

脂泰胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔 内皮素及一氧化氮合酶基因表达的影响

李亚俊^① 宋剑南^② 周瑕菁 牛晓红 王宇辉 金红 王少君

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

主题词 动脉粥样硬化; 内皮素; 一氧化氮合酶; 基因表达; 痰瘀同治; 脂泰胶囊; 家兔

摘要 为在基因水平上探讨痰瘀同治方药脂泰胶囊保护血管内皮、抗动脉粥样硬化形成和发展的机理, 采用烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸—硫磺酞胺脱氢酶组织化学染色和原位杂交法观察了脂泰胶囊对高脂血症家兔主动脉壁一氧化氮合酶活性及其 mRNA 表达和内皮素 mRNA 表达的影响, 采用阳性积分法处理数据。结果发现, 脂泰胶囊组家兔胸主动脉一氧化氮合酶活性(1.38 ± 0.63)明显高于高脂组(0.40 ± 0.24) ($P < 0.01$); 脂泰胶囊组家兔胸主动脉一氧化氮合酶 mRNA 表达(1.38 ± 0.48)明显高于高脂组(1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$); 脂泰胶囊组家兔胸主动脉内皮素 mRNA 表达(2.43 ± 0.53)明显低于高脂组(3.33 ± 0.82) ($P < 0.05$)。此外, 脂泰胶囊可以阻止斑块增厚, 减少斑块内脂质坏死中心的形成。提示脂泰胶囊能明显升高高脂状态下主动脉血管壁的一氧化氮合酶活性及其 mRNA 表达, 降低内皮素 mRNA 表达。脂泰胶囊抗动脉粥样硬化形成和发展的作用机制之一可能是通过调控一氧化氮合酶 mRNA 和内皮素 mRNA 的表达, 从而达到维持一氧化氮合酶的正常活性及一氧化氮的正常水平来实现的。

Influence of Zhitai Capsule on the Expression of Endothelins and Nitric Oxide Synthase in Experimental Atherosclerosis of Rabbits

LI Ya-Jun, SONG Jian-Nan, ZHOU Xia-Jing, NIU Xiao-Hong, WANG Yu-Hui, JIN Hong and WANG Shao-Jun

(Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

MeSH Atherosclerosis; Endothelins; Nitric-Oxide Synthase; Gene Expression; Phlegm and Stasis; Capsules, Zhitai; Medicine, Chinese Traditional; Rabbits

ABSTRACT **Aim** To investigate the molecular mechanism of the Zhitai Capsule, which is a phlegm and stasis treating prescription, protecting vascular endothelial cells and against atherosclerosis. **Methods** 24 male New Zealand White rabbits were divided into four groups: the normal control group, the hypercholesterol group, the Gimfibrozil group and the Zhitai group. Four months later, the rabbits were killed and the aortas were fixed. Using NADPH-diaphorase histochemistry and in situ hybridization, we have studied the activity and mRNA expression of nitric oxide synthase (NOS), as well as the mRNA expression of endothelin in aorta. **Results** The NOS activity in the aortas of Zhitai group (1.38 ± 0.63) were significantly higher than that of hypercholesterol group (0.40 ± 0.24) ($P < 0.01$); that the NOS mRNA expression in the aortas of Zhitai group (1.38 ± 0.48) were much higher than that of hypercholesterol group (1.00 ± 0.00) ($P < 0.05$); and that the NOS mRNA expression in the aortas of Zhitai group (2.43 ± 0.53) were much lower than that of hypercholesterol group (3.33 ± 0.82) ($P < 0.05$). The Zhitai capsule can prevent the activity and mRNA expression of NOS in advanced atherosclerosis from decending, the mRNA expression of endothelin in advanced atherosclerosis from increasing, and decrease the lipid necrosis core. **Conclusion** Zhitai capsul's antiatherosclerosis role was correlated with it's effect on mRNA expression of nitric oxide synthase and endothelin.

内皮素(endothelin)和一氧化氮(nitric oxide, NO)是主要由血管内皮细胞分泌的一对作用相反的血管活性分子, 内皮素与 NO 的平衡失调即内皮素的异常增加和/或一氧化氮合酶(nitric oxide syn-

thase, NOS)的明显下降, 与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的形成有一定关系^[1]。我们以往的研究表明, 痰瘀同治方药具有明显的降脂、活血、抗氧化, 维护细胞膜结构及正常功能, 降低高脂状态下血管内皮通透性, 减少单核细胞在内皮细胞的粘附并阻止其穿透内皮细胞层, 抑制主动脉内膜脂斑形成及维持 NO 代谢产物亚硝酸盐的生成量等多种功

本文为国家自然科学基金资助课题(基金编号 39370822)

①硕士研究生, 现在中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029

②指导老师

能^[2]。本研究通过进一步观察痰瘀同治方药—脂泰胶囊对高脂血症动物主动脉壁内皮素 mRNA、NOS mRNA 表达及 NOS 活性的影响,探讨该方药保护血管内皮细胞、抗动脉粥样硬化功能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 药物及试剂

脂泰胶囊,由江苏常州健民药厂提供。洁脂片,中国化学制药股份有限公司产品。NOS cRNA 探针及内皮素 cRNA 探针由北京医科大学病理学系提供。烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸(NADPH)系 Sigma 公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.2 动物及分组

雄性新西兰兔 24 只(由中国药品生物制品鉴定所实验动物繁育场提供),体重 2.0~2.5 kg。动物适应环境一周后,测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和血清甘油三酯(triglyceride, TG)水平。将体重、TC、TG 三项数据分别排序,依照均衡的原则分层随机法将兔分作四组,每组 6 只。其中对照组仅给普通饲料,按常规方法饲养;高脂(hypercholesterol, HC)组每日每只家兔给予 100 g 高脂饲料(含 1 g 胆固醇和 5 g 猪油);洁脂(Gimfibrozil)组除上述高脂饲料外,补充阳性对照药洁脂片,给药量为 240 mg/(kg·d);脂泰胶囊(Zhitai)组除高脂饲料外,补充脂泰胶囊,给药量为 1.25 g/(kg·d)(相当于生药量 17.5 g/(kg·d))。4 个月后取材检测血管壁 NOS 活性、NOS mRNA 和内皮素 mRNA。

1.3 组织取材及切片制作

动物处死切取主动脉弓部至第二肋间动脉开口处胸主动脉及肾动脉开口处腹主动脉各 5 mm,纵剖成两份:一份用 4%多聚甲醛(pH 7.4)4℃固定 2 h,冰冻切片;另一份用 10%甲醛固定 2 d,常规石蜡包埋,连续切片;切片厚均为 5 μm。每张玻片贴四组的切片各一张,0℃保存待测。

1.4 烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸—硫辛酰胺脱氢酶染色法检测兔主动脉壁一氧化氮合酶活性

取冰冻切片,4℃预冷磷酸盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4)洗涤,加入反应液(1%烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸, 0.1% NBT, 0.3% Triton X-100, pH 8.0)37℃孵育 1 h, PBS 终止反应。脱水,透明,封片。设立阴性对照:反应液中不加烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸。显微镜下,胞浆无明显着色信号为阴性(-),胞浆蓝染为烟酰胺磷酸腺嘌呤二核苷酸—硫辛酰胺脱氢酶组织化学染色阳性(+),呈深蓝色为中等阳性(++),接近蓝黑色为强阳性(+++

+)。以每张切片不同等级 NOS 活性的百分数乘以该等级的加权值(-为 1; + 为 2; ++ 为 3; +++ 为 4),从而得出每只动物主动脉壁 NOS 活性的阳性积分值。每张切片至少观察 3 个视野。

1.5 原位杂交法测定兔主动脉壁一氧化氮合酶 mRNA 和内皮素 mRNA 的表达

切片脱蜡、水化,蛋白酶 K 100 mg/L, 37℃ 20 min。4%多聚甲醛后固定 10 min。在杂交缓冲液中加入 0.1 mg/L 生物素标记的 NOS cRNA(或内皮素 cRNA)探针,80℃变性 5 min 后,加于切片上,37℃孵育过夜。经系列 SSC 洗涤,小牛血清白蛋白(1:10000)室温封闭,加辣根过氧化物酶标记的亲本和素(1:100)与辣根过氧化物酶标记的生物素(1:100)混合液室温作用 1 h。DAB 显色。NOS mRNA 杂交结果用苏木素复染。阴性对照,杂交液中不加探针,其它步骤完全相同。显微镜下,胞浆呈棕黄色显色为杂交阳性反应。根据一个视野下阳性反应颗粒占血管壁面积的比例定为:阴性(-),未见或偶见阳性颗粒;阳性(+),阳性颗粒少于 1/3;中等阳性(++),阳性颗粒少于 2/3;强阳性(+++),阳性颗粒在 2/3 以上。为了统计方便,予以半定量计分:1、2、3 和 4 分别对应-、+、++ 和+++。每张切片至少观察 3 个视野。

1.6 数据处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验差异的显著性。

2 结果

2.1 脂泰胶囊对主动脉一氧化氮合酶活性的影响

实验 4 个月时主动脉内皮细胞的组织化学染色反应,在高脂(HC)组、洁脂(Gimfibrozil)组和脂泰胶囊(Zhitai)组三组之间差别不明显。胸主动脉及腹主动脉内膜层细胞的染色反应,洁脂组和脂泰胶囊组明显强于高脂组。从高脂组到脂泰胶囊组斑块厚度则呈递减趋势,其中高脂组形成大量的坏死中心(表 1 和图 1, Table 1 and Figure 1)。对照(Control)组主动脉内皮细胞未见显色。

2.2 脂泰胶囊对主动脉一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

实验 4 个月时主动脉中膜层的 NOS mRNA 表达,高脂组较对照组明显下降;而脂泰胶囊组、洁脂组介于对照组和高脂组之间。在内膜层,单位面积下,脂泰胶囊组、洁脂组 NOS mRNA 表达高于高脂组,差别具统计意义(表 2 和图 2, Table 2 and Figure 2);对照组未见显色。

表 1. 脂泰胶囊对兔主动脉血管壁一氧化氮合酶活性的影响

Table 1. Effect of Zhitai Capsule on NOS distribution and activity in rabbits aortas ($\bar{x}\pm s$)

Distribution in aorta	Control group	HC group	Gimfibrozil group	Zhitai group
Endothelium arch	3.11±1.05	2.58±1.31	2.89±0.93	2.50±1.18
thoracic	4.00±0.00 ^a	1.91±1.14	2.64±1.21	3.00±1.04 ^a
abdominal	3.11±1.05 ^a	1.73±1.27	1.33±0.52	1.70±0.69
Intimal plaque arch	0	0.71±0.44	0.80±0.46	0.64±0.17
thoracic	0	0.40±0.24	1.47±0.51 ^b	1.38±0.63 ^b
abdominal	0	0.58±0.33	0.90±0.51	1.60±0.81 ^a

HC; hypercholesterol group; the same below. a; $P<0.05$, b; $P<0.01$, compared with HC group

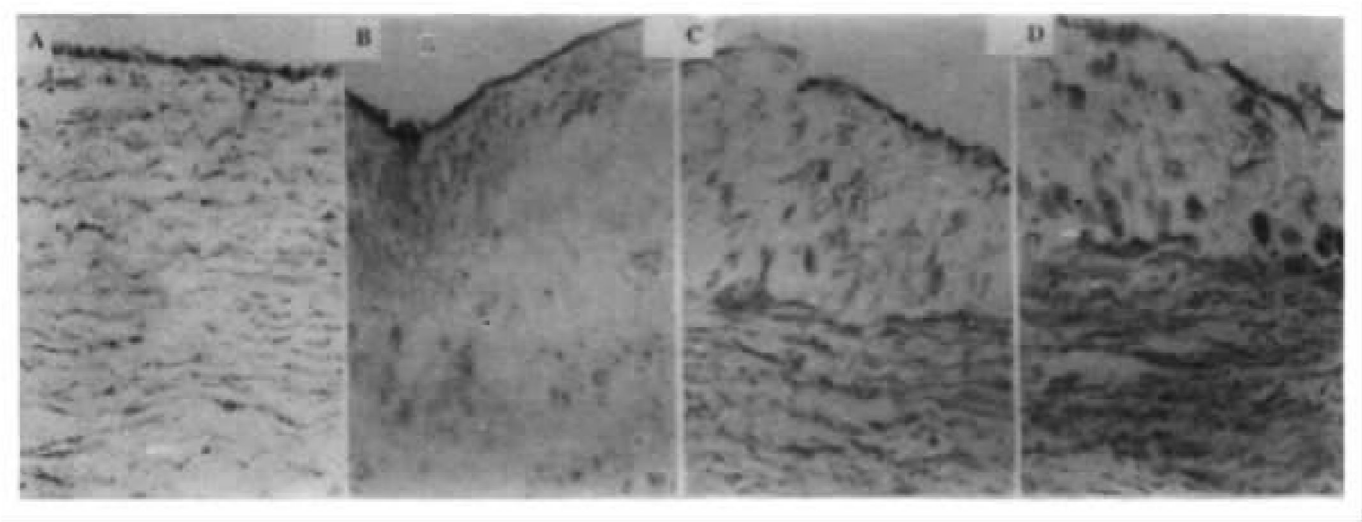


图 1. 脂泰胶囊对兔主动脉斑块一氧化氮合酶活性的影响

Figure 1. Effect of Zhitai Capsule on activity of NOS in aortas NADPH-d strong positive activity was detected in the endothelial cells of all four groups. In hypercholesterol(HC) group, the intimal thickening of the aorta was obvious and the NADPH-d positive cells were detected in the surrounding of the plaque (B). In Gimfibrozil group(C) and Zhitai group(D), the intimal thickening of the aorta were much thinner and the NADPH-d positive cells were locolated in the plaque eaqually. (NADPH-d stained ,magnification×200)

表 2. 脂泰胶囊对兔主动脉壁一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

Table 2. Effect of Zhitai Capsule on mRNA expression and distribution of NOS in rabbits aorta($\bar{x}\pm s$)

Distribution in aorta	Control	HC	Gimfibrozil	Zhitai
Intimalarch	0	1.67±0.91	2.33±1.03	2.50±0.76 ^a
thoracic	0	2.08±0.95	3.00±1.55	3.14±0.90 ^a
abdominal	0	1.18±0.40	3.00±0.82 ^a	3.67±0.58 ^b
Medial arch	2.33±1.24 ^b	1.12±0.32	1.00±0.00	2.25±1.09 ^b
thoracic	2.57±0.90 ^b	1.00±0.00	1.66±0.82 ^a	1.38±0.48 ^a
abdominal	1.20±1.09	1.00±0.00	1.13±0.33	1.33±0.47

a; $P<0.05$, b; $P<0.01$, compared with HC group

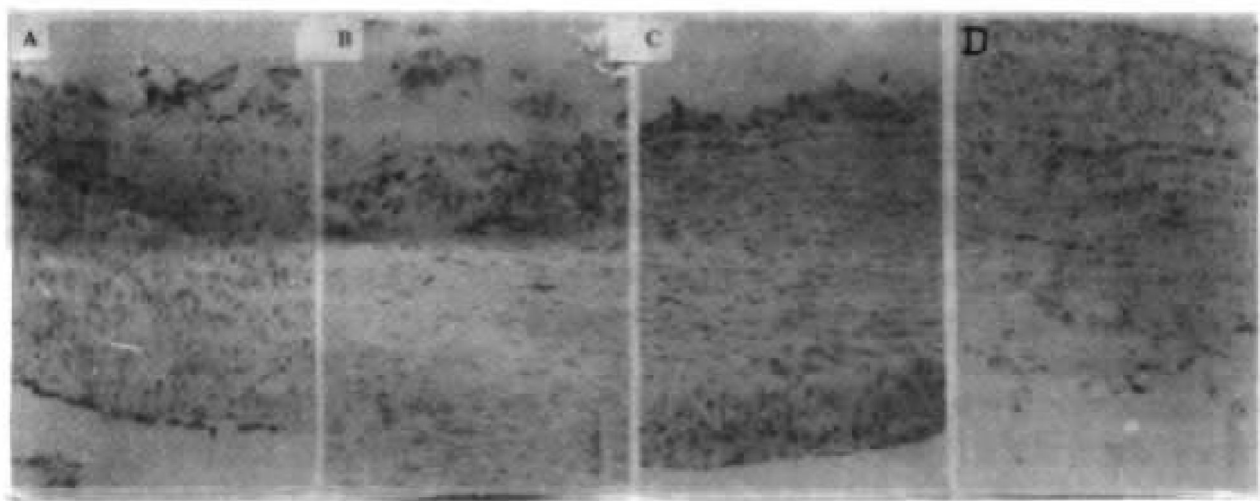


图2. 脂泰胶囊对兔主动脉壁 NOS mRNA 表达的影响

Figure 2. Effect of Zhitai Capsule on mRNA expression of NOS in aorta. In control group, positive cells were found widely in endothelium and medium(A). In hypercholesterol group, positive cells were around the necrotic cores of the plaques (B). In Gimfibrozil group, there were lots of positive cells in the intimal ,and some strong positive cells in local medial (C). In Zhitai group, the mRNA expression of NOS was found in the intimal and medial (D)(magnification×100)

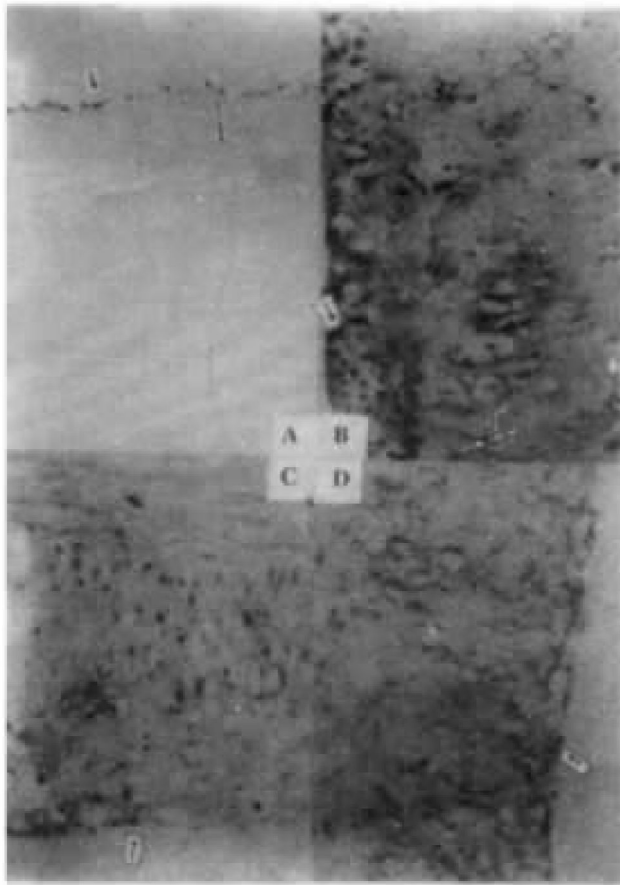


图3. 脂泰胶囊对兔主动脉内皮素 mRNA 表达的影响

Figure 3. Effect of Zhitai Capsule on mRNA expression of NOS in aorta. In control group, showing strongly positive endothelial cells(A). In the intimal thickening of hypercholesterol group (B), the stains of ET mRNA were wide and dense, while that of Gimfibrozil group(C)and Zhitai group(D)were weaker (magnification×200)

2.3 脂泰胶囊对兔主动脉血管壁内皮素 mRNA 表达的影响

对照组血管壁的内皮素 mRNA 仅见于内皮细胞中,中膜层未见表达;而其它三组中膜层有表达,表达无明显差别。喂饲高脂饲料的家兔血管壁内膜层的内皮素 mRNA 表达明显升高,其中脂泰胶囊组和洁脂组脂斑内的内皮素 mRNA 表达强度明显低于高脂组;对照组未见显色(表3和图3, Table 3 and Figure 3)。

表3. 脂泰胶囊对兔主动脉壁内皮素 mRNA 表达的影响
Table 3. Effect of Zhitai Capsule on mRNA expression and distribution of endothelin in rabbits throric aorta($\bar{x} \pm s$)

Groups	Endothelium	Intimal	Medial
Control	3.86±0.38	0	1.00±0.00
HC	1.29±0.49 ^b	3.33±0.82 ^b	2.56±0.53 ^b
Gimfibrozil	1.33±0.52 ^b	2.50±0.53 ^b	2.00±0.76 ^a
Zhitai	1.33±0.52 ^b	2.43±0.53 ^b	1.71±0.76 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group

3 讨论

一方面,一氧化氮在生理浓度下能够舒张血管、抑制血小板的聚集和粘附、抑制炎症细胞向内皮的粘附,抑制平滑肌细胞增殖,所以被视作能阻止 As 病程发展的内皮保护性分子。另一方面,高浓度的 NO 能够阻断线粒体呼吸,使能量代谢转入糖酵解途径,引起平滑肌细胞、巨噬细胞的凋亡;且当机体活性氧水平较高时,NO 与活性氧反应,发挥细胞毒

作用,造成细胞大量死亡。内皮素则是目前所知的最强的血管收缩肽,能引起内皮粘附、血管平滑肌细胞增殖。发生 As 的血管更易发生痉挛,内皮素水平的增高无疑是加重 As 病情的不利因素。NO 与内皮素的平衡失调与动脉粥样硬化的形成有一定关系。

脂泰胶囊是基于中医对高脂血症及动脉粥样硬化病机中痰瘀互结为患的认识,采用以燥湿化痰、健脾理气、活血化瘀法,组方的纯中药制剂。该方药能够维护高脂血症大鼠 NO 代谢产物亚硝酸盐的生成量^[2]。实验结果显示,实验4个月后,高脂组主动脉脂质斑块中的 NOS 活性及 mRNA 表达明显下降,而脂泰胶囊组和洁脂组的脂质斑块中有较多的 NOS 活性细胞分布。苏木素复染结果表明,此阶段高脂组增生内膜层的大面积 NOS mRNA 表达阴性主要与脂质坏死中心的大量形成有关。NO 具有诱导平滑肌细胞和巨噬细胞凋亡的作用^[3,4]。As 斑块中的平滑肌成分减少将使斑块变得不稳定,并促进裂隙和碎裂,平滑肌细胞的凋亡尤其是脆弱的纤维帽与肩区的细胞凋亡具有重要的生理病理意义^[5]。而脂泰胶囊组和洁脂组的脂质坏死中心较少,提示痰瘀同治方药能阻止 As 的进一步发展。现有观点认为,即使进展期的 As 斑块也有消退的可能性^[6];而脂质坏死中心的形成将促使斑块碎裂和血栓形成,后者导致冠心病急性事件^[7]。故阻止 As 斑块的进一步发展对于防治 As 意义重大。

原位杂交的结果同时表明,除血管内皮细胞外,兔主动脉中膜层在正常情况下也可表达 NOS mRNA,当发生 As 时,中膜层 NOS mRNA 随内膜增厚而表达减少。已知在 iNOS 启动子区存在剪应力反应元件,在 iNOS 非编码区存在 NF- κ B 结合位点。由于脂质过氧化损伤的内皮细胞可以促进平滑肌细胞增殖^[8]并表达 iNOS^[9]。故推测其机制为,随着脂质浸润程度加剧,一方面导致血流剪应力对中膜平滑肌细胞的作用削弱,从而出现中膜层 NOS mRNA 表达下降;另一方面,导致血管内皮细胞损伤加重,靠近内膜的平滑肌细胞发生表型改变,并增殖、迁移入内皮下层,在血流剪应力及前炎症因子的作用下,大量转录 iNOS mRNA。本研究发现,实验4个月时主动脉中膜层的 NOS mRNA 表达量由高到低依次为:正常组、脂泰胶囊组、洁脂组、高脂组。提示脂泰胶囊能够阻止主动脉中膜层 NOS mRNA 的表达下降,减轻高脂血症情况下主动脉血管壁的内皮

损伤程度。其机制可能与此祛痰化瘀方药能够显著降低血浆及红细胞膜中过氧化脂质含量^[2]有关。

此外,高脂动物血管壁的内皮素 mRNA 表达升高,且不仅分布在斑块内,平滑肌细胞中也有分布;而正常组的内皮素 mRNA 仅于内皮细胞中表达。脂泰胶囊组和洁脂组的内皮素 mRNA 表达量及表达强度均明显低于高脂组,但上述二组间差别不明显(图3)。提示脂泰胶囊能够减弱血管壁内皮素 mRNA 表达。

由上可见,痰瘀同治方药脂泰胶囊抗 As 形成和发展的作用途径之一是通过其调控 NOS mRNA 和内皮素 mRNA 的表达,从而达到维持 NOS 的正常活性和 NO 的正常水平、减轻高脂状态下的内皮损伤来实现的。

参考文献

- 1 宋良文,张秉钧,赵新荣,等. 动脉粥样硬化斑块组织中几种基因的表达(免疫组织化学和原位杂交). 北京医科大学学报, 1994, **26** (增刊): 36-39
- 2 周瑕菁,宋剑南,王宇辉,等. 痰瘀同治对实验性高脂血症大鼠血管内皮的保护作用. 中国中医基础医学杂志, 1997, **3** (4):26-28
- 3 Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon- γ , tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**: 19-27
- 4 Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, et al. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis--Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*, 1996, **79**: 748-756
- 5 Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*, 1996, **149**: 367-380
- 6 Mitchinson MJ. Advanced atherosclerosis: Progression of advanced atherosclerosis and its prevention. *Cardiovasc Rev Rep*, 1996, **17**(9): 11-22
- 7 蔡海江. 动脉粥样硬化研究进展. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3** (2,会议专辑): 81-83
- 8 高岩,陈铁镇,杨向红. 内皮细胞脂质过氧化损伤对平滑肌细胞增殖的影响. 中华病理学杂志, 1997, **26**(1): 42
- 9 Hansson GK, Geng YJ, Holm J, et al. Arterial smooth muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. *J Exp Med*, 1994, **180**: 733-738

(此文1998-09-26收到, 1999-02-13修回)

(此文编辑 胡必利)