
AMPK	R: AGTGTCTGATCACCTGATAGAGTT
SIRT1	F: GGAACCTGGATTGCGGCTGAT
SIRT1	R: TTCTGTAGGCAAACTGGACA
PGC-1 α	F: AAAAGCTTGACTGCGCTCAC
PGC-1 α	R: CCAGAGCAGCACACTCGAT
GAPDH	F: TCGGAGTGAACGGATTGGC
GAPDH	R: TGCCGTGGGTGGAATCATA

1.2.6 Western Blot

颈动脉血管组织液氮预冷后用研磨棒研磨至粉末状,加入 RIPA 强裂解液充分裂解,离心提取总蛋白,蛋白提取后用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量检测。取适量蛋白上清进行电泳、转膜到 PVDF 膜上,加 5% 脱脂奶粉室温孵育 1 h 封闭处理,再加 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、 β -actin 一抗于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,抗体滴度参考对应抗体说明书。回收一抗,充分漂洗后加入二抗并于常温孵育 1 h, ECL 化学发光法显像并保存图片。

1.2.7 血管内超声 (IVUS) 检查

手术第 12 周时,经耳缘静脉用 0.3% 戊巴比妥钠按 1 mL/kg 麻醉新西兰兔,用 21 G 桡动脉穿刺针行股动脉穿刺术。穿刺成功后,以 0.014 mm 的介入导丝,引导 20 MHz 相控阵的 IVUS 导管放入左侧颈动脉,在血管造影机引导下送至颈动脉远心端,采用机器自动控制系统缓慢匀速 1 mm/s 回拉超声导管至近心端,所有的 IVUS 图像被数字化,检查实时记录,并且储存在 IVUS 的操作台,术后回放影像测量并记录最小管腔面积,计算斑块面积和斑块负

荷,根据回声强弱分析斑块性质。脂质斑块:80% 回声弱于血管外膜,多见于纤维脂肪组织、脂质池;纤维斑块:80% 回声强度相近或超过血管外膜,后方无声影,多见于纤维帽、致密纤维组织;钙化斑块:回声强度明显高于血管外膜,且斑块后方有明显声影。

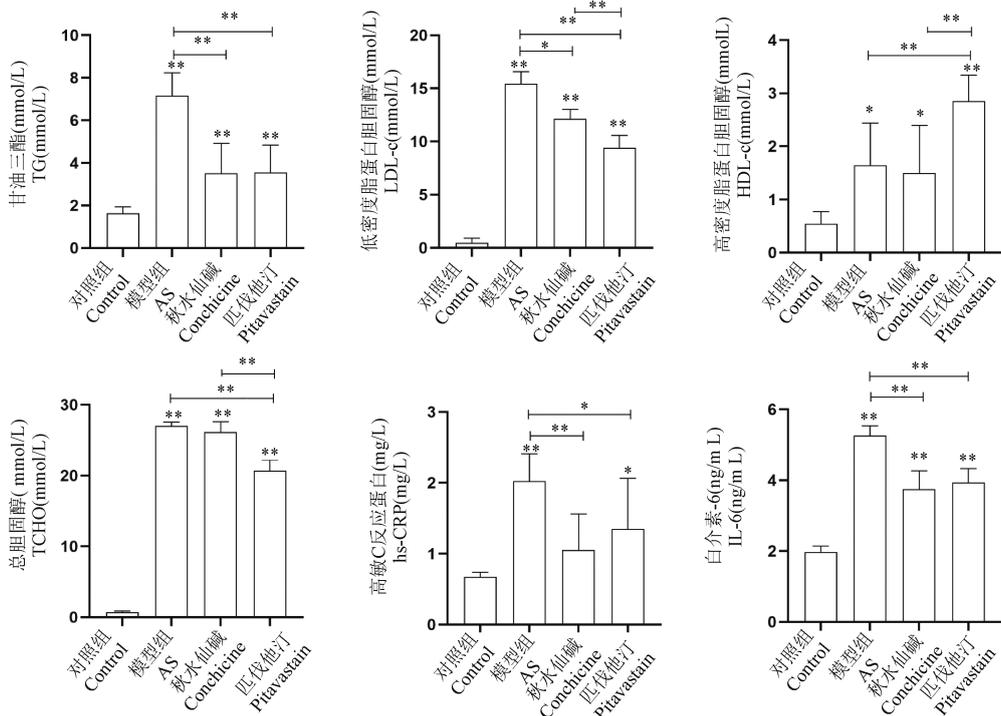
1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学分析以及作图,计量数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 新西兰兔高脂模型血脂及炎症指标变化

图 1 显示,与正常组相比较,模型组 TG、TCHO、HDL-C、LDL-C、hsCRP 和 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$);经药物干预治疗后,与模型组比较,秋水仙碱组 TG、LDL-C、hsCRP 和 IL-6 水平下降 ($P < 0.05$),匹伐他汀组 TCHO、LDL-c、TG、hs-CRP 和 IL-6 水平下降 ($P < 0.05$),同时 HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.01$);与秋水仙碱组比较,匹伐他汀组



注:对照组 ($n = 8$),模型组 ($n = 7$),秋水仙碱组 ($n = 7$),匹伐他汀组 ($n = 6$);与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 高脂饮食和秋水仙碱对新西兰兔血脂及炎症因子水平影响

Note. Control ($n = 8$), AS ($n = 7$), Colchicine ($n = 7$), Pitavastatin ($n = 6$). Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 High-fat diet and colchicine effects on lipid profile and inflammation biomarkers levels

TCHO, LDL-C 水平明显下降 ($P < 0.01$), HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.01$), 而二者在 TG、hs-CRP 和 IL-6 上的差异不具有统计学意义(图 1)。

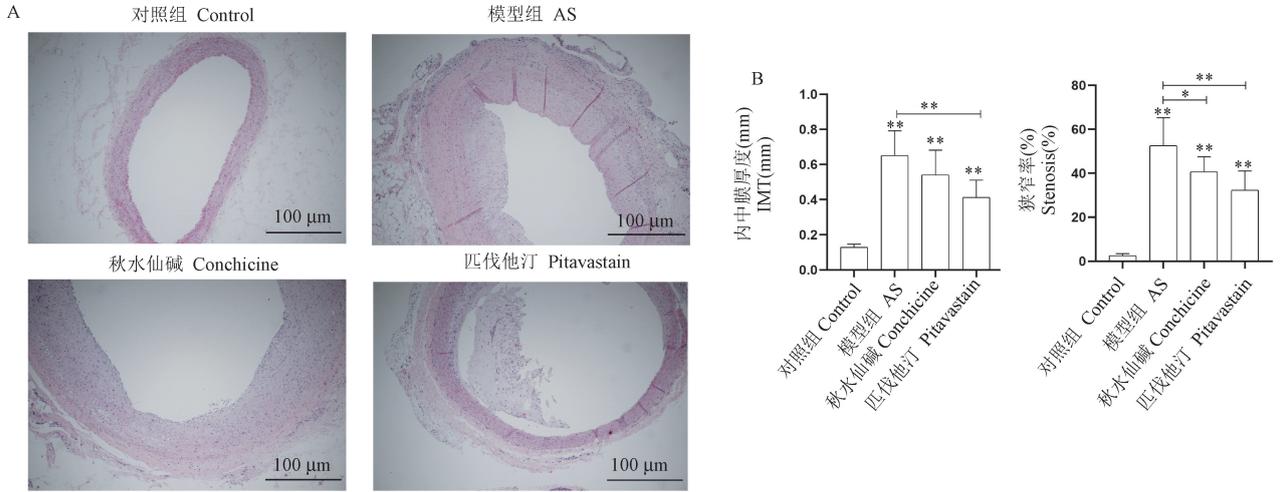
2.2 各组兔颈动脉组织 HE 病理染色结果

HE 染色结果显示, 空白对照组未见斑块形成, 内膜完好, 中膜无增生, 中层平滑肌细胞排列整齐; 模型组可见明显脂质性、纤维性斑块形成, 3 只斑块面积 30% ~ 50%, 5 只出现管腔明显狭窄, 相对斑块面积在 50% ~ 99% 不等, 1 只出现斑块破裂, 内膜下出血, 3 只可见斑块表面血栓形成以及较大的脂质核心、大量巨噬细胞浸润征象; 秋水仙碱组、匹伐他汀组颈动脉 HE 染色可见典型稳定斑块, 平滑肌细胞增殖, 相对斑块面积均小于 50%, 斑块内巨噬细胞、泡沫细胞、脂质核心明显减少, 未见斑块表

面血栓形成及斑块破裂征象。定量分析显示, 秋水仙碱组和匹伐他汀组切片的内中膜厚度和狭窄率明显低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 但秋水仙碱组和匹伐他汀组间不具有统计学意义(图 2)。

2.3 秋水仙碱对新西兰兔 AMPK、SIRT1、PGC-1 α mRNA 水平的影响

与空白对照组相比, 模型组 AMPK、SIRT1、PGC-1 α mRNA 水平升高; 经药物灌胃治疗后, 与模型组相比, 秋水仙碱组、匹伐他汀组 SIRT1、PGC-1 α mRNA 进一步升高, 匹伐他汀组 AMPK mRNA 升高无统计学意义, 秋水仙碱组 AMPK mRNA 升高明显 ($P < 0.01$); 与匹伐他汀组比较, 秋水仙碱组 AMPK mRNA 升高明显 ($P < 0.01$), 而 SIRT1、PGC-1 α mRNA 表达水平差异不具有统计学意义(图 3)。



注:A: 药物干预 4 周后新西兰兔颈动脉组织病理改变(HE 染色); B: 兔颈总动脉 HE 染色定量分析内中膜厚度和狭窄率的结果。

图 2 秋水仙碱对高脂喂养新西兰兔颈动脉斑块形态的影响

Note. A. Histological changes of the rabbit carotid artery after 4 weeks of pharmacological intervention(HE staining). B. Quantitative and analysis of IMT and stenosis rate in rabbit CCA by HE staining.

Figure 2 Effect of colchicine on carotid plaque morphology in high-fat fed New Zealand rabbits

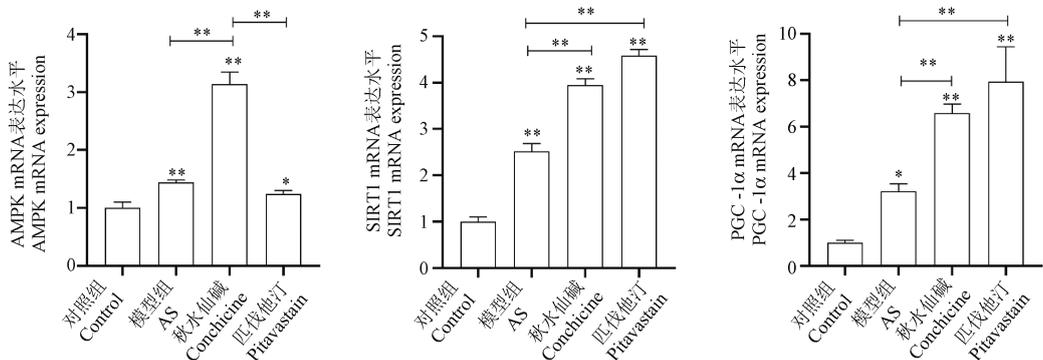


图 3 各组兔颈动脉 AMPK/SIRT1/PGC-1 α mRNA 的表达

Figure 3 mRNA expression of aortic AMPK/SIRT1/PGC-1 α

2.4 秋水仙碱对新西兰兔 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,秋水仙碱组 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平升高,匹伐他汀组 p-AMPK、

SIRT1 蛋白水平升高,且秋水仙碱组较匹伐他汀组 SIRT1、PGC-1 α 升高程度更为明显,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

2.5 兔颈动脉 IHC 染色结果及测得的各蛋白 OD 值

根据图 5 结果显示,与空白组比,模型组颈动脉

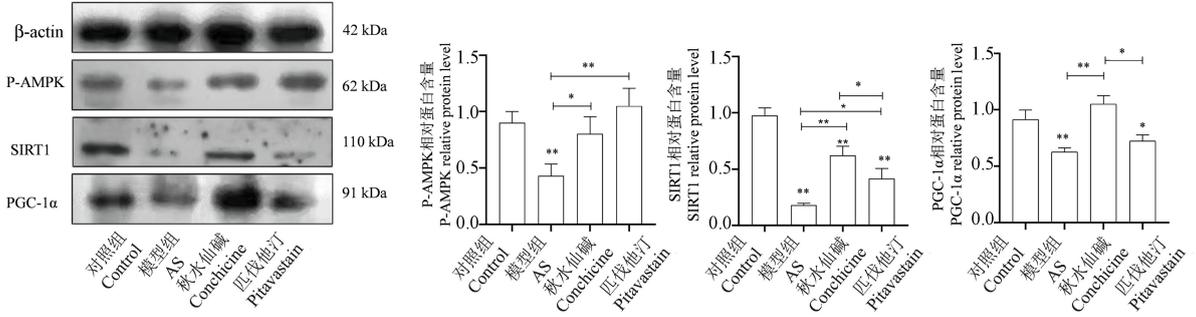
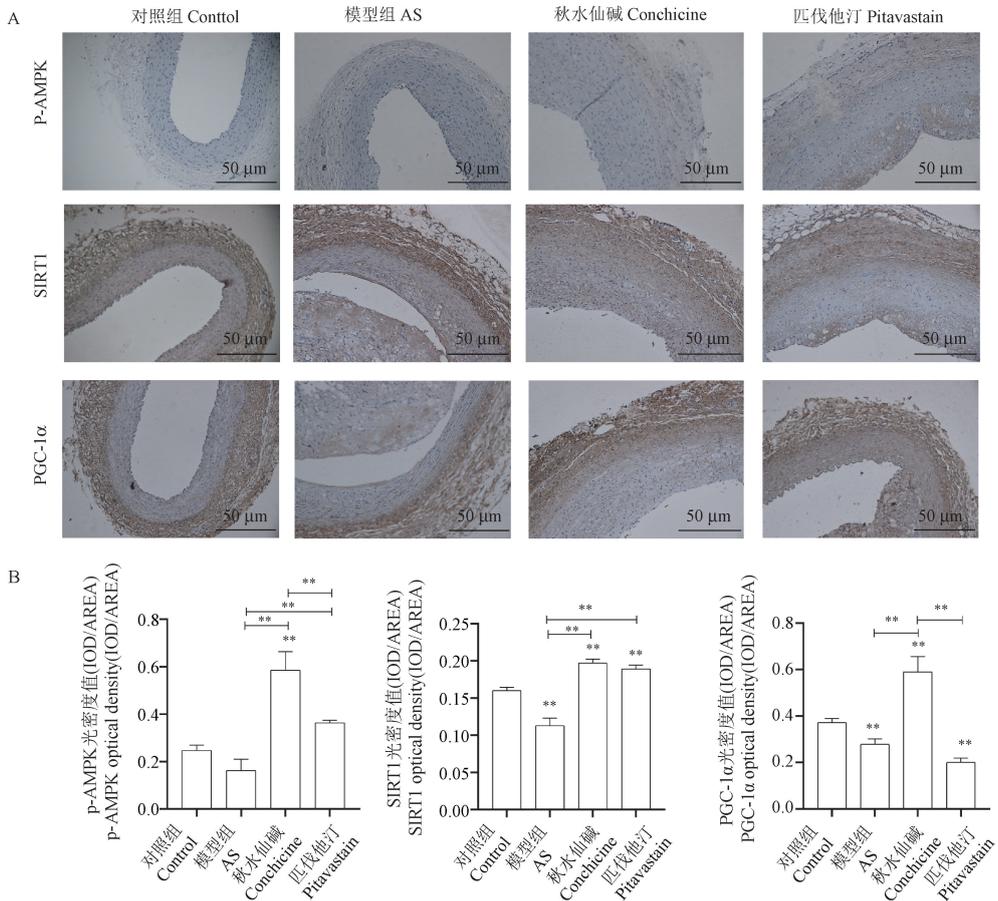


图 4 各组兔颈动脉 p-AMPK/SIRT1/PGC-1 α 蛋白表达

Figure 4 Protein expression level of p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α



注: A: 药物干预 4 周后取颈动脉切片行免疫组化结果(免疫组化); B: 对所有免疫组化切片进行光密度值量化分析的结果比较。

图 5 各组兔颈动脉 p-AMPK/SIRT1/PGC-1 α 蛋白 IHC 阳性表达结果

Note. A. After 4 weeks of drug intervention, the sections of carotid artery were taken for immunohistochemical results(Immunohistochemistry).

B. Result of IHC was expressed as IOD/AREA.

Figure 5 Positive expression result of p-AMPK, SIRT1 and PGC-1 α by IHC

组织中 SIRT1, PGC-1 α 蛋白表达平均 OD 值明显降低 ($P < 0.01$), p-AMPK 平均 OD 值差异无统计学意义; 与模型组相比, 秋水仙碱组 p-AMPK、SIRT1 和 PGC-1 α 平均 OD 值均明显升高 ($P < 0.01$); 与匹伐他汀组相比, 秋水仙碱组 p-AMPK, PGC-1 α 平均 OD 值升高 ($P < 0.01$), SIRT1 平均 OD 值差异无统计学意义 (图 5)。

2.6 秋水仙碱对新西兰兔颈动脉组织 SOD、MDA 的影响

与空白对照组相比, 模型组新西兰兔颈动脉 MDA 浓度显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 秋水仙碱、匹伐他汀组兔颈动脉 MDA 浓度显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与匹伐他汀组比较, 秋水仙碱组 MDA 浓度进一步降低 ($P < 0.05$), SOD 活性进一步升高 ($P < 0.01$) (图 6)。

2.7 各组新西兰兔颈动脉 IVUS 成像结果

从 4 组兔中每组随机抽取 3 只兔进行 IVUS 成像检查, 以观察颈动脉粥样硬化情况。根据图 7 结果显示, 空白对照组兔内膜光滑, 管腔无狭窄, 未见动脉粥样硬化斑块形成, 而在模型组, 秋水仙碱组和匹伐他汀组均可见不同程度的管腔狭窄、脂质斑块、纤维斑块形成。共发现 27 处斑块部位, 模型组 1 处混合斑块伴钙化斑块形成, 6 处纤维斑块, 5 处

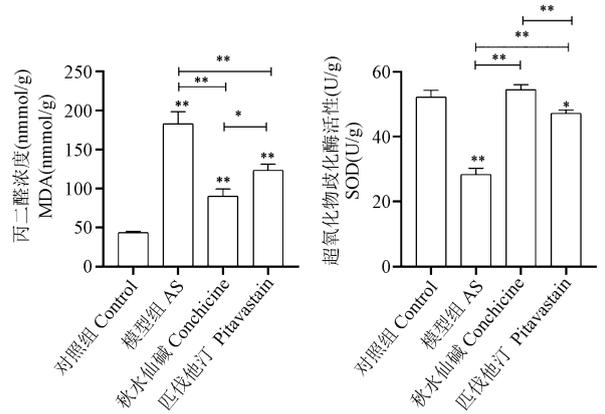
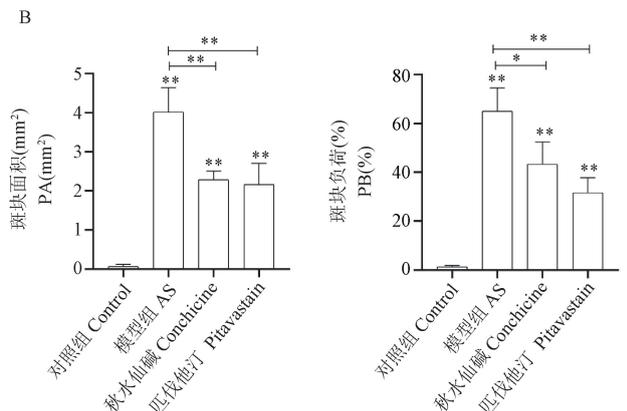
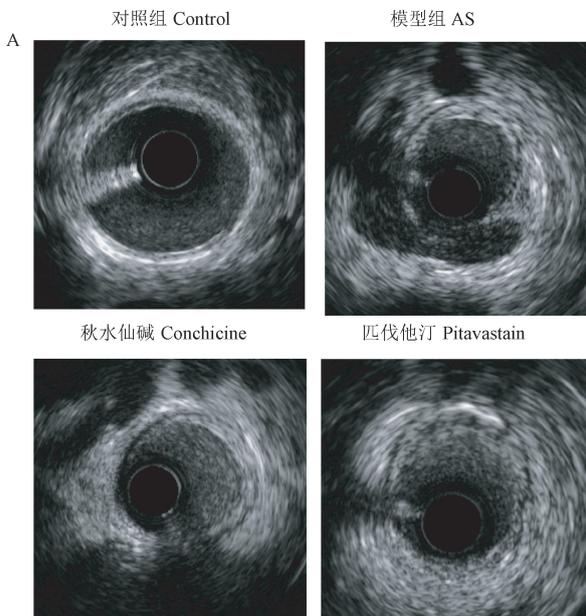


图 6 各组兔颈动脉 MDA 含量, SOD 活性检测情况

Figure 6 Effects of pharmacological intervention arterial on oxidative markers MDA and SOD

脂质斑块, 秋水仙碱组发现纤维斑块 5 处, 脂质斑块 3 处, 匹伐他汀组发现纤维斑块 4 处, 脂质斑块 3 处。模型组颈动脉表现为管腔中重度狭窄, 并伴有斑块破裂及内膜下出血, 而秋水仙碱组、匹伐他汀组仅表现为管腔中度狭窄, 无斑块破裂征象。定量分析 IVUS 影像资料显示, 与模型组相比, 秋水仙碱组匹伐他汀组斑块面积和斑块负荷均明显减小 ($P < 0.05, P < 0.01$) (图 7)。



注: A. 实验结束时各组兔左侧颈动脉血管内超声的结果图; B. 对 IVUS 成像结果计算出的斑块面积和斑块负荷进行统计分析。

图 7 IVUS 比较各组兔颈动脉斑块的稳定性

Note. A. IVUS images of carotid artery in each group. B. Quantitative analysis of PA and PB in rabbit CCA.

Figure 7 Stability of carotid plaque in rabbits was compared by IVUS

3 讨论

近年来的研究证实,氧化应激和炎症反应与不稳定斑块的形成和发展关系密切。在高血糖、高血脂、血管切应力增加等危险因素刺激下,血管内皮炎症反应加剧,是动脉粥样硬化发生的重要环节^[7]。炎症因子(如 TNF- α 和 IL-1 β)作用于线粒体氧化呼吸链提高内皮 ROS 生成,加重氧化应激水平。此外,炎症因子还可以招募血液中单核巨噬细胞迁移至内皮下或中膜层,通过吞噬脂质转变为泡沫细胞,最终形成粥样斑块。若氧化应激、炎症反应未得到进一步控制,血液中的单核细胞受趋化因子的影响,大量向内皮下及中膜聚集,从而使泡沫细胞形成增加,脂质核心增大、细胞外基质产生减少、巨噬细胞分泌蛋白酶降解胶原蛋白,纤维帽变薄,使稳定斑块向不稳定斑块转变。最终导致不稳定斑块形成^[8-9]。

MDA 含量、SOD 活性是评估氧化应激水平的生物学标志物,是反映脂质过氧化程度的指标。研究表明,在高胆固醇血症的情况下,自由基的积累会增加氧化应激水平,增加细胞膜膜的通透性,从而启动细胞死亡过程,增加斑块的不稳定性^[10-11]。

AMPK/SIRT1 是细胞代谢稳态和氧化损伤过程中的关键调节因子,PGC-1 α 作为 AMPK 和 SIRT1 的下游靶蛋白,具有调节线粒体生物合成、氧化代谢及细胞能量稳态的作用。研究发现,AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路可以调节血管内皮炎症和氧化应激水平^[12]。AMPK 增加机体对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的吸收,减少泡沫细胞形成,保护血管内皮。SIRT1 下调脂肪存储基因转录,增加脂肪代谢速度^[13-15]。同时,AMPK 通过增加 SIRT1 的表达,激活 PGC-1 α 。PGC-1 α 可诱导内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的生成,促进 NO 的生物活性,改善血管舒张功能,抑制动脉粥样硬化。PGC-1 α 还可以通过抑制肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达,从而影响炎症因子的黏附,减轻 TNF- α 所致的细胞内及线粒体内 ROS 升高,降低氧化应激和炎症反应水平,有利于斑块稳定^[16]。

秋水仙碱是一种生物碱,主要作用于中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞,使其趋化性降低,促炎因子释放减少,降低免疫细胞吞噬作用和炎症反应,目前主要用于治疗痛风急性发作^[17]。

在肺动脉高压的动物模型中,秋水仙碱的应用

抑制了血管平滑肌细胞的迁移,增加了细胞的凋亡,并减少炎症反应蛋白的表达(TNF- α 、NF- κ B)^[18]。既往在针对血管内皮细胞的实验研究中发现,秋水仙碱通过上调 AMPK/SIRT1 通路表达,抑制胆固醇晶体在内皮细胞中堆积,减轻氧化应激及炎症反应^[19]。

秋水仙碱 LoDoCo 前瞻性研究的假设是基于秋水仙素的抗炎作用,通过抑制促炎细胞因子的释放,降低 hs-CRP 水平和 IL-6 等的水平。该研究招募了 532 例稳定型心绞痛患者,口服 0.5 mg/d 秋水仙碱或安慰剂,中位随访 3 年。结果显示,秋水仙碱减少了心肌梗死、缺血性卒中或缺血驱动的冠状动脉血运重建等主要终点事件,降低冠心病患者除心血管死亡率外的主要心血管事件的发生率^[20]。

本研究模拟 ACS 不稳定斑块形成过程,发现秋水仙碱可降低血清 hs-C 反应蛋白和炎症介质 IL-6 水平。我们的结果与 Fiolet 等^[21]的结果一致。

研究结果显示,模型组颈动脉组织 AMPK、SIRT1、PGC-1 α mRNA 的表达水平明显升高,而 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平却显著减少,这可能是氧化应激刺激机体代偿性基因表达的结果,同时蛋白水平下降表明 p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 蛋白参与了动脉粥样硬化斑块进展。与模型组相比,秋水仙碱组颈动脉组织中 AMPK mRNA 表达水平、AMPK 蛋白磷酸化水平进一步升高,同时 SIRT1、PGC-1 α mRNA 及蛋白表达水平也显著升高,这说明秋水仙碱可激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路,并上调相关 mRNA 及蛋白表达。与匹伐他汀组相比,秋水仙碱组 AMPK mRNA 和 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平升高更为显著,直观的反映了秋水仙碱对 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路的影响大于匹伐他汀。兔颈动脉组织 MDA、SOD 实验结果显示,模型组颈动脉 MDA 浓度显著升高,SOD 活性显著降低,表明模型组氧化应激及炎症水平升高。与模型组比较,秋水仙碱、匹伐他汀组兔主动脉 MDA 浓度显著降低,SOD 活性显著升高,且与匹伐他汀组比较,秋水仙碱组 MDA 浓度进一步降低,SOD 活性也进一步升高。结合上文提到的 PGC-1 α 抑制氧化应激及炎症反应的分子机制,不难发现相较于匹伐他汀,秋水仙碱能更有效地抑制氧化应激及炎症反应水平,进而减轻斑块对于血管壁的损伤,从而达到稳定斑块的目的。

组织病理学结果也证实了秋水仙碱稳定斑块

的作用,结果显示秋水仙碱治疗后颈动脉内膜中层增厚减轻,颈动脉壁改善,管腔狭窄较模型组明显减轻。实验结束时给各组兔行 IVUS 检查,旨在发现易损斑块、斑块内出血、斑块内新生血管等成像特点,结果显示模型组颈动脉狭窄最严重,并出现了斑块破裂、内膜下血肿征象,而秋水仙碱及匹伐他汀组仅表现为管腔中度狭窄,未见斑块破裂。结果表明,秋水仙碱可以影响动脉粥样硬化的发生和发展,从而降低 ACS 发生风险。

此外在我们的研究中还发现秋水仙碱具有一定的降脂作用,其能降低血清 TG、LDL-c 水平,但对 TCHO 影响较小,可能是通过影响脂蛋白的活性及胆固醇吸收。

综上所述,我们的结果表明,秋水仙碱降低了炎症反应,并增强了颈动脉组织的抗氧化能力。其抗炎、抗氧化作用可能是通过影响 p-AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号转导通路表达来实现。秋水仙碱可能是治疗动脉粥样硬化的潜在靶点,因为它可以影响一系列产生和维持动脉粥样硬化的生物标志物,减轻促炎反应和氧化应激。能与他汀类药物相辅相成,从而影响动脉粥样硬化发生和发展过程中的脂质代谢、氧化应激和炎症反应,进一步稳定动脉粥样硬化斑块。因此,秋水仙碱或许可用于 ACS 以及 PCI 术后的二级预防药物,从而减低复发性心血管事件的发生率并改善患者预后。后续仍需进一步开展临床实验,并对秋水仙碱用于 ACS 的有效剂量和长期安全性问题做进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Evans MA, Sano S, Walsh K. Cardiovascular disease, aging, and clonal hematopoiesis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 419–438.
- [2] Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620–636.
- [3] Parma L, Baganha F, Quax PHA, et al. Plaque angiogenesis and intraplaque hemorrhage in atherosclerosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 816: 107–115.
- [4] Ma Z, Chen J, Jin K, et al. Colchicine and coronary heart disease risks: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 947959.
- [5] Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, et al. Colchicine in patients with chronic coronary disease [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(19): 1838–1847.
- [6] Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2017, 19(11): 42.
- [7] Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, et al. Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8563845.
- [8] Hartley A, Haskard D, Khamis R. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies in atherosclerosis-novel insights and future directions in diagnosis and therapy [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2019, 29(1): 22–26.
- [9] Wu Y, Wang F, Fan L, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1673–1679.
- [10] Hajjar DP, Gotto AJ. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(5): 1474–1481.
- [11] Pop C, Berce C, Ghibu S, et al. Effects of *Lycium barbarum* L. polysaccharides on inflammation and oxidative stress markers in a pressure overload-induced heart failure rat model [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 466.
- [12] Kim EN, Kim MY, Lim JH, et al. The protective effect of resveratrol on vascular aging by modulation of the renin-angiotensin system [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 270: 123–131.
- [13] Tang BL. Sirt1 and the mitochondria [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(2): 87–95.
- [14] Pal PB, Sonowal H, Shukla K, et al. Aldose reductase regulates hyperglycemia-induced HUVEC death via SIRT1/AMPK- α 1/mTOR pathway [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(1): 11–25.
- [15] Han X, Tai H, Wang X, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(3): 416–427.
- [16] Wang S, Dougherty EJ, Danner RL. PPAR γ signaling and emerging opportunities for improved therapeutics [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 76–85.
- [17] Angelidis C, Kotsialou Z, Kossyvakis C, et al. Colchicine pharmacokinetics and mechanism of action [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(6): 659–663.
- [18] Misra DP, Gasparyan AY, Zimba O. Benefits and adverse effects of hydroxychloroquine, methotrexate and colchicine: searching for repurposable drug candidates [J]. *Rheumatol Int*, 2020, 40(11): 1741–1751.
- [19] Yang M, Lv H, Liu Q, et al. Colchicine alleviates cholesterol crystal-induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9173530.
- [20] Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA, et al. Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(4): 404–410.
- [21] Fiolet ATL, Silvis MJM, Opstal TSJ, et al. Short-term effect of low-dose colchicine on inflammatory biomarkers, lipids, blood count and renal function in chronic coronary artery disease and elevated high-sensitivity C-reactive protein [J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237665.