

丹蒞片对兔动脉粥样硬化模型 ERS 相关基因表达的影响

曹珊¹, 王坦¹, 茹煜华², 刘紫阳¹, 沈晓君¹, 朱艳琴¹

(1. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450046; 2. 苏州大学医学部, 江苏苏州 215123)

【摘要】 目的:建立兔动脉粥样硬化模型,研究丹蒞片对兔粥样硬化病变及内质网应激(ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP)表达的影响,为丹蒞片临床的应用提供实验依据。方法:雄性日本大耳白兔24只随机分为正常组、模型组、可定组和可定+丹蒞片联合用药组,每组6只。正常组饲喂普通饲料,模型组在普通饲料中加入2%胆固醇及0.02%蛋氨酸;可定组、可定+丹蒞片组在普通饲料中加入2%胆固醇及0.02%蛋氨酸及相应的对照药物,复制家兔动脉粥样硬化病变模型。分别在用药前与饲养9周后检测胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)值,载脂蛋白A(ApoA),载脂蛋白B(ApoB);饲养9周后取实验动物胸主动脉上段,苏木素-伊红(HE)常规染色后观察组织形态变化;应用原位杂交技术检测BIP基因表达。结果:与正常组比较,模型组兔血脂TC,TG,LDL-C,ApoB含量明显升高,HDL-C,ApoA含量明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,可定组、丹蒞片联合用药组明显降低兔血脂TC,TG,LDL-C,ApoB含量,明显升高HDL-C,ApoA含量($P < 0.01$)。HE染色正常组血管内膜形态正常;模型组内膜严重增生,内皮细胞损伤;可定组血管内膜轻度增生;可定+丹蒞片组血管内膜形态接近正常。原位杂交结果显示,模型组BIP蛋白的表达明显升高;可定组及可定+丹蒞片组可下调BIP蛋白的表达。结论:丹蒞片联合可定能延缓动脉粥样硬化的发展,且效果显著。

【关键词】 丹蒞片; 动脉粥样硬化; 内质网应激; 免疫球蛋白重链结合蛋白

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2015)23-0126-04

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230126

Influenced of Danlou Tablet on ERS Related Genes Expression in Atherosclerosis Rabbit Models

CAO Shan¹, WANG Tan¹, RU Yu-hua², LIU Zi-yang¹, SHEN Xiao-jun¹, ZHU Yan-qin¹ (1. School of Basic Medical Sciences of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Medical department of Soochow University, Suzhou 215123, China)

【Abstract】 Objective: To establish atherosclerosis rabbit models, study the effect of Danlou tablet on atherosclerosis and the expression of endoplasmic reticulum stress (ERS) related genes immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP), and provide experimental basis for clinical application of Danlou tablet. **Method:** The 24 male big-eared Japanese rabbits were randomly divided into normal group, model group, Rosuvastatin group, Danlou tablet + Rosuvastatin group, with 6 rabbits in each group. Normal group was fed with standard diet, while in model group, 2% cholesterol and 0.02% methionine were added in standard diet. In Rosuvastatin group and Danlou tablet + Rosuvastatin group, 2% cholesterol, 0.02% methionine and the corresponding control drug were added in the standard diet to establish atherosclerosis rabbit models. Before medication and after 9 weeks of treatment, cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), apolipoprotein A (ApoA) and apolipoprotein B (ApoB) values were detected. After 9 weeks of treatment, thoracic aorta segment was taken from the experiment animals to observe morphological changes by HE. In situ hybridization was used to detect BIP gene expression. **Result:** Compared with the normal group, TC, TG, LDL-C and ApoB levels in model group were significantly higher, while HDL-C and ApoA levels were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the model group, TC, TG, LDL-C and ApoB levels in Rosuvastatin group and Danlou tablet + Rosuvastatin group were significantly lower, while HDL-C and ApoA levels were significantly higher ($P < 0.01$). HE staining showed normal endangium morphology in normal group, severe

【收稿日期】 20141203(003)

【基金项目】 河南省基础与前沿技术研究计划项目(112300410156);郑州市科技创新团队项目(121PCXTD520);河南省高等学校青年骨干教师计划项目(2013GGJS-093)

【第一作者】 曹珊, 硕士, 副教授, 从事方剂配伍规律研究及中西医结合防治研究, Tel:0371-65676898, E-mail: caoshan2000@163.com

【通讯作者】 *朱艳琴, 硕士, 教授, 从事肿瘤病理及中医药防治研究, Tel:0371-65676898, E-mail: jc.zyqin@163.com

hyperplasia of endometrium and endothelial cell damages in model group, mild hyperplasia of endometrium in Rosuvastatin group, and close to normal endangium morphology in Danlou tablet + Rosuvastatin group. In situ hybridization results showed that BIP protein expression was significantly increased in model group, and Rosuvastatin group and Danlou tablet + Rosuvastatin group could down-regulate BIP protein expressions. **Conclusion:** Danlou tablet combined with Rosuvastatin can delay the development of atherosclerosis and have significant therapeutic effect.

[Key words] Danlou tablet; atherosclerosis; endoplasmic reticulum stress; immunoglobulin heavy chains binding protein

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是最常见的危害人类健康的心血管疾病之一。近年来,随着生活水平的提高,我国 AS 发病率呈上升趋势,发病年龄呈年轻化趋势,已成为危害人类生命健康的重要因素^[1]。AS 病因及发病机制复杂,目前认为血管内皮损伤是 AS 形成的始动环节,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)迁移至血管内皮下并大量增生是 AS 发病的主要原因,理论上讲,抑制 VSMC 增生并促进其凋亡可以达到治疗 AS 的作用。研究发现,AS 和血管内皮细胞的凋亡及 VSMC 增殖均与内质网应激有关^[2-3]。现代医学认为 AS 的发生与血脂异常、血管壁炎症反应、内皮细胞损伤、平滑肌致突变等有关。祖国医学认为 AS 主要缘于“气虚血瘀,痰浊痹阻”,治疗旨在益气活血,化痰通络。本研究所应用的丹蒺片是以丹参、瓜蒌等为主组成的痰瘀同治的中成药,具有宽胸通阳,化痰散结,活血化瘀功效,临床多用于痰瘀互结所致的胸痹心痛等的治疗。本课题组采用日本大耳白兔进行 AS 造模^[4],观察研究丹蒺片对 AS 病变及内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chains binding protein, BIP)表达的影响,探讨丹蒺片抗 AS 的作用和可能机制。

1 材料

1.1 动物 健康日本大耳白兔 24 只,雄性,5 月龄,体重 2~2.5 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 药物及试剂 胆固醇(美国 Amresco 公司,批号 0443),丹蒺片(吉林康乃尔药业有限公司,批号 20120201),瑞舒伐他汀(可定,阿斯利康制药有限公司,批号 115720),L-蛋氨酸(美国 Amresco 公司,批号 1112c321),多聚甲醛(上海仁宇化工有限公司,批号 F20110524),无水乙醇、二甲苯(上海南翔试剂有限公司,批号分别为 20140405,20140526),苏木素、伊红(北京恒业中远化工有限公司,批号分

别为 G1140,850415),BIP 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 cat00872122)。

1.3 仪器 LX20 型全自动生化分析仪(美国 Beckman Coulter 公司),SW-CJ-A 型超净工作台(苏州市吴江明净化设备厂),BCD-175 型冰箱(青岛海尔集团),B-4 型 pH 计(上海虹益仪器有限公司),ME5-F 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 建立兔 AS 动物模型 大耳白兔 24 只,适应性普通饲料喂养 1 周。随机分为正常组,模型组,可定组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),可定($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) + 丹蒺片($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,每组 6 只。正常组饲喂普通饲料,模型组在普通饲料中加入 2% 胆固醇及 0.02% 蛋氨酸;可定组,可定 + 丹蒺片组在普通饲料中加入 2% 胆固醇及 0.02% 蛋氨酸及相应的对照药物,单笼喂养。每日定时定量饲喂 2 次,连续饲喂 9 周,建立兔 AS 病变模型。

2.2 血脂检测 可定组与加丹蒺组分别于用药治疗前、用药治疗 9 周后用真空采血管采血 5 mL 测定胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),载脂蛋白 A(ApoA),载脂蛋白 B(ApoB)。

2.3 胸主动脉标本采集 ip 4% 戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,麻醉后仰卧位固定于兔固定台,剪去左胸前区被毛,75% 乙醇局部皮肤消毒,用手术刀在剑突下端上方 2 cm 处正中位切开胸骨,沿胸骨正中向上用剪刀延长切口约 10 cm,用乳突牵开器轻轻牵开肋骨,可见心包及搏动之心脏。用眼科剪将心包前部剪开,可见胸主动脉,快速截取胸主动脉上段迅速至液氮罐中保存。

2.4 病理形态学检查 对所取血管进行常规处理,脱水、浸蜡、包埋和切片,切片厚度为 $2 \mu\text{m}$,伊红-苏木精(HE)染色,显微镜下观察组织形态学变化。

2.5 组织原位杂交 对石蜡包埋组织进行常规切

片,按试剂盒说明操作,进行预实验,找到合适的探针浓度,实验结果进行描述记录。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件对所得数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对动脉粥样硬化兔血脂 TC, TG, HDL-C,

LDL-C, ApoA, ApoB 含量的影响 与正常组比较,模型组兔血脂 TC, TG, LDL-C, ApoB 含量明显升高,兔血脂 HDL-C, ApoA 含量明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,可定组、可定与丹莪片联合用药组均能明显降低兔血脂 TC, TG, LDL-C, ApoB 含量,明显升高兔血脂 HDL-C, ApoA 含量($P < 0.05$)。联合用药组与可定组比较提示联合用药效果优于单纯可定治疗($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 丹莪片对动脉粥样硬化兔血脂 TC, TG, HDL-C, LDL-C, ApoA, ApoB 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Danlou tablet on TC, TG, HDL-C, LDL-C, ApoA, ApoB level in rabbit ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

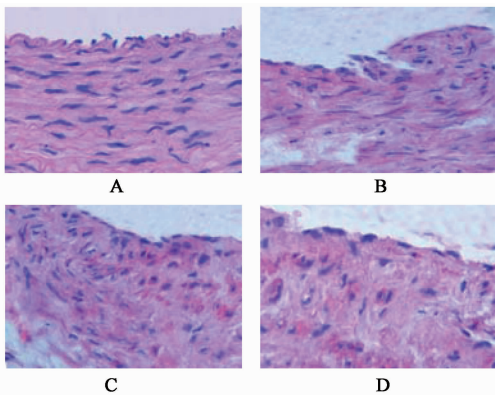
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	ApoA/g·L ⁻¹	ApoB/g·L ⁻¹
正常	-	3.20 ± 0.46	0.75 ± 0.34	1.35 ± 0.20	2.15 ± 0.54	1.17 ± 0.27	0.82 ± 0.31
模型	-	6.93 ± 0.61 ¹⁾	2.98 ± 1.12 ¹⁾	0.79 ± 0.24 ¹⁾	3.73 ± 0.46 ¹⁾	0.66 ± 0.19 ¹⁾	1.63 ± 0.44 ¹⁾
可定	1	5.14 ± 0.74 ²⁾	1.94 ± 0.68 ²⁾	1.47 ± 0.42 ²⁾	2.65 ± 0.33 ²⁾	1.35 ± 0.22 ²⁾	1.05 ± 0.37 ²⁾
可定 + 丹莪片	1 + 500	4.27 ± 0.53 ^{2,3)}	1.12 ± 0.73 ^{2,3)}	1.75 ± 0.32 ²⁾	2.26 ± 0.34 ^{2,3)}	1.75 ± 0.24 ^{2,3)}	0.83 ± 0.24 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;联合用药组与可定组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对动脉粥样硬化兔主动脉 AS 病变的影响

正常组血管内膜无增生现象,内皮细胞排列完整,中膜平滑肌排列整齐,细胞极性良好。模型组内膜增厚明显并伴有损伤和脱落,中膜血管平滑肌细胞增生,细胞外基质增生。可定组可见少数血管内皮细胞损伤,中膜细胞外间质轻度增生。联合用药组血管内膜完整,内皮细胞损伤不明显,中膜平滑肌细胞轻度增生。与模型组相比较,可定组和联合用药组兔主动脉 AS 病变明显延缓。见图 1。

在细胞质中表达增高,与模型组相比较棕黄色颗粒数量差别不大但颜色淡,说明 BIP 基因表达量减少。联合用药组与模型组比较棕黄色颗粒数量减少,颜色较淡,说明丹莪片可下调 BIP 基因表达,提示丹莪片通过减缓 ERS 发挥对 AS 的治疗作用。见图 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 可定组;D. 丹莪片 + 可定组(图 2 同)

图 1 丹莪片对动脉粥样硬化兔主动脉组织病理学的影响(HE, ×100)

Fig.1 Effects of Danlou tablet on aortic tissue pathology in AS rabbit (HE, ×100)

3.3 原位杂交检测 BIP 表达结果 正常组 VSMC 胞质内可见棕黄色颗粒表达为阳性,模型组与正常组进行比较棕黄色颗粒表达明显增多,说明 BIP 基因表达水平增高。可定组与正常组比较棕黄色颗粒

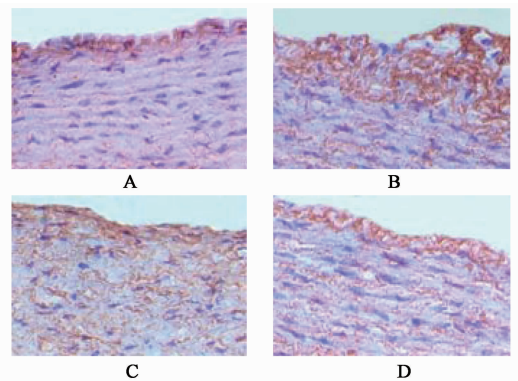


图 2 丹莪片对动脉粥样硬化兔主动脉血管内皮细胞 BIP mRNA 表达的影响(原位杂交, ×100)

Fig.2 Effects of Danlou tablet on aortic BIP mRNA in AS rabbit (ISH, ×100)

4 讨论

内质网应激(ERS)是指由于某种原因导致细胞内质网稳态失衡、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程^[5]。当加入内质网应激诱导物质和炎症促进物质后,可强烈诱导白细胞的黏附,刺激炎症反应和 VSMC 的增生^[6]。内质网作为信号传导的枢纽平台,对于细胞凋亡过程发挥着重要的调控作用。内质网应激通过诱导细胞凋亡影响 AS 的发展,细胞凋亡在斑块形成中的不同作用取决于斑块

进展的不同过程。因此,ERS 在平衡细胞存活和凋亡之间发挥着重要的调节作用,随着 AS 病变的演进,使这种平衡向凋亡的方向偏移,最终促进了 AS 斑块的发生发展。另外,AS 的形成通常与血脂异常关系密切。研究发现,血脂数值中 TC 或 LDL-C, HDL 是与 AS 发生发展相关的几种脂蛋白,ApoA 和 ApoB 又是与 LDL-C 和 HDL-C 有相关性的 2 种载脂蛋白,可被选作为监测 AS 疾病发病独立危险因素的重要因子^[7-8]。

祖国医学认为,AS 当属中医本虚标实之“痰浊血瘀”的范畴。“痰浊证”形成的外因为过食高粱厚味,内因则为脏腑功能失调,此外肥胖体质亦是其重要因素。“血瘀证”是指机体内血液停滞,主要是离经之血蓄积体内,或血运不畅阻滞于经脉或脏器之内。AS 斑块破裂、血小板激活凝血状态、血栓形成等视为“血瘀证”范畴。因此说痰瘀互结是 AS 的主要病因病机。针对痰瘀互结这一病机,提出了“痰瘀同治”的治则。丹蒺片主要用于痰瘀互结所致的胸痹心痛,由丹参、瓜蒌皮、川芎、薤白、葛根、赤芍、泽泻、黄芪、骨碎补、郁金等组成。现代研究证实,丹蒺片在稳定、逆转 AS 斑块、降低血脂、改善血管内皮细胞功、抗炎等方面有突出的防治优势。丹蒺片以丹参、瓜蒌为君,活血化瘀,宽胸散结;以川芎、薤白、赤芍、郁金为臣,入心经行气开郁、活血化瘀;佐以黄芪补气以行血、葛根升发清阳,又引温肾之品上交于心;骨碎补活血补肾,泽泻化痰湿、泻肾浊,与葛根一升一降,使邪出有路。诸药相伍,气血并调,攻补兼施,标本兼治,共奏化痰消瘀,调和血脉之功,最终达痹宜痛止之效,临床常用于冠心病心绞痛等的治疗。本组实验研究表明,丹蒺片联合可定对高脂血症治疗效果显著,为一种降脂的有效药。杨振等^[9]的研究发现丹蒺片除具有明显的调节血脂功能外,还可显著地保护高脂血症大鼠主动脉血管内皮细胞。刘玉梅等^[10]的实验研究发现丹蒺片可降低高脂血症大鼠血清中 NOS 含量,并能抑制血浆中 ET 和 Ang II 的水平,从而有效地改善血管内皮细胞功能。

本实验中与单纯使用可定相比,丹蒺片联合可定组在上调 AS 兔血清中的 HDL-C 和 ApoA 和下调 TC, TG, ApoB 含量效果更加显著,能够达到改善血脂水平的目的;病理组织学结果显示,丹蒺片联合可定组血管内膜完整,内皮细胞损伤不明显,中膜平滑肌细胞轻度增生,与模型组相比较,AS 病变明显延缓,提示丹蒺片对 AS 有一定的治疗作用;本实验成功

建立兔 AS 模型,将丹蒺片和可定联合用药组与可定组进行比较,发现丹蒺片联合用药组血管损伤轻于可定组,分析兔胸主动脉血管损伤的作用机制,丹蒺片联合用药通过综合调控 ERS 信号通路中 BIP mRNA 来延缓或逆转 AS 的出现。组织原位杂交结果显示:丹蒺片联合可定组主动脉壁 BIP mRNA 表达明显低于模型组。推测丹蒺片保护血管的机制之一是减轻 ERS 导致的细胞损伤,发挥抗 AS 疗效。本实验对探讨丹蒺片延缓或改善 AS 病变的分子药理学机制有一定的意义,也为丹蒺片防治 AS 所引起的心脑血管疾病的临床应用提供了动物实验依据。

[参考文献]

- [1] 刘宇,刘如秀. 中医药治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的研究进展[J]. 河北中医, 2013, 35(11): 1746-1748.
- [2] Croons V, De Meyer, Houten S M, et al. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(3):269-275
- [3] 黄明宜,王建新,沈晓君. 丹参酮 II_A 拮抗血管内皮细胞凋亡相关机制研究[J]. 中医学报, 2013, 28(4): 533-534.
- [4] 沈晓君,高爱社,关怀敏,等. 丹参酮 II_A 对兔动脉粥样硬化病灶凋亡相关基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1):90-92.
- [5] 方希,薛丹婷,方立,等. 内质网应激与动脉粥样硬化[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(8): 947-951.
- [6] 刘芳芳. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体及其受体 DR5 对动脉粥样硬化斑块形成的影响[D]. 济南:山东大学, 2014.
- [7] Gotto A M, Brinton E A. Assessing low levels of highdensity lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: Aworking group report and update[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(5): 717-724.
- [8] Walldius G, Jungner I, Holme I, et al. High apolipoprotein B, lowapolipoprotein A1, and improvement in the prediction of fatalmyocardial infarction(AM ORIS study): a prospective study[J]. Lancet, 2001, 358(9298):2026-2033.
- [9] 杨振,洪铁,刘玉梅,等. 丹蒺片对高脂血症及血管内皮损伤大鼠的保护作用[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(6):491-494.
- [10] 刘玉梅,杨振,洪铁,等. 丹蒺片对动脉内皮损伤大鼠 ET、Ang II、NOS 的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(5):403-405.

[责任编辑 周冰冰]