

# 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管钙化的机制

胡艳红<sup>1</sup>, 杨静<sup>1</sup>, 修成奎<sup>1</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 方靖漪<sup>2</sup>, 王佳丽<sup>1</sup>, 刘奕清<sup>1</sup>, 雷燕<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700;

2. 广东药科大学中医药研究院, 广东省代谢性疾病中西医结合研究中心, 广州 510006)

**【摘要】 目的:**从小鼠颈总动脉、胸主动脉中骨桥蛋白(OPN)和平滑肌 22 $\alpha$  蛋白(SM22 $\alpha$ )表达及血管钙盐沉积程度,探讨人参-三七-川芎提取物对高糖诱导的小鼠血管钙化的保护作用。**方法:**130 只雄性 C57BL/6 小鼠先随机分为正常组和高糖组。高糖组腹腔注射链脲佐菌素(STZ)后,高脂饮食连续喂养 7 个月,之后再次随机分为模型组、人参-三七-川芎提取物低、高剂量组(0.819,1.638 g·kg<sup>-1</sup>)及二甲双胍组(150 mg·kg<sup>-1</sup>)。每组灌胃给药,每天 1 次,连续 9 周,并监测血糖变化。给药结束前 7 d,购进一批 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,正常喂养 1 周,作为青年组。全部给药结束后,收集小鼠颈总动脉和胸主动脉组织。分别采用冯库萨(Von Kossa)染色判断小鼠颈总动脉、胸主动脉钙盐沉积程度,免疫组化检测小鼠颈总动脉、胸主动脉中 OPN 与 SM22 $\alpha$  蛋白表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定小鼠颈总动脉中 OPN 与 SM22 $\alpha$  蛋白表达情况。**结果:**与青年组比较,正常组小鼠血糖升高无统计学差异,颈总动脉、胸主动脉结构染色均匀,未见黑色颗粒状沉淀;与正常组比较,模型组血糖显著升高( $P < 0.01$ ),血管中内膜弹性纤维内有大量棕黑色颗粒沉积,钙盐沉积程度明显;与模型组比较,各给药组血糖明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),血管钙盐沉积程度明显减轻。与青年组比较,正常组小鼠颈总动脉、胸主动脉中 OPN 蛋白和 SM22 $\alpha$  蛋白表达无显著改变;与正常组比较,模型组颈总动脉、胸主动脉中内膜 OPN 蛋白表达呈阳性,SM22 $\alpha$  蛋白表达呈弱阳性,颈总动脉中 OPN 蛋白表达灰度值显著升高( $P < 0.01$ ),SM22 $\alpha$  蛋白表达灰度值显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组颈总动脉、胸主动脉中内膜 OPN 蛋白和 SM22 $\alpha$  蛋白表达显著改善,颈总动脉中 OPN 蛋白表达灰度值明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),SM22 $\alpha$  蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。**结论:**高糖能够诱导小鼠颈总动脉、胸主动脉钙化,加速血管老化,这一形成过程可能与 OPN 与 SM22 $\alpha$  表达有关。人参-三七-川芎提取物可通过调节 OPN 与 SM22 $\alpha$  表达,减轻血管钙化,延缓血管老化。

**【关键词】** 血管钙化; 骨桥蛋白(OPN); 平滑肌 22 $\alpha$  蛋白(SM22 $\alpha$ ); 高糖; 人参-三七-川芎提取物; 血管老化

**【中图分类号】** R2-0;R22;R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2020)08-0013-08

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200701

**【网络出版地址】** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191219.1200.002.html>

**【网络出版时间】** 2019-12-19 15:04

## Mechanism of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma Extracts in Delaying High Glucose-induced Vascular Calcification in Mice

HU Yan-hong<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, XIU Cheng-kui<sup>1</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, FANG Jing-yi<sup>2</sup>,  
WANG Jia-li<sup>1</sup>, LIU Yi-qing<sup>1</sup>, LEI Yan<sup>1\*</sup>

(1. China Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM) Medical Experimental Center, Beijing Key Laboratory of Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases by TCM, Beijing 100700, China;

2. Chinese Medicine Research Institute of Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Research Center for Integrative Medicine in Metabolic Diseases, Guangzhou 510006, China)

**【收稿日期】** 20190922(014)

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81673822);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2018014,ZZ2017011)

**【第一作者】** 胡艳红,在读博士,从事中西医结合心血管病研究,Tel:010-64089525,E-mail:huyanhong3737@163.com

**【通信作者】** \*雷燕,博士,首席研究员,从事中西医结合心血管病研究,Tel:010-84076318,E-mail:13651217893@163.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma extracts on vascular calcification induced by high glucose in mice by observing the expression of osteopontin (OPN) and smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ) as well as vascular calcium deposition in the common carotid artery and thoracic aorta of mice. **Method:** Totally 130 male C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group and high glucose group. The mice in high glucose group were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ), and fed on a high-fat diet for 7 months. Then, the mice were randomly divided into model group, low-dose and high-dose Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma extracts groups (0.819, 1.638 g·kg<sup>-1</sup>), and metformin group (150 mg·kg<sup>-1</sup>). Each group was intragastrically administered once a day for 9 weeks. The changes in blood glucose were measured. Seven days before the end of the administration, a group of 4-week old male C57BL/6 mice were purchased and fed normally for one week as a youth group. At the end of the administration, the common carotid artery and thoracic aorta tissues of the mice were collected. Von Kossa staining was used to determine the degree of calcium deposition in the common carotid artery and thoracic aorta. The expression levels of OPN and SM22 $\alpha$  protein in the common carotid artery and thoracic aorta were detected by immunohistochemistry. The expression of OPN and SM22 $\alpha$  protein in the common carotid artery of mice was determined by Western blot. **Result:** As compared with the young group, the blood glucose of the normal control group was slightly increased without statistical difference, the common carotid artery and thoracic aorta were uniformly stained, and no black granular precipitate was observed. As compared with the normal control group, the blood glucose of the model group was increased ( $P < 0.01$ ), with a large amount of brown-black particles deposited in the intimal elastic fibers, showing obvious calcium salt deposition. As compared with the model group, blood glucose was significantly decreased in each administration group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the degree of vascular calcium salt deposition was significantly reduced. There were no significant changes in expression levels of OPN protein and SM22 $\alpha$  protein in the common carotid artery and thoracic aorta between the youth group and normal control group. As compared with the normal control group, the expression of intimal OPN protein in the common carotid artery and thoracic aorta of the model group was positive, SM22 $\alpha$  protein expression was weakly positive, and the gray value of OPN protein expression in the common carotid artery was significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the gray value of SM22 $\alpha$  protein was decreased significantly ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the expression levels of intimal OPN protein and SM22 $\alpha$  protein in the common carotid artery and thoracic aorta of each administration group were significantly improved, and the gray value of OPN protein expression in the common carotid artery was reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while SM22 $\alpha$  protein expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** High glucose can induce calcification of common carotid artery and thoracic aorta in mice and accelerate vascular aging. This formation process may be related to the expression of OPN and SM22 $\alpha$ . Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma extracts can reduce vascular calcification and delay vascular aging by regulating the expression of OPN and SM22 $\alpha$ .

**[Key words]** vascular calcification; osteopontin (OPN); smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ); high glucose; Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma extracts; vascular aging

近些年,随着人口老龄化的加剧,其带来的健康问题也日益增多,因此积极开展延缓血管老化与降低相关血管老化性疾病的研究,对提高人们的生活质量及延长寿命意义重大。血管钙化是指动脉中膜部位的异位钙盐沉积<sup>[1]</sup>,主要表现为钙磷盐在血管壁局部的沉积,沉积过程中同时伴有凋亡小体及基质囊泡的出现,细胞内碱性磷酸酶产生的增加和活

性增强,以及各种骨形成相关蛋白的表达增加,比如骨形成蛋白-2 (BMP-2),骨钙素 (OC),骨桥蛋白 (OPN),骨保护素 (OPG), runt 相关转录因子-2 (Runx2)等,及平滑肌 22 $\alpha$  蛋白 (SM22 $\alpha$ ),基质 Gla 蛋白 (MGP), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)等血管平滑肌细胞钙化抑制因子的减少,是糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、骨质疏松症和衰老等病理状态的共同

表现<sup>[1-3]</sup>。目前,血管钙化通常被认为是血管老化的一种表型,是临床上评估血管衰老程度和预测心脑血管事件发生的独立危险因素之一<sup>[4]</sup>。糖尿病患者发生血管钙化的指数明显高于非糖尿病患者,血管钙化为糖尿病患者血管并发症的主要病理基础。本课题组前期已发现人参-三七-川芎提取物能够降低衰老大鼠胸主动脉<sup>[5]</sup>、颈动脉<sup>[6]</sup>骨架蛋白的表达,通过 AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路<sup>[7]</sup>还可改善由高糖诱导的小鼠主动脉衰老。因此,本实验建立高糖诱导的病理性血管钙化模型,通过观察小鼠颈总动脉、胸主动脉结构变化,检测小鼠颈总动脉、胸主动脉中 OPN 与 SM22 $\alpha$  蛋白表达情况,探讨 OPN, SM22 $\alpha$  与高糖诱导的小鼠血管钙化之间的关系以及人参-三七-川芎提取物对高糖诱导的小鼠血管钙化的影响,为进一步研究血管老化奠定基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 4 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 130 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(京)2016-0011,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所动物中心。本研究经中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准进行,实验动物符合中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会规定(编号 2017-066)。

**1.2 药物与试剂** 按照人参-三七-川芎 2:3:4 的比例配比称取后,先破碎成最粗粉,再用 70% 乙醇提取,回收乙醇,最后浓缩、减压干燥成干膏粉后密封保存备用。以上 3 味中药均为道地药材,购于北京同仁堂(集团)有限责任公司,药材均由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为正品。药物为单味药成分(人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, 人参皂苷 Re, 三七皂苷及阿魏酸)检测符合 2015 年版《中国药典》的规定和标准。中药出膏率 23.33%, 每 1 g 干膏粉相当于 4.286 g 生药量,由北京因科瑞斯医药科技公司制备提供。二甲双胍,链脲佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司,批号分别为 BCBT7573, WXBC3087V);4% 多聚甲醛, Mayer 苏木素染液, DAB 显色试剂盒, BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 P1110, G1080, ZLI-9019, PC0020);动物总蛋白提取试剂盒(英文特生物科技有限公司,批号 SD-001/SN-002);光谱彩虹预染蛋白 Marker(英国 Abcam 公司,批号 ab115832);超敏发光试剂盒(德国 Millipore 公司,

批号 WBKLS0100);冯库萨(Von Kossa)染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号 GP1054);OPN, SM22 $\alpha$  兔多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab8448, ab14106); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 20536-1-AP);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301)。  
**1.3 仪器** SK-0180-E 型水平摇床[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);165-8001 型小型垂直电泳槽, PowerPac U 型电泳仪电源, 170-3940 型半干转印槽(美国 Bio-Rad 公司);BX61VS 型全自动生物荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Amersham Imager 680 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模方法** 小鼠正常适应性喂养 1 周,然后采用高脂饲料持续喂养 1 个月。1 个月后腹腔注射溶于无菌柠檬酸盐缓冲液的 STZ 溶液,第 1 天注射 130 mg·kg<sup>-1</sup>, 3 d 后随机血糖值 > 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 为 2 型糖尿病模型制备成功,未造成糖尿病模型的小鼠 5 d 后再次补注 STZ 溶液(80 mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[7]</sup>。糖尿病小鼠喂食高脂饲料,正常组小鼠喂食普通饲料,7 个月月开始药物干预。

**2.2 分组及干预方法** 造模完成后,根据血糖和体质质量,将糖尿病小鼠随机分为模型组,人参-三七-川芎提取物低、高剂量组,二甲双胍组,每组 17 只。人参-三七-川芎提取物低、高剂量组分别灌胃给药 0.819, 1.638 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,其相当于临床有效剂量及 2 倍量。二甲双胍组灌胃给药 150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。以上给药剂量均根据小鼠与成人体质量等效剂量换算。模型组和正常组给予相同体积的纯净水。共给药 9 周。给药结束前 7 d,购进一批 4 周龄雄性小鼠正常喂养 1 周,作为青年组。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 血糖检测** 在造模及给药过程中,每 3 周测量 1 次随机血糖值。

**2.3.2 Von Kossa 染色检测血管钙盐沉积程度** 动物处死后分别取其颈总动脉、胸主动脉一段,4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋法制作蜡块。石蜡切片置二甲苯、无水乙醇、去离子水中常规脱蜡脱水;紫外灯下 2% 硝酸银浸染 20~60 min;蒸馏水洗 5 min;5% 的硫代硫酸钠水溶液处理 2 min;去离子水洗 5 min;0.1% 核固红染液复染 2~3 min;蒸馏水洗 5~10 s;最后无水乙醇脱水,二甲苯透明,风干后

中性树脂胶封片,显微镜下观察血管钙盐沉积程度。

**2.3.3 免疫组化检测小鼠颈总动脉、胸主动脉 OPN 与 SM22 $\alpha$  蛋白表达** 4%多聚甲醛固定血管后进行石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水后置枸橼酸缓冲液盒中进行微波修复;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 30 min;5% 山羊血清封闭 30 min;抗原修复后,滴入一抗 OPN (1:1 000),SM22 $\alpha$ (1:1 000)工作液,同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗设立阴性对照,将切片放入湿盒中,4℃过夜;滴加山羊抗兔的二抗(1:1 000),室温下放置 30 min;滴加 ABC 工作液,37℃孵育 60 min,DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明,封固。免疫组化呈现棕黄色为阳性判定依据。每组切片均随机选取 6 个高倍镜下的视野,应用美国 Image-Pro Plus 6.0 全自动图像分析系统对阳性染色的积分吸光度 IA 进行定量分析,以其中一个具有代表意义阳性结果的视野的棕黄色颗粒为标准自动检测所有视野的阳性结果。

**2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠颈总动脉 OPN 与 SM22 $\alpha$  蛋白表达** 小鼠颈总动脉用动物总蛋白提取试剂盒提取。样品蛋白总浓度用 BCA 法测定,之后加入 5 × Loading buffer 混匀,100℃煮沸 7 min。按蛋白定量 25 μg/孔上样,进行电泳及转膜,之后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2~3 h,一抗稀释比例 1:1 000,4℃过夜。TBST 洗涤 3 次,10 min,二抗稀释比例为 1:3 000,室温孵育 1.5 h,

TBST 洗涤 3 次,10 min。将膜平铺在板上,滴加配置好的 ECL 反应液,曝光及扫描。以  $\beta$ -actin 为内参,Image J 软件进行图像分析。以目标蛋白的灰度值与相应的  $\beta$ -actin 的灰度值的比值反映目标蛋白 OPN 与 SM22 的半定量的表达。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般状态** 青年组小鼠灵敏、活泼,精神状态好,毛发黑亮光滑,皮肤有弹性;正常组小鼠精神状态也不错,行动灵敏,毛发柔顺光滑,皮肤较有弹性;模型组小鼠长出少许白色毛发、无光泽,精神萎靡,倦怠懒惰,反应迟钝,皮肤松弛,毛发无光泽,形体偏瘦并出现多饮、多尿、多食等现象;人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组给药后状态较模型组有好转。

**3.2 对小鼠血糖的影响** 与青年组比较,正常组小鼠血糖升高,差异无明显统计学意义。药物干预前,与正常组比较,模型组均显著升高( $P < 0.01$ );药物干预过程中,正常组和模型组小鼠血糖值基本稳定,其余各给药组小鼠的血糖值在总体上随实验进程缓慢降低;药物干预 9 周后,与正常组比较,模型组血糖显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组血糖明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠血糖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 1 Effect of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma (GNC) on glucose of diabetes mice( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

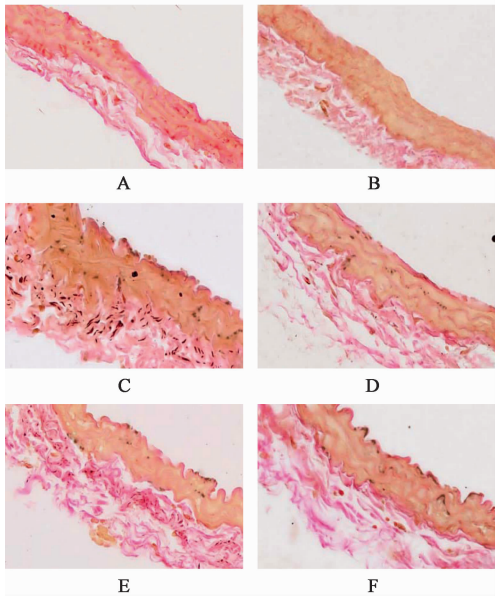
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	干预前	干预 3 周后	干预 6 周后	干预 9 周后	取材前
青年	-	-	-	-	-	5.89 ± 0.97
正常	-	5.82 ± 1.01	6.25 ± 1.56	6.39 ± 1.81	6.27 ± 1.44	6.27 ± 1.44
模型	-	25.13 ± 5.42 <sup>1)</sup>	26.01 ± 5.93	26.24 ± 6.61	25.20 ± 8.52 <sup>1)</sup>	25.20 ± 8.52 <sup>1)</sup>
人参-三七-川芎提取物	0.819	26.21 ± 4.13 <sup>1)</sup>	22.02 ± 5.35	21.75 ± 6.72	19.33 ± 6.60 <sup>2)</sup>	19.33 ± 6.60 <sup>2)</sup>
	1.638	25.08 ± 5.01 <sup>1)</sup>	20.14 ± 5.17	20.21 ± 5.35	18.76 ± 7.12 <sup>2)</sup>	18.76 ± 7.12 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.15	25.79 ± 4.65 <sup>1)</sup>	19.09 ± 5.52	19.00 ± 5.01	10.39 ± 3.21 <sup>3)</sup>	10.39 ± 3.21 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 对糖尿病小鼠颈总动脉、胸主动脉病理形态学的影响** 青年组小鼠颈总动脉、胸主动脉血管内膜光滑连续,血管结构染色均匀,呈粉红色,为阴性,均未见明显钙盐沉积。正常组小鼠颈总动脉、胸主动脉血管内皮细胞较完整,纤维排列整齐,血管内膜及中膜弹性纤维间未见黑色颗粒沉积。与正常组比较,模型组各血管内膜及中膜弹性纤维间有大量

棕黑色钙盐颗粒沉积,弹性纤维断裂,血管平滑肌细胞排列紊乱,动脉血管正常结构被破坏;与模型组比较,各给药组血管中内膜黑色颗粒沉着明显有好转,证实其对血管钙化具有保护作用。见图 1,2。

**3.4 对糖尿病小鼠颈总动脉和胸主动脉 OPN, SM22 $\alpha$  蛋白表达的影响** OPN 蛋白在青年组、正常组小鼠的颈总动脉和胸主动脉中呈弱阳性表达;在



A. 青年组; B. 正常组; C. 模型组; D. 人参-三七-川芎提取物低剂量组; E. 人参-三七-川芎提取物高剂量组; F. 二甲双胍组(图 2~6 同)  
图 1 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉病理形态学的影响(Von Kossa,  $\times 300$ )

Fig. 1 Effect of GNC on pathological morphology of common carotid artery in diabetes mice(Von Kossa,  $\times 300$ )

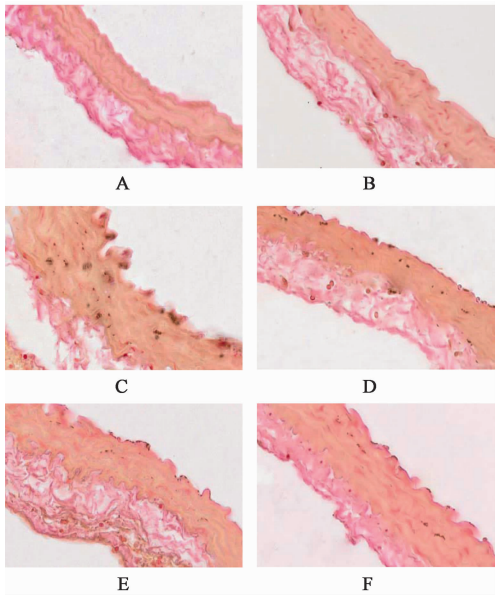


图 2 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠胸主动脉病理形态学的影响(Von Kossa,  $\times 300$ )

Fig. 2 Effect of GNC on pathomorphology of thoracic aorta in diabetes mice(Von Kossa,  $\times 300$ )

高糖诱导的小鼠颈总动脉、胸主动脉中均呈强阳性表达,可见血管壁的中膜和外膜处有大量棕黄色物质沉积与模型组比较,各给药组颈总动脉和胸主动脉中内膜的棕黄色颗粒沉积明显减少。与正常组比较,模型组 OPN 表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型

组比较,各给药组显著降低 OPN 表达( $P < 0.01$ )。见图 3,4,表 2。青年组、正常组 SM22 $\alpha$  蛋白呈阳性表达,血管内皮细胞和血管平滑肌细胞可见较深色棕黄色颗粒沉积。模型组中 SM22 $\alpha$  蛋白表达呈现显著的弱阳性表达( $P < 0.01$ );各给药组蛋白表达均明显升高,与正常组比较,模型组 SM22 $\alpha$  表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组明显升高 SM22 $\alpha$  表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 5,6,表 3。

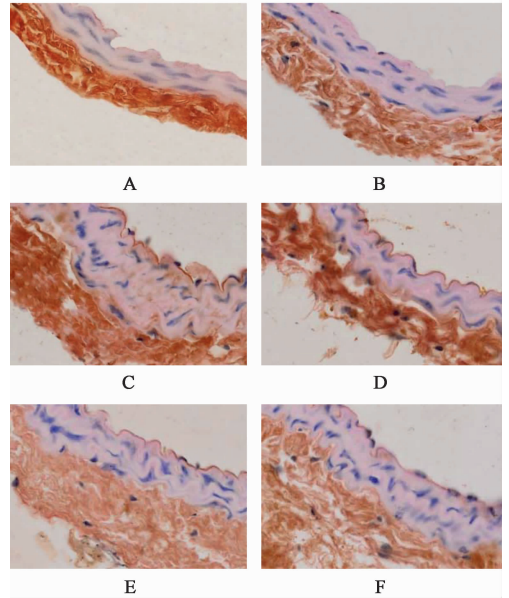


图 3 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉组织中 OPN 蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 300$ )

Fig. 3 Effect of GNC on expression of OPN protein in common carotid artery of diabetes mice (IHC,  $\times 300$ )

3.5 对糖尿病小鼠颈总动脉 OPN, SM22 $\alpha$  蛋白表达的影响 与青年组比较,正常组颈总动脉中 OPN 和 SM22 $\alpha$  蛋白表达差异无统计学意义;与正常组比较,模型组颈总动脉中 OPN 的蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ ), SM22 $\alpha$  蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组颈总动脉中 OPN 蛋白表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ), SM22 $\alpha$  蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。见图 7,表 4。

#### 4 讨论

衰老是机体随着年龄增长,生理完整性逐渐丧失,导致各组织、器官功能发生退行性改变,与糖尿病、癌症、高血压、心血管疾病和神经退行性疾病等密切相关<sup>[8]</sup>。作为机体的主要器官-血管,其衰老过程亦是整个机体衰老过程的重要构成因素。血管老化可引起血管各项结构功能变化包括血管壁老化、血管硬化及钙化、血压改变等,是促进心脑血管疾病

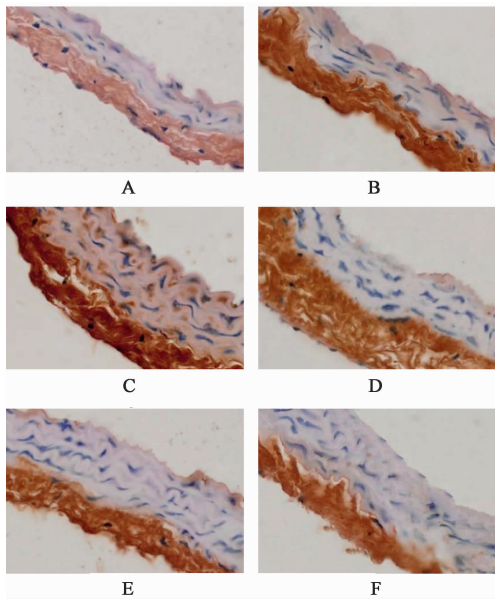


图 4 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠胸主动脉组织中 OPN 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig. 4 Effect of GNC on expression of OPN protein in thoracic aorta of diabetes mice (IHC, ×300)

表 2 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉和胸主动脉 OPN 积分吸光度的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of GNC on optical density values of OPN immunohistochemical staining in common carotid artery and thoracic aorta of diabetes mice( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	颈总动脉 OPN	胸主动脉 OPN
青年	-	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
正常	-	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01
模型	-	0.16 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.23 ± 0.11 <sup>1)</sup>
人参-三七-川芎提取物	0.819	0.10 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.10 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	1.638	0.09 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.11 ± 0.06 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.15	0.09 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.10 ± 0.07 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.01。

发生和发展的结构基础。有研究发现肥胖和 2 型糖尿病(T2DM)中的血管衰老与进行性血管钙化有关,血管钙化<sup>[9]</sup>是发病率和死亡率的独立预测因子。因此积极研究血管钙化与糖尿病之间的关系,对进一步了解血管老化,缓解心脑血管疾病的发生和发展具有重要意义。

既往认为血管钙化是一个被动、退化的过程,但是现在越来越多的证据表明血管钙化<sup>[10]</sup>是一个主动的、受基因高度可调的生物学过程,类似于骨的矿化,许多与成骨相关的调节因子都参与了血管钙化的过程。血管平滑肌细胞是参与血管钙化的主要

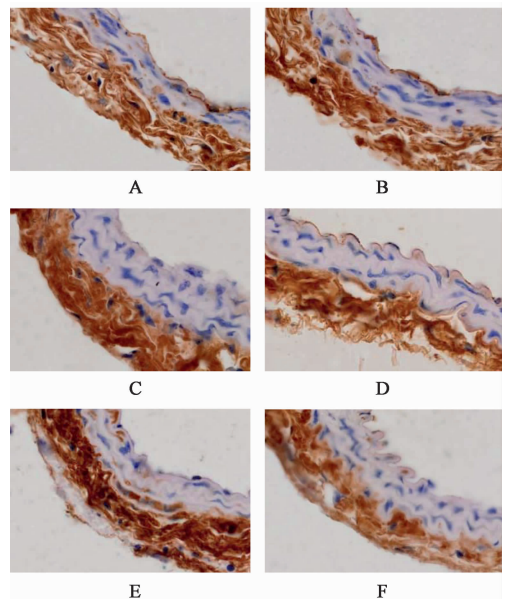


图 5 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉组织中 SM22α 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig. 5 Effect of GNC on expression of SM22α protein in common carotid artery of diabetes mice (IHC, ×300)

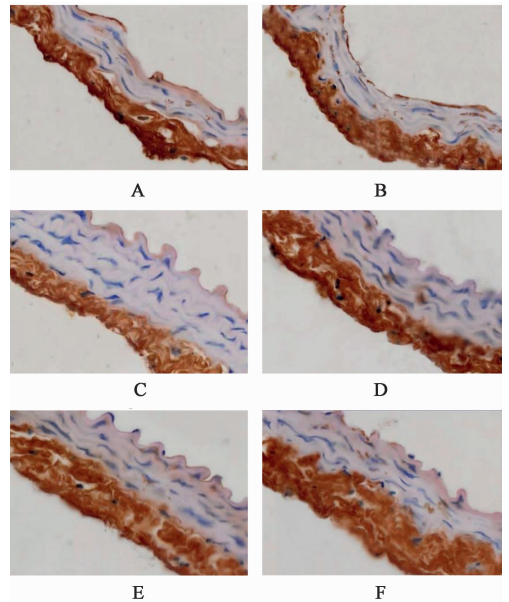


图 6 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠胸主动脉组织中 SM22α 蛋白表达的影响(免疫组化, ×300)

Fig. 6 Effect of GNC on expression of SM22α protein in thoracic aorta of diabetes mice (IHC, ×300)

细胞来源<sup>[11]</sup>,基础状态时呈收缩表型,当受到氧化应激、高糖等刺激因素的作用后,可去分化或者转化为具有合成和分泌功能的成骨样细胞表型,表达某些成骨分化的标记物<sup>[12-14]</sup>。伴随着成骨样细胞的转化,收缩型 VSMC 的特有标记 SM22α 等则出现下调。已有研究证明相较于非糖尿病患者,糖尿病患者的动脉钙化明显增加,钙相关蛋白的表达

表 3 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉和胸主动脉 SM22 $\alpha$  积分吸光度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of GNC on optical density values of SM22 $\alpha$  immunohistochemical staining in common carotid artery and thoracic aorta of diabetes mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	颈总动脉 SM22 $\alpha$	胸主动脉 SM22 $\alpha$
青年	-	0.15 ± 0.09	0.15 ± 0.08
正常	-	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.07
模型	-	0.03 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>1)</sup>
人参-三七-川芎提取物	0.819	0.11 ± 0.08 <sup>3)</sup>	0.07 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	1.638	0.08 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.08 ± 0.07 <sup>2)</sup>
二甲双胍	0.15	0.08 ± 0.06 <sup>3)</sup>	0.09 ± 0.05 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 4 同)。

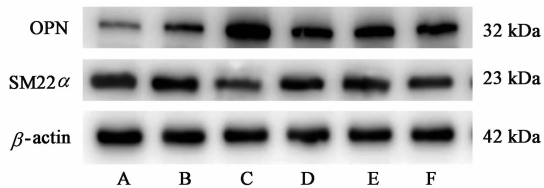


图 7 小鼠颈总动脉中 OPN, SM22 $\alpha$  蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of protein expressions of OPN, SM22 $\alpha$  in common carotid artery of mice

表 4 人参-三七-川芎提取物对糖尿病小鼠颈总动脉中 OPN, SM22 $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 4 Effect of GNC on protein expressions of OPN, SM22 $\alpha$  in common carotid artery of diabetes mice ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	OPN /β-actin	SM22 $\alpha$ /β-actin
青年	-	0.62 ± 0.17	1.08 ± 0.11
正常	-	0.73 ± 0.08	0.97 ± 0.12
模型	-	1.24 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>1)</sup>
人参-三七-川芎提取物	0.819	1.08 ± 0.11 <sup>2)</sup>	0.85 ± 0.08 <sup>3)</sup>
	1.638	0.96 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.87 ± 0.07 <sup>3)</sup>
二甲双胍	0.15	0.99 ± 0.09 <sup>3)</sup>	0.84 ± 0.09 <sup>3)</sup>

上调<sup>[15]</sup>。颜建云等<sup>[16]</sup>研究发现高糖通过上调骨相关蛋白 Cbfa1, Osx, OCN 和 BMP2 的表达,增加成骨样分化分子标志物 ALP 的活性,促进血管平滑肌细胞钙化,而 Wnt 信号通路参与了高糖诱导的血管平滑肌细胞钙化这一过程。

多项研究显示 OPN 蛋白是一种磷酸糖蛋白黏附分子,是骨形成过程中重要的细胞因子,也是血管钙化的标志物,机体正常的情况下,OPN 在巨噬

细胞和成纤维细胞中很少表达<sup>[17]</sup>。近年来,有学者通过体外高糖刺激平滑肌细胞和内皮细胞,及体内糖尿病大鼠模型发现,OPN 表达明显增加,由此证明 OPN 参与矿物质代谢,是加速糖尿病血管钙化及功能障碍的重要因素<sup>[18]</sup>。SM22 $\alpha$  蛋白,也被称为转凝蛋白,是一种细胞骨架相关蛋白,是血管平滑肌细胞分化表型的标志物,同时在细胞衰老研究中也用作鉴定细胞衰老状态的标志蛋白。研究发现高糖可抑制 SM22 $\alpha$  的表达<sup>[19]</sup>,促使成骨样细胞表型的形成,加速动脉粥样硬化的发生,是血管钙化形成的重要过程<sup>[20]</sup>。在评估血管钙化程度的诸项检测指标中,Von Kossa 染色是一种经典的钙盐染色法,其原理在于该法是一种金属置换法,通过银离子的氧化还原反应在钙化局部形成黑色磷酸银沉淀,可以直观显示出局部钙化水平。因此本研究则以高糖诱导的小鼠颈总动脉、胸主动脉作为研究对象,以 Von Kossa 染色作为判断血管钙化程度的指标,以骨桥蛋白 OPN 及骨架蛋白 SM22 $\alpha$  作为主要的研究内容,观察人参-三七-川芎提取物对 OPN, SM22 $\alpha$  及血管钙化的作用,从而探讨 OPN, SM22 $\alpha$  与血管钙化的关系。

本实验考虑到造模时间过长,正常组小鼠饲养时间也过长,以排除自身年龄增长性衰老带来的误差,在取材前又设置了青年组。实验结果显示,青年组与正常组在小鼠颈总动脉、胸主动脉 Von Kossa 染色,OPN, SM22 $\alpha$  蛋白表达上均没有显著性差异,提示正常组不会因年龄增长引起衰老带来误差,正常组可作为模型组的对照组。小鼠造模前后血糖结果显示:正常组与青年组血糖值无显著性差异;高糖诱导后,血糖值明显升高,肯定了糖尿病模型的成功率,可进行下一步的研究。药物干预 9 周后,各给药组血糖明显升高,出现显著性差异,提示人参-三七-川芎提取物有一定的降糖作用。Von Kossa 染色发现,模型组小鼠颈总动脉、胸主动脉血管内膜及中膜弹性纤维间有大量棕黑色钙盐颗粒沉积,血管正常结构也被破坏,提示高糖诱导血管钙化模型成功。人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组血管中内膜仅有微量黑色颗粒沉着,与模型组相比有明显好转,证实其对血管钙化具有保护作用。

本实验免疫组化结果显示,OPN 蛋白在青年组、正常组小鼠的颈总动脉和胸主动脉中呈弱阳性表达,SM22 $\alpha$  蛋白呈强阳性;OPN 蛋白在高糖诱导的小鼠颈总动脉、胸主动脉中均呈强阳性表达,可见血管壁的中膜和外膜处有大量棕黄色物质沉积,SM22 $\alpha$  的蛋白表达呈现出明显的弱阳性。而人参-

三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组则能改善 OPN, SM22 $\alpha$  蛋白在小鼠颈总动脉和胸主动脉中的表达。从蛋白表达含量结果来看, 模型组小鼠颈总动脉中 OPN, SM22 $\alpha$  平均灰度值与正常组比较有显著差异, 而人参-三七-川芎提取物低、高剂量组和二甲双胍组干预后, 各组 OPN, SM22 $\alpha$  平均灰度值与模型组比仍有显著性差异。以上提示 OPN, SM22 $\alpha$  在血管钙化过程中发挥重要作用, 人参-三七-川芎提取物可抑制其发挥。

综上所述, 本研究发现高糖能够诱导小鼠颈总动脉、胸主动脉钙化, 而人参-三七-川芎提取物能够改善由高糖引起的小鼠血管钙化, 其与 OPN, SM22 $\alpha$  表达密切相关, 进一步证实血管钙化与血管老化之间关系密切。

[参考文献]

[1] WANG C, TANG Y, WANG Y M, et al. Label-free quantitative proteomics identifies Smarca4 is involved in vascular calcification [J]. Ren Fail, 2019, 41(1): 220-228.

[2] HENZE L A, LUONG T T D, BOEHME B, et al. Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(15): 5445-5462.

[3] WEI R, ENAKA M, MURAGAKI Y. Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):1-13.

[4] LANZER P, BOEHM M, SORRIBAS V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives [J]. Eur Heart J, 2014, 35(23):1515-1525.

[5] 修成奎, 雷燕, 王强, 等. 自然衰老大鼠血管老化中细胞骨架的改变及人参三七川芎提取物的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(8):968-972.

[6] 景晓杨. 衰老大鼠血管和心肌细胞骨架的改变及人参三七川芎提取物的干预作用[D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.

[7] 方靖漪, 王雪, 雷燕, 等. 人参-三七-川芎提取物延缓高糖诱导的小鼠血管衰老的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4):81-86.

[8] 李稀杰, 段练, 王阶. 端粒与心血管衰老及补肾活血中药干预的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17):187-193.

[9] SCHINZARI F, TESAURO M, BERTOLI A, et al. Calcification biomarkers and vascular dysfunction in

obesity and type 2 diabetes: influence of oral hypoglycemic agents[J]. Am J Physiol Endoc M, 2019, 317(4):E658-E666.

[10] BADI I, MANCINELLI L, POLIZZOTTO A, et al. miR-34a promotes vascular smooth muscle cell calcification by downregulating SIRT1 (Sirtuin 1) and Axl (AXL Receptor Tyrosine Kinase) [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(9):2079-2090.

[11] CHEN B D, ZHAO Y, HAN D Y, et al. Wnt1 inhibits vascular smooth muscle cell calcification by promoting ANKH expression[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 135: 10-21.

[12] 王庆学, 张琪其, 刘春艳, 等. 葛根散对酒精性 ED 大鼠阴茎平滑肌组织结构 NOS 活力及  $\alpha$ -SMA, Cx43, TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24):43-47.

[13] ZHANG L, SUN HC, LIU S, et al. Glycemic variability is associated with vascular calcification by the markers of endoplasmic reticulum stress-related apoptosis, Wnt1, galectin-3 and BMP-2[J]. Diabetol Metab Syndr, 2019, 11(1):67.

[14] 龙声志, 朱海燕, 吴贤波, 等. 防风-乌梅配伍含药血清对气道平滑肌细胞增殖模型表型转化调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2):1-7.

[15] ZHOU Y B, ZHOU H, LI L, et al. Hydrogen sulfide prevents elastin loss and attenuates calcification induced by high glucose in smooth muscle cells through suppression of STAT3/cathepsin s signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4202.

[16] 颜建云, 周芹, 于汇民, 等. 高糖激活 WNT 信号通路促进血管平滑肌细胞钙化[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(1):29-33.

[17] WANG Y, YU Y, ZHANG H X, et al. The expression of Akt/mTOR in VSMC calcification induced by high phosphate and its regulation of Cbfa1[J]. Chin Med J, 2018, 98(18):1446-1451.

[18] LI TJ, NI L, LIU X N, et al. High glucose induces the expression of osteopontin in blood vessels *in vitro* and *in vivo* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(2):201-207.

[19] 修成奎, 雷燕, 王强, 等. 人参三七川芎提取物对复制性衰老血管平滑肌细胞骨架蛋白微丝的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3):484-489.

[20] PATEL J J, BOURNE L E, MILLÁN J L, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell calcification by ATP analogues [J]. Purinergic Signal, 2019, 15(3): 315-326.

[责任编辑 周冰冰]