

脉心康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉核因子 κ B 和基质金属蛋白酶 9 表达的调控

郑广娟, 张文高, 刘龙涛, 王显刚, 秦芳, 张静, 赵洪敏

(山东中医药大学病理学系, 山东省济南市 250014)

[关键词] 病理学与病理生理学; 脉心康胶囊; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 核因子 κ B; 基质金属蛋白酶 9

[摘要] 目的 观察脉心康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉核因子 κ B、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达水平的调控作用。方法 6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠, 随机分为高脂血症组(模型组)、洛伐他汀组及脉心康组, 相同遗传背景的同龄正常 C57BL/6J 小鼠为正常对照组。原位杂交观察各组主动脉核因子 κ B 和基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达的强度。结果 各给药组与模型组比较, 核因子 κ B mRNA、基质金属蛋白酶 9 mRNA 阳性细胞表达率均明显降低($P < 0.01$)。光镜下发现正常对照组主动脉壁内皮细胞、平滑肌细胞胞质内核因子 κ B mRNA、基质金属蛋白酶 9 mRNA 阳性表达细胞极少见; 模型组主动脉壁内皮细胞、平滑肌细胞胞质内阳性表达的棕褐色颗粒较多见, 且棕褐色颗粒染色均较深; 脉心康组主动脉壁可见内皮细胞、平滑肌细胞胞质内阳性表达的棕褐色颗粒, 但远较模型组少, 棕褐色颗粒染色深浅较均匀。结论 脉心康可降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉核因子 κ B、基质金属蛋白酶 9 mRNA 表达, 发挥抗动脉粥样硬化、稳定斑块的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked out, ApoE^{-/-}) 小鼠是研究动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发病机理和干预措施较理想的动物模型, 也是筛选抗 As 药物及机理研究的良好实验平台^[1]。本课题组引进 ApoE^{-/-} 小鼠动物模型, 采用原位杂交技术观察脉心康胶囊对该模型小鼠 As 主动脉核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) mRNA 表达水平的调控作用, 为该制剂用于临床防治 As 及相关疾病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与药物

6 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠 24 只, 雌雄各半, 体重 20 ± 2 g, 由北京大学医学院动物科技部提供; 6 周龄正常 C57BL/6J 小鼠 8 只, 雌雄各半, 体重 20 ± 2 g, 由北京协和医科大学动物中心提供。NF- κ B, SABC(效价 1:100 ~ 1:200), DAB 显色试剂盒(产品编号 ED1022), NF- κ B P65、MMP-9 原位杂交试剂盒, 均购

于武汉博士德生物工程有限公司。洛伐他汀由北京万生药业有限责任公司生产(批号: 200203181), 每粒 0.2 g; 脉心康胶囊(由人参总皂苷、银杏叶及绿茶提取物、降脂红曲微粉组成)由济南倍粒粉技术工程有限公司协助加工。

1.2 动物分组及给药方法

将 24 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 雌雄各半。高脂血症组(模型组)每天灌服生理盐水 0.4 mL/只; 洛伐他汀组灌服洛伐他汀 3.3 mg/kg·d [人用量(0.33 mg/kg·d)的 10 倍]; 脉心康组灌服生药 0.2 g/kg·d [人用量(0.02 g/kg·d)的 10 倍]。相同遗传背景的 8 只正常 C57BL/6J 小鼠, 作为正常对照组, 每天灌服生理盐水 0.4 mL/只。以上四组动物均喂饲 SPF 级普通饲料和 pH2.8~3.0 的酸化水, 连续灌胃 34 周后, 取主动脉常规石蜡切片, 原位杂交观察其 NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达的强度。

1.3 结果判定

原位杂交表达强度用组织学评分表示, 采用双盲分析。用低倍和高倍镜观察切片, 阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰, 细胞质内有棕黄色颗粒沉着, 染色明显高于背景。每组切片随机取 10 个视野, 阳性细胞所占细胞百分比作为原位杂交的表达强度。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS10.0 软件对配对资料进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

[收稿日期] 2005-06-14

[修回日期] 2006-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金(30472275)资助课题, 山东省自然科学基金(Y2001C14)资助课题

[作者简介] 郑广娟, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合防治心脑血管病和肿瘤转移的研究工作, E-mail 为 zhengguangjuan@163.com。张文高, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中西医结合防治心脑血管病的研究工作。刘龙涛, 博士研究生, 主要从事心脑血管疾病的临床与实验研究。

2 结果

2.1 核因子 κ B、基质金属蛋白酶 9 的表达强度

与正常对照组比较, 模型组 NF- κ B、MMP-9 mRNA 阳性细胞表达率明显升高 ($P < 0.01$); 各给药组与模型组比较, NF- κ B、MMP-9 mRNA 阳性细胞表达率均明显降低 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 光镜下核因子 κ B、基质金属蛋白酶 9 的表达

正常对照组主动脉壁内皮细胞、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) NF- κ B、MMP-9 阳性表达细胞极少见, 偶见阳性细胞的棕褐色颗粒染色较浅; 模型组主动脉壁内皮细胞、SMC 胞质内阳性表达的棕褐色颗粒较多见, 且棕褐色颗粒染色均较深, 阳性表达以斑块底部和肩部最强, 斑块内较弱; 洛伐他汀组

主动脉壁可见内皮细胞、SMC 阳性表达, 但远较模型组少, 棕褐色颗粒染色深浅不等; 脉心康组主动脉壁可见内皮细胞、SMC 胞质内阳性表达的棕褐色颗粒, 但远较模型组少, 阳性细胞的棕褐色颗粒染色深浅较均匀 (图 1)。

表 1. 核因子 κ B、基质金属蛋白酶 9 mRNA 的表达强度

组别	n	视野数	NF- κ B mRNA	MMP-9 mRNA
正常对照组	8	10	7.69% \pm 0.03%	5.47% \pm 0.04%
模型组	8	10	47.90% \pm 0.23% ^a	24.96% \pm 0.03% ^a
洛伐他汀组	8	10	13.47% \pm 0.03% ^b	19.46% \pm 0.03% ^b
脉心康组	8	10	10.74% \pm 0.03% ^b	8.31% \pm 0.03% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

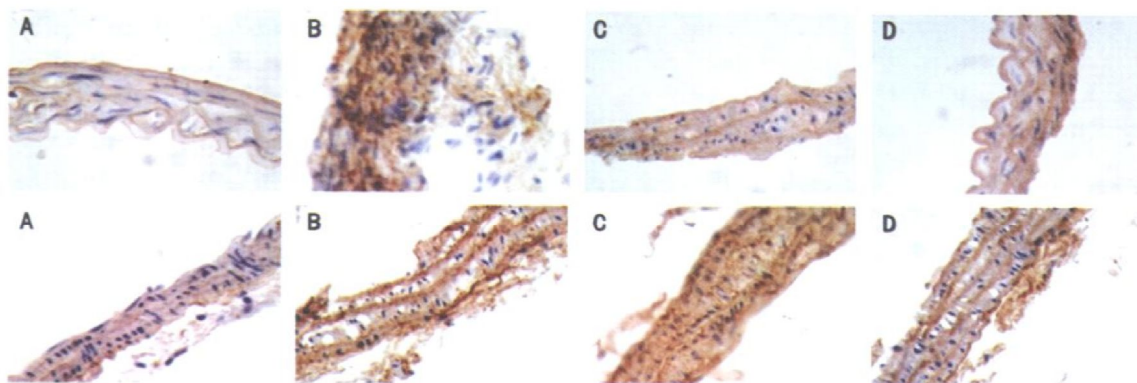


图 1. 光镜下核因子 κ B (上) 和基质金属蛋白酶 9 (下) 的表达 (10×40)

A 为对照组, B 为模型组, C 为洛伐他汀组, D 为脉心康组。

3 讨论

基质金属蛋白酶 (MMP) 是酶活性依赖锌离子的蛋白酶超家族^[2]。MMP-9 为明胶酶的一种, 又称为明胶酶 B, 主要降解 Ⅲ型胶原和弹力纤维^[3]。MMP-9 是降解基质、削弱纤维帽、诱发斑块破裂的关键因素。国外学者研究发现^[4], MMP-9 在 As 斑块的各部位都有表达, 但以 As 斑块的好发部位肩部及脂质核心的基底部更为明显。

核因子 κ B (NF- κ B) 是重要的核转录因子, 它可调节多种参与炎症反应、免疫反应、细胞增殖反应的细胞因子, 从而间接诱导 MMP 的表达。NF- κ B 的激活可能是 As 发生与发展的始动机理之一, 与 As 的发生、发展关系密切^[5]。

现代药理研究表明, 人参总皂甙、银杏叶及绿茶提取物、红曲均具有良好的调脂、抗 As 作用。本课题组前期研究表明, 脉心康胶囊具有良好的调脂、抗炎、抗 As 及稳定斑块的作用。本实验结果发现,

ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达明显增加, 脉心康及对照药洛伐他汀均可降低两者的表达, 其机制可能与脉心康胶囊的调脂及减轻炎症反应有关。本研究结果表明, 脉心康可对抗高脂血症及 As 的形成和发展, 尤其对 NF- κ B、MMP-9 mRNA 表达的调控, 在稳定斑块方面有十分重要的作用。

[参考文献]

- [1] 刘龙涛, 张文高, 郑广娟. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠在动脉粥样硬化研究中的应用[J]. 山东生物医学工程, 2002, 21 (4): 31, 39-42
- [2] 任冰稳, 马爱群. 动脉粥样硬化与基质金属蛋白酶[J]. 中国循环杂志, 2002, 17 (2): 73-74
- [3] Celis ZS, Sukhova GK, Libby P. NLcsmoscopic localization of active proteases by in situ zymology: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue [J]. *Inkthodnl Camrun*, 1995, 9 (9): 974-980
- [4] Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, et al. Increased expression of 72-KD type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions [J]. *Am J Pathol*, 1996, 148 (1): 121-128
- [5] Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes DR Jr, Carlson PJ, Leman A. Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 148 (1): 23-30

(此文编辑 许雪梅)