

# 葛根通脉饮对 HCY 家兔 AS 斑块和环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白表达的影响

赵君玫, 张娜\*, 沈晓君, 刘学芳  
(河南中医学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:观察葛根通脉饮对同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)所致家兔动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)血管损伤和内质网应激(ERS)相关分子C/EBP环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(C/EBP-homologousprotein, CHOP)表达的影响,并探讨其分子机制。方法:将36只日本大耳白兔随机等分成6组。对照组饲喂基础饲料,模型组饲喂高脂饲料(基础饲料+1%胆固醇及0.02%蛋氨酸),可定组(1 mg·kg<sup>-1</sup>+高脂饲料)、葛根通脉饮低、中、高剂量组(5, 7.5, 10 g·kg<sup>-1</sup>+高脂饲料),通过高脂饮食9周复制兔动脉粥样硬化模型。取胸主动脉观察其病理改变,用组织原位杂交和Western-blotting检测胸主动脉CHOP分子表达水平。结果:形态学显示模型组血管内膜下形成典型的脂质斑块,可定组内膜下有少量的斑块形成,病变较模型组轻,葛根通脉饮低剂量组血管局部区域出现脂质斑块,葛根通脉饮中剂量组血管内膜结构紊乱,葛根通脉饮高剂量组血管内膜下有少量平滑肌细胞增生。组织原位杂交结果显示,各组中CHOP基因在血管内膜和中膜层细胞胞质中均有表达,对照组内皮细胞和平滑肌细胞胞质中可见少量棕黄色颗粒。模型组斑块结构中平滑肌细胞和泡沫细胞胞质中棕黄色颗粒高表达。与模型组比葛根通脉饮组平滑肌细胞阳性信号表达下降。Western-blotting杂交结果显示,CHOP蛋白在各组中均有表达,与对照组比较模型组CHOP蛋白表达增多,差异有统计学意义(P<0.01);与模型组比较在葛根通脉饮低、中、高剂量组中CHOP蛋白表达减少,差异均显著(P<0.01)。结论:葛根通脉饮抗AS作用机制可能与ERS相关分子CHOP的表达密切相关。可通过拮抗HCY所诱导AS的血管损伤,降低ERS相关分子CHOP在家兔胸主动脉中的表达。

**[关键词]** 葛根通脉饮; 同型半胱氨酸血症; 动脉粥样硬化; 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白; 胸主动脉  
**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0162-05  
**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210162  
**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1128.018.html>  
**[网络出版时间]** 2014-09-15 11:28

## Effect of Gegen Tongmai Yin on CHOP Expression Induced by HCY in AS Rabbit Model

ZHAO Jun-mei, ZHANG Na\*, SHEN Xiao-jun, LIU Xue-fang  
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Gegen Tongmai Yin on the endoplasmic reticulum stress related C/EBP-homologousprotein (CHOP) expression induced by homocysteine (HCY), in order to discuss anti-atherosclerosis (AS) molecular mechanism. **Method:** Thirty-six rabbits were randomly divided into 6 groups, the normal control group (the normal feed), the high-fat group (the normal feed + 1% cholesterol + 0.02% methionine), the rosuvastatin group (1 mg·kg<sup>-1</sup>+high-fat feed), the Gegen Tongmai Yin low, middle and high dose group (5, 7.5, 10 g·kg<sup>-1</sup>+high-fat feed). The rabbit AS model was induced by feeding the high-fat diet for 9 weeks. The superior segment of thoracic aorta was taken for the pathological observation, the CHOP

**[收稿日期]** 20140521(005)  
**[基金项目]** 河南省基础与前沿技术研究计划项目(072300450030);河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A310612);郑州市科技创新团队项目(121PCXTD520);本院“博士科研基金”(BSJJ2010-33)  
**[第一作者]** 赵君玫, 副研究员, 从事中医药防治心血管疾病研究, Tel:13623858181, E-mail: zhyizjm@163.com  
**[通讯作者]** \*张娜, 博士, 讲师, 从事中医药防治老年病研究, Tel:13633862857, E-mail: zhyizjm@163.com

expression was detected by situ hybridization and Western-blotting hybridization. **Result:** Pathological observation showed that the typical lipid plaque formed under the tunica intima in high-fat group, the pathological changes in the Rosuvastatin group were weaker than high-fat group, with small lipid plaque formed. The lipid plaque only formed in local areas in the Gegen Tongmai Yin low-dose group, the tunica intima structural disordered in the middle-dose group, only a small quantity cellular proliferation of smooth muscle in the high-dose group. Tissue in situ hybridization detection showed that CHOP gene expressed in the cytoplasm of tunica intima and tunica media in all groups. Small brownish yellow granules appeared in the endothelial cells and smooth muscle cells in normal control group. The brownish yellow granules were strongly expressed in the smooth muscle cells and foam cells in the high-fat group. The positive signal decreased expression in the smooth muscle cells in Gegen Tongmai Yin groups compared with the high-fat group. Western-blotting hybridization showed that CHOP protein were all expressed in 6 groups, CHOP protein expression increased in high-fat group compared with normal group. The difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ); CHOP protein expression decreased in Gegen Tongmai Yin low, middle and high dose groups, the difference was significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The Gegen Tongmai Yin's anti-AS mechanism may be correlated with the CHOP expression. The Gegen Tongmai Yin can improve the injury of blood vessel induced by HCY and depress the CHOP expression in the rabbit's thoracic aorta.

[**Key words**] Gegen Tongmai Yin; homocysteine; atherosclerosis; C/EBP-homologousprotein; thoracic aorta

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是威胁人类健康的重要疾病之一,常累及心、脑血管等重要部位而导致严重后果。近年来随着我国社会经济的发展,人们生活水平的提高,而正呈现日益年轻化的趋势,因此,抗 AS 的研究已引起医学界的高度关注。流行病学和实验研究显示同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HCY)与外周血管病、冠状动脉疾病、脑血管病存在明显的关联性,是 AS 的一个独立危险因素。研究显示 HCY 致 AS 的应激反应造成了血管内皮细胞损伤,血管内脂质的堆积、巨噬细胞的吞噬和血管平滑肌细胞的增殖,大量的游离脂质损伤了内质网,导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的出现<sup>[1-2]</sup>,近年来报道内质网应激(ERS)可能参与 AS 斑块的形成和破裂。ERS 可导致巨噬细胞凋亡,从而引起 AS 斑块不稳定性增高。ERS 通过 UPR 激活 C/EBP 同源蛋白(CHOP),CHOP 表达升高,CHOP 也被称为是 ERS 的标志之一。国外已有动物实验证实,AS 斑块内巨噬细胞的内质网应激中的 CHOP 通路激活。本研究旨在建立动脉粥样硬化模型,建模成功的基础上采用 Western blotting 方法,在基因和蛋白水平观察葛根通脉饮对 HCY 诱导的 AS 模型的 ERS 信号通路 CHOP 在 AS 中的表达变化,探讨葛根通脉饮对 AS 这一疾病发生发展的可能分子机制和有效的防治措施。

## 1 材料

1.1 动物 普通级雄性健康日本大耳白兔,5 月

龄,体重 2.0 ~ 2.2 kg,由河南康达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(豫)2010-0001。

1.2 药物与试剂 葛根通脉饮(葛根、山楂、太子参,当归尾,淫羊藿,赤芍,川芎,甘草),由河南中医学院制剂室制备。瑞舒伐他汀(阿斯利康制药有限公司,批号 115720)。同型半胱氨酸(HCY, Sigma 公司产品,纯度  $\geq 98\%$ ,批号 C-7352),CHOP(GADD153,批号 bs-1361R,相对分子质量 27 kD,北京博奥森生物公司)。HRP 标记抗鼠二抗 bs0296G-HRP, Lot 130916。HRP 标记抗兔二抗(bs0295G-HRP, Lot 019997)。SDS 胶(WB0130),ECL 化学发光液,均为上海威奥生物科技有限公司。

1.3 仪器 JY-SCZ 2 + 型垂直电泳仪(北京东方电泳设备有限公司产品),DYCZ-40D 转膜仪(北京市六一仪器厂产品),Alpha Mager 2200 紫外线成像仪(美国 Alpha Innotech Corporation)。

## 2 方法

2.1 模型建立及分组给药 白兔适应性饲养 1 周后,按体重随机分为对照组、模型组、可定组、葛根通脉饮低、中、高剂量组,每组 6 只。对照组饲喂基础饲料,模型组饲喂高脂饲料(在基础饲料中加入 1% 胆固醇及 0.02% 蛋氨酸),瑞舒伐他汀( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  + 高脂饲料)组、葛根通脉饮低剂量( $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  + 高脂饲料)组、葛根通脉饮中剂量( $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  + 高脂饲料)组、葛根通脉饮高剂量组( $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  + 高脂饲料)组,复制家兔动脉粥样硬化病变模型。饲喂 9 周后,开胸快速截取胸主动脉上

段,置 4% 多聚甲醛和液氮罐中( -196 ℃ )中保存。

**2.2 形态学观察** 取兔胸主动脉上段(4% 多聚甲醛固定),按照常规步骤进行脱水、浸蜡、包埋、切片,采用伊红-苏木素(HE)染色的方法对组织进行观察,记录结果。

**2.3 组织原位杂交** 取兔胸主动脉上段(4% 多聚甲醛固定)按常规步骤进行脱水、浸蜡、包埋,切片。参考相关文献<sup>[5]</sup>进行原位杂交:使用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶,滴加 1 mg·L<sup>-1</sup>蛋白酶 K 溶液暴露 mRNA 核酸片段,37 ℃ 孵育 10 min。PBS 洗 3 次,1% 多聚甲醛/0.1 mol·L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.4)后固定,室温固定 10 min,每张切片加 20 μL 预杂交液,恒温箱 38 ~ 42 ℃ 2 ~ 4 h。每张切片加 20 μL DNA 探针/杂交液,70 ℃,10 min 使 RNA 变性,然后放入恒温箱 38 ~ 42 ℃ 杂交过夜。杂交后洗涤。滴加蛋白封闭缓冲液,37 ℃ 30 min。滴加 1 滴兔抗地高辛-BSA,37 ℃ 60 min。PBS 洗涤 5 min × 4 次。滴加 1 滴 HRP-羊抗兔 IgG,37 ℃ 30 min。PBS 洗涤 5 min × 4 次,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,应用 Leica DMR 病理成像系统,观察 CHOP 基因表达水平。

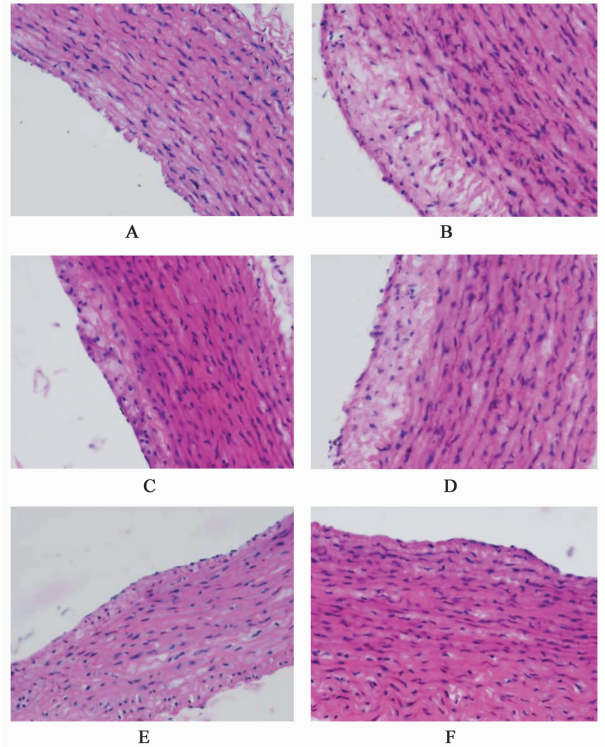
**2.4 检测胸主动脉 CHOP 分子表达水平** Western-blot 杂交:①SDS-PAGE 电泳取 35 μg 蛋白质与 5 × 蛋白上样缓冲液混合均匀后于 100 ℃ 水浴 10 min,分别上样,100 ~ 200 V 电泳至条带分离。②转膜 准备 NC 膜和 Whatman 滤纸,依次将滤纸(3 张)-凝胶-NC 膜-滤纸(3 张)置于支撑架上,4 ℃ 下 300 mA 恒流转膜,HIF-1α 蛋白转移 1.5 h,β-actin 转移 1 h。转膜完毕后,取出 NC 膜,用利春红染液染膜,检测转移效果。③封闭 抗体免疫及显色封闭:NC 膜放入一平皿中,加入足量的 5% 脱脂奶粉封闭液(TBST 配制),室温下封闭 2.5 ~ 3 h。④加一抗(Chop 1:1 000,37 ℃ 2 h;TBST 漂洗 3 次,每次 10 min;⑤加二抗(HRP 标记),37 ℃ 2 h;TBST 漂洗 3 次,每次 10 min;⑥ECL 发光液混合,待膜干后,平铺其上;待反应 5 min 后,暗室压片 5 min;显影 1 ~ 3 min,水洗,定影 1 ~ 3 min,照相。

**2.5 统计学方法** 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.5 统计软件对所得数据统计。组间均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 主动脉组织病理** 切片 HE 染色,光镜下可见对照组血管内膜光滑,内皮细胞呈规则的单层扁平形,内弹性膜明显,中膜层弹性膜形态规则,排列整齐。模型组可见血管内膜出现典型的脂质斑块,内

皮细胞缺如,内皮下可见泡沫细胞聚集,中膜平滑肌细胞大量增生并向内膜迁移,并见大量胶原纤维增生。可定组可见血管内膜有脂质斑块的出现,但病变程度较模型组明显减轻。葛根通脉饮低剂量组血管局部区域出现脂质斑块,内皮下出现泡沫细胞聚集。葛根通脉饮中剂量组血管内膜结构紊乱,中膜平滑肌细胞增生明显。葛根通脉饮高剂量组血管内膜光滑、完整,内膜下有少量平滑肌细胞增生。见图 1。



A. 对照组;B. 模型组;C. 瑞舒伐他汀 1 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
D. 葛根通脉饮 5 g·kg<sup>-1</sup>组;E. 葛根通脉饮 7.5 g·kg<sup>-1</sup>组;  
F. 葛根通脉饮 10 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)  
图 1 葛根通脉饮对兔胸主动脉组织病理的影响(HE, × 400)

**3.2 组织原位杂交检测各组 CHOP mRNA 表达** 对照组内皮细胞和平滑肌细胞胞质中可见少量棕黄色颗粒。模型组斑块结构中平滑肌细胞和泡沫细胞胞质中棕黄色颗粒高表达,阳性细胞数目显著增。与模型组比可定组平滑肌细胞和泡沫细胞阳性信号降低;葛根通脉饮组平滑肌细胞阳性信号表达下降。见图 2。

**3.3 CHOP 蛋白表达** 应用 Western blotting 检测方法对模型组与对照组、可定组、葛根通脉饮低、中、高剂量组中 CHOP 蛋白表达水平进行研究。结果显示 CHOP 蛋白在各组中均有表达,见图 3;与对照组比较,模型组 CHOP 蛋白表达增多,差异有统计学意

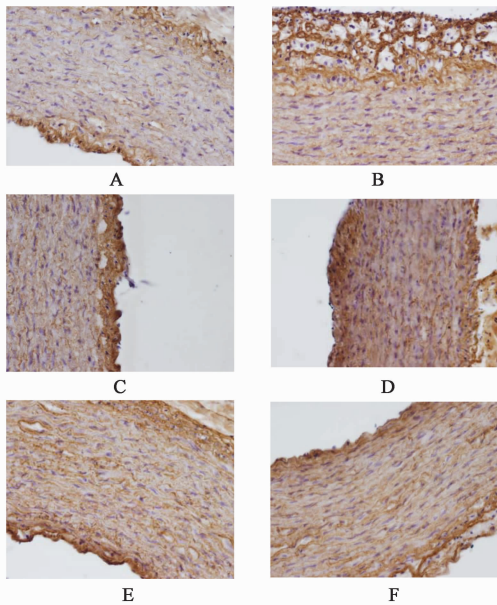
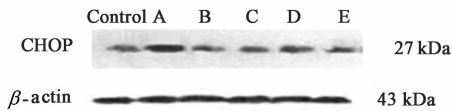


图2 葛根通脉饮对胸主动脉 CHOP 表达的影响  
(原位杂交检测, ×400)

义 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 葛根通脉饮低、中、高剂量组中 CHOP 蛋白与  $\beta$ -actin 灰度值比值较模型组中 CHOP 蛋白与  $\beta$ -actin 灰度值比值有减少趋势, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) 见表 1。



Control. 对照组; A. 模型组; B. 可定  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;  
C. 葛根通脉饮  $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D. 葛根通脉饮  $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;  
E. 葛根通脉饮  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

图3 葛根通脉饮对胸主动脉 CHOP 蛋白表达的影响 (Western blotting 杂交检测)

表1 葛根通脉饮对兔胸主动脉粥样硬化 CHOP 蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CHOP/ $\beta$ -actin
对照	-	$0.604 \pm 0.031^{1)}$
模型	-	$1.028 \pm 0.042$
瑞舒伐他汀	$1 \times 10^{-3}$	$0.762 \pm 0.039^{1)}$
葛根通脉饮	5.0	$0.808 \pm 0.049^{1)}$
	7.5	$0.778 \pm 0.038^{1)}$
	10	$0.747 \pm 0.035^{1)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

动脉粥样硬化的发病机制主要包括脂质代谢异常、内皮细胞损伤、炎症反应、VSMC 过度增殖等,而

炎症反应作为阐述动脉粥样硬化发病机制的一个重要学说已得到广泛地认可。研究表明<sup>[3-5]</sup>, 动脉粥样硬化过程是一个血管受损伤后的炎症反应过程, 炎症反应贯穿了动脉粥样硬化发生、发展的整个过程。内质网应激与动脉粥样硬化发生发展中的脂质代谢、炎症反应、细胞凋亡都有着潜在的关系, 并有可能广泛地参与动脉粥样硬化的形成过程。CHOP 是一种细胞应激相关蛋白, 研究发现 CHOP 可被 ERS 的各种刺激因素所激活。内质网应激引起的细胞凋亡一套自身的信号传递通路, 途径包含内质网应激诱导 CHOP/GADD153 表达等。笔者的研究从内质网应激蛋白 CHOP 与动脉粥样硬化的关系入手, 增加对动脉粥样硬化发病机制的新认识, 有助于揭示这一疾病发生发展的分子机制。

临床研究证实葛根通脉饮能够有效调节血脂水平, 干预 AS 斑块的发生发展, 具有较好的抗 AS 作用, 葛根通脉饮 (葛根、太子参、淫羊藿、山楂、赤芍、川芎、当归、僵蚕、炙甘草) 方中葛根通畅血脉, 升阳解痉为君药; 山楂活血散瘀、化痰行气, 赤芍、川芎行血活血, 共助葛根散瘀通脉为臣; 当归、淫羊藿、太子参, 补气养血, 以达气帅血行, 通而不滞之功, 为佐药; 炙甘草为使, 调和诸药, 补中益气, 固护脾胃<sup>[6]</sup>。君药主要成分葛根素对血管活性功能影响显著, 能有效调节血管活性, 抑制动脉硬化, 促进血管软化, 改善脑循环, 在心脑血管系统疾病治疗中得到广泛应用。有研究显示, 葛根素能够拮抗 HCY 诱导的血管内皮细胞凋亡, 并且下调 GRP78 基因表达水平可能是其作用机制之一<sup>[7]</sup>。体外实验证实葛根素能够抑制血管平滑肌增殖, 使细胞停留在  $G_0/G_1$  期, S 期细胞减少, 其机制与下调 cyclinE、上调 p27 蛋白表达相关<sup>[8]</sup>。另有报道显示葛根素可诱导体外培养的兔血管平滑肌细胞凋亡, 筛选出的葡萄糖蛋白 94 基因在兔动脉斑块的细胞质中高表达<sup>[9]</sup>。淫羊藿也具有改善心脑血管疾病的功能, 多项研究证实, 淫羊藿可以通过降低血脂, 抑制细胞黏附分子 (ICAM-1) mRNA 表达, 促进 VSMC 凋亡, 以及抗血管氧化作用, 抗高脂血症所致早期 AS 形成, 淫羊藿苷对动脉粥样硬化兔动脉内皮细胞损伤有显著的保护作用<sup>[10]</sup>, 也有报道显示淫羊藿苷可以拮抗 HCY 诱导的血管平滑肌细胞过度增殖, 促进其凋亡。

中药具有广阔的抗 AS 临床应用前景, 目前中药抗动脉粥样硬化的研究仅停留在细胞水平, 对于确切的信号转导通路研究尚未见报道。因此, 为在

分子层面揭示中药葛根通脉饮抗 AS 药理学机制,研究其对 ERS 网络整合调节不失为好的切入点。本研究以 AS 动物、HCY 诱导血管损伤和内质网应激(ERS)相关分子 CHOP 表达为观察研究对象,以内质网应激通路为切入点,对葛根通脉饮抗 AS 分子药理机制和作用靶点进行研究,用葛根通脉饮低、中、高剂量组干预,西药可定作为阳性对照药进行实验,结果显示:主动脉组织切片 HE 染色,光镜下见对照组血管内膜光滑,内皮细胞完整;模型组镜下可见明显的动脉粥样硬化斑块,血管内皮细胞损伤、脱落,中膜 VSMC 增生并迁入内膜,说明造模成功;可定组可见血管内膜有脂质斑块的出现,但病变程度较模型组明显减轻,葛根通脉饮低、中、高剂量组镜下未见明显动脉粥样硬化病变,表明中药葛根通脉饮可阻断或逆转 AS 病变进展,其中葛根通脉饮高剂量组效果最佳。组织原位杂交,模型组与对照组比较,聚集颗粒明显增多,表明模型组家兔血管内皮细胞 CHOP 基因表达水平高于对照组,可定组平滑肌细胞和泡沫细胞阳性信号降低,葛根通脉饮低、中、高剂量组血管内皮细胞 CHOP 基因表达水平与模型组比较,聚集的棕黄色颗粒明显减少,提示葛根通脉饮通过减缓 ERS 发挥抗 AS 药理效应,CHOP 基因是其作用靶点之一。

本研究表明葛根通脉饮能够明显改善胸主动脉血管壁的损伤,抑制 AS 斑块的形成。葛根通脉饮组与可定组 CHOP 分子的表达水平显著低于模型组,提示葛根通脉饮保护血管的机制之一是减轻 ERS 导致的细胞凋亡,CHOP 基因是其一个重要的作用靶点。

## [参考文献]

- [ 1 ] 丁晶,曾超美,杜军保. 内质网应激与动脉粥样硬化 [J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(13):1013.
- [ 2 ] Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2010, 107(7):839.
- [ 3 ] Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(9):2333.
- [ 4 ] 张峰娟,边云飞,刘金帅. 内质网应激与动脉粥样硬化的相关研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(1):94.
- [ 5 ] Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, et al. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bel-2 homology 3-only member PUMA [J]. J Neurosci, 2010, 30(50):16938.
- [ 6 ] 呼海涛,张妍,沈晓君,等. 葛根通脉饮下调 NF- $\kappa$ B 表达干预动脉粥样硬化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4):179.
- [ 7 ] 赵君攻,魏群,毕红征,等. 葛根素对兔血管内皮细胞凋亡及凋亡基因 GRP 78 表达水平的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5):1177.
- [ 8 ] 沈晓君,魏群,陈芳,等. 葛根素对血管平滑肌细胞周期相关蛋白表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(1):69.
- [ 9 ] 荆涛,王绿娅,王伟,等. 葛根素调节血管平滑肌细胞凋亡相关基因在斑块组织中表达的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(9):667.
- [ 10 ] 王东芝,李东万,张守刚. 淫羊藿在心血管疾病方面的研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(1):107.

[责任编辑 聂淑琴]