

# 淫羊藿苷对大鼠颈总动脉内膜损伤后骨桥蛋白表达的影响

高爱社<sup>1</sup>, 苗莉<sup>2</sup>, 沈晓君<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南武警总队医院, 郑州 450006)

**[摘要]** 目的: 研究淫羊藿苷对大鼠颈动脉内膜损伤后新生内膜内骨桥蛋白表达的影响。方法: 取大鼠 42 只, 随机分为正常对照组 6 只, 模型组和淫羊藿苷高、低剂量组 (120, 60 mg·kg<sup>-1</sup>) 各 12 只。后 3 组建立鼠颈动脉球囊损伤术后狭窄模型, 淫羊藿苷组术前 6 d 开始给予淫羊藿苷灌胃至实验结束; 模型对照组以等体积生理盐水灌胃。术后 14 d 和 28 d 分批处死动物。取各组实验动物颈动脉损伤段, 常规石蜡切片, 免疫组织化学 S-ABC 法检测骨桥蛋白(OPN)的表达; RT-PCR 检测 OPN mRNA 的表达。结果: 在球囊损伤后 14, 28 d 时, 淫羊藿苷高、低剂量组 OPN mRNA 的表达 14 d 时为 (0.58 ± 0.01), (0.42 ± 0.02), 28 d 时为 (0.28 ± 0.02), (0.33 ± 0.03), 明显低于模型组 14 d (0.71 ± 0.02), 28 d (0.62 ± 0.01); 高、低剂量组之间无明显差异。淫羊藿苷高、低剂量 OPN 蛋白表达量 14 d 时为 (20.21 ± 3.67), (32.53 ± 12.16), 28 d 时为 (26.14 ± 4.64), (24.16 ± 11.35), 明显低于模型组 14 d (71.24 ± 13.25), 28 d (46.13 ± 12.31), 均  $P < 0.01$ 。结论: 淫羊藿苷在动脉损伤后可调控 OPN 的表达, 抑制平滑肌细胞的迁移, 从而减轻球囊损伤后新生内膜的增生。

**[关键词]** 淫羊藿苷; 新生内膜; 骨桥蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0163-03

## The Effects of Icariin on Expression of OPN mRNA after Vascular Injury in Rats

GAO Ai-she<sup>1</sup>, MIAO Li<sup>2</sup>, SHEN Xiao-jun<sup>1\*</sup>

(1. Hena College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Department of Cardiology, Henan Army Police Forced Hospital, Zhengzhou 450006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Icariin on the levels of osteopontin (OPN) in rat carotid artery injured by balloon and to evaluate the mechanisms of inhibiting intima hyperplasia. **Method:** Forty-two rats were randomly divided into 4 groups: control group, model group and icariin 60 mg·kg<sup>-1</sup> group and icariin 120 mg·kg<sup>-1</sup> group. Rat carotid balloon injury restenosis model was established. Rats of icariin group were treated with drugs for 2 or 4 weeks. The expression of OPN mRNA were assessed by RT-PCR and immunohistochemistry strategy analysis. **Result:** Compared with model group, the icariin group significantly decreased the expression of OPN at 14 and 28 day after injury ( $P < 0.01$ ). The difference between two doses was not significant. **Conclusion:** Icariin could inhibit neointimal proliferation of rat carotid artery injured by balloon. The mechanism might be related to the effects of icariin for decreasing level of OPN, and inhibiting the migration and proliferation of vascular smoothmuscle cells.

**[Key words]** icariin; neointima; osteopontin (OPN)

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的黏附、增殖与迁移是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管重塑性疾病的细胞病理学基础。近年研究表明, 多种生长因子和细胞

外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分如骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、纤连蛋白等均参与 VSMC 黏附、增殖与迁移的调节过程<sup>[1-3]</sup>。淫羊藿苷 (icariin) 是从淫羊藿茎叶中提取的淫羊藿总黄酮中主要有效成

**[收稿日期]** 2011-09-14

**[基金项目]** 河南省教育厅自然科学基金项目 (2007310005); 河南科技攻关计划项目 (0624420026)

**[第一作者]** 高爱社, 硕士, 副教授, 从事中药防治心血管疾病及机制的研究, Tel: 13903860113, E-mail: gaoaishe@126.com

**[通讯作者]** \* 沈晓君, 教授, 从事中药防治心血管疾病及机制的研究, Tel: 13526669581, E-mail: jc\_sxjun@hactem.edu.cn

分,具有补肾壮阳、祛风湿、强筋骨等功效。近年来的研究表明其对心脑血管疾病有很高的应用价值,对改善冠心病患者心绞痛等症状有较好疗效<sup>[4]</sup>。但是淫羊藿苷对血管损伤后 ECM 表达的的影响研究很少,尤其是对 OPN 的表达影响尚未见报道。本研究以大鼠颈动脉球囊损伤新生内膜增生为模型,探讨淫羊藿苷是否通过调控 OPN 的表达,从而影响 VSMC 黏附、增殖与迁移,减少 ECM 的合成,抑制血管损伤后新生内膜的增生。

### 1 材料与方法

**1.1 药物及仪器** 淫羊藿苷,由中国药品生物制品检定所提供,批号 200415;鼠抗 OPN 单克隆抗体、SABC 试剂盒购自武汉博士德公司;Trizol 试剂盒,德国 Roche 公司;OPN 和 GAPDH 引物由上海生物工程公司合成;RT-PCR 试剂盒, Promega 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。2.0F PTCA 球囊导管(球囊大小 2.0 mm × 10 mm)、导引钢丝和压力泵购自美国 Cordis 公司;图像分析系统 Image proplus 4.5。

**1.2 大鼠颈总动脉内膜损伤模型复制与分组给药** 成年雄性 SD 大鼠由郑州大学实验动物中心提供,体重 300 ~ 350 g,合格证号 SCXK(豫)2005-0001。随机取正常组 8 只,其余 36 只随机分为模型组及淫羊藿苷高、低剂量组各 12 只。戊巴比妥钠 30 mg·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉大鼠,分离左颈总动脉和颈外、颈内动脉分叉处,用无创血管夹夹闭左颈总动脉近心端及颈内动脉,结扎颈外动脉远端,暂时阻断血流;在颈外动脉切一小口,将导引钢丝及直径 2.0 mm 的 2.0 F 球囊导管从切口插入左颈总动脉,导引钢丝尖端插至主动脉弓;以 1.5 atm 大气压(1 atm = 101.325 kPa)充盈球囊,来回抽动 3 次以剥脱内皮;撤出球囊及导引钢丝,结扎颈外动脉,恢复颈总动脉至颈内动脉血流,缝合切口。给药组于术前 7 d 及术后连续 ig 淫羊藿苷 60,120 mg·kg<sup>-1</sup> 共 14 d 和 28 d;模型组术后予蒸馏水 ig,3 mL/只。

**1.3 标本制备及处理** 术前处死 6 只正常大鼠。于术后 14,28 d,每组 6 只大鼠,腹腔麻醉,分离颈总动脉,剪下球囊损伤段 3 cm,一部分血管用 PBS 反复冲洗后置 4% 多聚甲醛中固定,常规制片,免疫组织化学 S-ABC 法检测 OPN 蛋白的表达;另一部分血管用 DEPC 水反复冲洗后置入液氮内,用于 RT-PCR 检测。

**1.4 颈动脉 OPN 蛋白表达的检测** 采用免疫组织化学 S-ABC 法检测 OPN 蛋白的表达。依试剂盒说明操作。以磷酸盐缓冲液代替一抗,做阴性对照,

并对结果采用 Image pro plus 5.0 图像分析系统进行半定量分析。结果判断如下:每个切片选 5 个高倍视野,细胞浆内有棕色染色者为阳性细胞,在高倍视野下对切片上阳性区域拍照;测定每个视野的积分吸光度(integral optical density, IA),取平均值代表标本蛋白的相对量。

**1.5 颈动脉 OPN mRNA 表达的检测** 采用 RT-PCR 方法,用 Trizol 试剂,常规抽提组织总 RNA。用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和含量, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (适当比值在 1.6 ~ 2.0),并计算浓度。用一步法进行逆转录扩增。RT 反应条件:70 °C 反应 45 min → 95 °C 反应 5 min → 5 °C 反应 5 min。扩增基因的引物序列:OPN 上游 5'-TGAAGCCTGACCCATCTC-3', 下游 5'-GTCTTCCCCTTGCTGTCC-3', 扩增片段长度 593 bp;内参 GAPDH 引物序列:上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCTGTGTGCTGTA-3', 扩增片段长度 452 bp。PCR 反应条件:94 °C, 4 min → 94 °C 变性 50 s → 退火 50 s → 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环 → 72 °C 温育 10 min → 4 °C 结束反应。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 FR-980 软件进行灰度扫描,样品中目的基因(OPN mRNA)相对表达量 = 目的基因条带 IA / 内参 GAPDH 条带 IA。

**1.6 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计,多组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 对大鼠颈动脉损伤后 OPN 蛋白表达的影响** OPN 蛋白在正常血管壁中的表达非常微弱。在球囊损伤 14 d 时,模型组 OPN 蛋白表达量明显高于正常组,淫羊藿苷干预组 OPN 蛋白表达量显著低于模型组(P < 0.01)。在球囊损伤 28 d 时,模型组 OPN 表达水平与 14 d 相比阳性强度稍有所减弱,但淫羊藿苷干预组 OPN 表达量明显低于模型组(P < 0.01),淫羊藿苷高、低剂量组比无显著差异。见表 1。

表 1 颈动脉内 OPN 蛋白表达的图像分析结果( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | 14 d                        | 28 d                        |
|------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常   | -                      | 5.21 ± 2.13                 | 5.21 ± 2.13                 |
| 模型   | -                      | 71.24 ± 13.25               | 46.13 ± 12.31               |
| 淫羊藿苷 | 60                     | 32.53 ± 12.16 <sup>1)</sup> | 24.16 ± 11.35 <sup>1)</sup> |
|      | 120                    | 30.21 ± 3.67 <sup>1)</sup>  | 26.25 ± 4.64 <sup>1)</sup>  |

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.01(表 2 同)。

**2.2 对大鼠颈动脉损伤后 OPN mRNA 表达的影响** OPN mRNA 表达的结果与 OPN 蛋白检测结果呈相同趋势。正常血管壁中 OPN mRNA 的表达很弱。

14 d时,模型组 OPN mRNA 表达显著高于正常组,淫羊藿苷干预组 OPN mRNA 表达水平较模型组低( $P < 0.01$ )。28 d时,模型组的 OPN mRNA 表达水平有所下降,但淫羊藿苷组 OPN mRNA 表达量降低更明显,淫羊藿苷高、低剂量组比无显著差异。见表2。

表2 淫羊藿苷对颈动脉内 OPN mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | 14 d                      | 28 d                      |
|------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常   | -                      | 0.12 ± 0.01               | 0.12 ± 0.01               |
| 模型   | -                      | 0.71 ± 0.02               | 0.62 ± 0.01               |
| 淫羊藿苷 | 60                     | 0.42 ± 0.02 <sup>1)</sup> | 0.33 ± 0.03 <sup>1)</sup> |
|      | 120                    | 0.38 ± 0.01 <sup>1)</sup> | 0.28 ± 0.02 <sup>1)</sup> |

### 3 讨论

在动脉粥样硬化斑块形成、血管再狭窄的发生发展过程中,血管平滑肌细胞的黏附、增殖与迁移是其重要的病理学基础,位于血管中膜的 VSMC 从收缩型转化为合成型并向内膜下迁移,在内膜进行大量增殖,合成与分泌大量 ECM,使血管壁重塑。因此如何防治平滑肌细胞的黏附、增殖与迁移是防止上述疾病的关键所在。多种生长因子和 ECM 成分参与 VSMC 黏附、增殖与迁移的调节过程<sup>[1-2]</sup>。其中 OPN 是 ECM 中一种重要的功能性蛋白,含有 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列,OPN 作为细胞信号分子,通过 RGD 序列与细胞表面的整合素家族中  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 1$  和  $\alpha v\beta 5$  结合,在 ECM 和细胞黏附过程中起重要作用。其中  $\alpha v\beta 3$  是 OPN 的主要受体,微环境中这一结构表明 OPN 在细胞黏附、迁移中起着重要的作用<sup>[5-6]</sup>。研究发现,OPN 在正常血管壁中几乎不表达,但在病理损伤如动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄患者血管,其表达显著增加。Giachelli 最早提出 OPN 可能参与新生内膜生成,并可作为 VSMC 激活的标志<sup>[3]</sup>。在动物实验模型中,血管内皮损伤后,内皮细胞和 VSMC 内 OPN 表达迅速上调,7 d 后达到高峰,持续 14 d 后开始下降,这与 VSMC 向新生内膜的迁移时程相一致。损伤 4 周后,平滑肌细胞迁移降至最低,内膜增厚明显减缓,此时 OPN 含量也明显减少,说明 OPN 参与了新生内膜的生成<sup>[7]</sup>。在离体实验中亦发现 OPN 可呈剂量-效应关系促进 VSMC 的黏附、迁移。因此提示血管重构和新生内膜形成与 OPN 的功能密切相关<sup>[8-9]</sup>。

已往研究表明,淫羊藿苷可抑制血管损伤后新生内膜的增生<sup>[10]</sup>,本实验发现,正常组大鼠血管中 OPN 含量极少,内皮损伤后 14 d 时,损伤血管 OPN 表达出现显著增高;淫羊藿苷干预后,损伤血管

OPN 的表达明显降低,内膜增生程度减轻,平滑肌细胞已明显减少。至术后 28 d 时,各组血管中 OPN 表达均较前下降,其中淫羊藿苷干预组降低更为显著。该结果提示,在血管损伤后可能由于多种细胞活性因子的激活导致了 OPN 的高表达状态,并参与新生内膜形成的过程,淫羊藿苷可能通过调控 OPN 的表达,抑制 VSMC 的表型转化、迁移和增殖,减缓细胞外基质形成而有效抑制血管内膜增生,降低再狭窄的发生率。

### [参考文献]

- [1] Li G H, Chen Y F, Stacey S K, et al. Estrogen attenuates integrin- $\beta_3$  dependent adventitial fibroblast migration after inhibition of osteopontin production in vascular smooth muscle cell[J]. Circulation, 2000, 101: 2949.
- [2] Xu Q J, Yan B, Li S H, et al. Fibronectin binds insulin-like Growth factor binding protein 5 and abolishes its ligand dependent action on cell migration [J]. Biol Chem, 2004, 279(6): 4269.
- [3] Giachelli C M, Bae N, Almeida M, et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques [J]. Clin Invest, 1993, 92(4): 1686.
- [4] 黄秀兰,周亚伟,王伟.淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展[J].中成药, 2005, 27(6): 719.
- [5] 刘志敏,韩梅,温进绅.细胞外基质促进血管平滑肌细胞迁移及  $\beta_3$  整合素和粘着斑激酶表达[J].中国病理生理杂志, 2003, 19(2): 163.
- [6] Liaw L, Almeida M, Hart C E, et al. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells *in vivo* [J]. Circ Res, 1994, 74(2): 214.
- [7] Giachelli C M, Bae N, Almeida M. et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques [J]. Clin Invest, 1993, 92(4): 1686.
- [8] Kikuo Isoda, Kenichirou Nishikawa, Yashuhiro Kamezawa, et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation [J]. Circ Res, 2002, 91(1): 77.
- [9] 傅国香,朱鼎良,刘建军,等.骨桥蛋白参与血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞迁移[J].高血压杂志, 2006, 14(4): 277.
- [10] 高爱社,苗丽.淫羊藿苷对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生和平滑肌细胞凋亡的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 163.

[责任编辑 何伟]