

[文章编号] 1007-3949(2008)16-10-0801-04

• 实验研究 •

## 南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块内胶原、巨噬细胞移动抑制因子和基质金属蛋白酶 9 表达的影响

李金平, 程 军, 田 卓, 胡厚源  
(第三军医大学西南医院心内科, 重庆市 400038)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 南蛇藤素; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 胶原; 巨噬细胞移动抑制因子; 基质金属蛋白酶 9

[摘 要] 目的 观察南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块中胶原、巨噬细胞移动抑制因子和基质金属蛋白酶 9 表达的影响。方法 8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 12 只, 随机分为南蛇藤素干预组和动脉粥样硬化模型组, 每组各 6 只, 同龄的雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只作为正常对照, 各组均给以高脂饮食饲养 8 周, 在高脂饲养的后 4 周, 分别予以南蛇藤素和相当剂量的溶剂二甲基亚砷腹腔注射, 每日 1 次, 连续用药 4 周; 处死后行主动脉连续石蜡切片、HE 染色观察组织形态学改变, 苦味酸-天狼星红染色检测斑块内胶原含量, 免疫组织化学方法观察主动脉斑块内巨噬细胞移动抑制因子和基质金属蛋白酶 9 蛋白表达的强度。结果 模型组形成了早期斑块, 南蛇藤素组斑块面积较模型组明显减小, 分别为  $4270.74 \pm 1027.64 \mu\text{m}^2$  和  $8971.19 \pm 1665.76 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ ), 南蛇藤素组斑块内胶原含量显著高于模型组 (平均光密度分别为  $0.0275 \pm 0.0068$  和  $0.0142 \pm 0.0054$   $P < 0.01$ ); 南蛇藤素组与模型组比较斑块内基质金属蛋白酶 9 表达明显降低 (平均光密度分别为  $0.0054 \pm 0.0020$  和  $0.0263 \pm 0.0080$   $P < 0.001$ ), 巨噬细胞移动抑制因子的表达也明显降低 (平均光密度分别为  $0.0114 \pm 0.0016$  和  $0.0227 \pm 0.0039$   $P < 0.001$ )。结论 南蛇藤素可能通过下调载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块内基质金属蛋白酶 9 和巨噬细胞移动抑制因子表达, 抑制胶原的降解进而发挥抗动脉粥样硬化及稳定斑块作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Celastrol on the Collagen, Macrophage Migration Inhibitory Factor and Matrix Metalloproteinase-9 Expressions in the Plaque of ApoE Gene Knockout Mice

LI Jin-Ping, CHENG Jun, TIAN Zhuo, and HU Hou-Yuan

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Celastrol; ApoE Gene Knockout Mice; Collagen; Macrophage Migration Inhibitory Factor; Matrix Metalloproteinase-9

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of celastrol on the collagen, macrophage migration inhibitory factor and matrix metalloproteinase-9 expressions in the plaque of apoE gene knockout mice. **Methods** 8-week old apoE gene knockout mice, male, were divided randomly into atherosclerosis model group and celastrol treatment group ( $n = 6$  in each group). 8-week old male C57BL/6J mice were the normal control. The mice in celastrol group were given celastrol  $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  by intraperitoneal injection for 4 weeks. The mice in control group were only given equivalent amount of dimethyl sulfoxide (DMSO), and the contents of collagen in the aortic atherosclerotic lesions were detected with Picrosirius Red staining. The expression of macrophage migration inhibitory factor and MMP-9 were detected by immunohistochemical method. **Results** The area of lipid plaque in the mice treated with celastrol was  $4270.74 \pm 1027.64 \mu\text{m}^2$ , significantly smaller than that of the model group  $8971.19 \pm 1665.76 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ ). The contents of collagen in the atherosclerotic plaque was significantly higher in Celastrol group compared with model group (mean optical density:  $0.0275 \pm 0.0068$  vs  $0.0142 \pm 0.0054$   $P < 0.01$ ). The expression of matrix metalloproteinase-9 was significantly decreased in celastrol group compared with the model group (mean optical density:  $0.0054 \pm 0.0020$  vs  $0.0263 \pm 0.0080$   $P < 0.001$ ). The expression of macrophage migration inhibitory factor was also significantly decreased in celastrol group compared with the model group (mean optical density:  $0.0114 \pm 0.0016$  vs  $0.0227 \pm 0.0039$   $P < 0.001$ ). **Conclusions** Celastrol can inhibit the progress of atherosclerotic plaque and promote the stability of ather-

[收稿日期] 2008-06-24

[修回日期] 2008-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30770851)

[作者简介] 李金平, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, 联系电话为 15811500527, Email 为 raisesun@163.com. 通讯作者胡厚源, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病发病机制与防治研究, 联系电话为 023-68765167, Email 为 houyuanhu@medmail.com. 程军, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床, Email 为 08chengjun666@sina.com.

osclerotic plaque in apoE gene knockout mice, which might be relative to its inhibition on the degradation of collagen and expression of macrophage migration inhibitory factor, matrix metalloproteinase-9 in atherosclerotic plaque of apoE gene knockout mice

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害人类健康的主要疾病之一, 发病率呈上升趋势, 在其疾病进程中伴有各种炎症因子的过度表达<sup>[1]</sup>、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 调节失衡<sup>[2-3]</sup>等病理过程。南蛇藤素具有免疫抑制及影响细胞增殖<sup>[4-5]</sup>的作用。临床上多用于与免疫异常相关的疾病的治疗和某些肿瘤的辅助治疗, 尚未有将其用于心血管疾病治疗的报告。载脂蛋白 E 基因敲除小鼠在普通饮食条件下 8~10 周龄可出现脂纹, 15~20 周龄后逐渐出现纤维斑块。高脂饮食下动脉粥样硬化灶病变更明显、形成更早, 是研究 As 发病机制和干预措施较理想的动物模型。本研究以载脂蛋白 E 基因敲除小鼠为对象, 以与其相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠为正常对照, 观察南蛇藤素对早期动脉粥样斑块内胶原、巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达的影响, 探讨其阻止斑块形成的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和设备

南蛇藤素 (美国 Calbiochem), 苦味酸 (四川红光化工有限公司)、天狼星红染料和二甲基亚砜 (美国 Sigma-aldrich)、兔抗 MIF 多克隆抗体、兔抗 MMP-9 多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、即用型链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶 (SABC)、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 胆固醇 (成都科龙化工公司); 脂肪 (市售猪油熬制); Image pro plus 6.0 图像分析软件 (Media cyber 美国); 数码图像采集设备 (Nikon Eclipse E200 日本)。

南蛇藤素注射液的配制: 取南蛇藤素 10 mg 加入 DMSO 溶液 4 mL, 振荡后溶解配制成浓度为 2.5 g/L 的储存液, 加入 0.9% NaCl 至 40 mL 配制成 0.25 g/L 的工作液, 每次根据体重进行腹腔注射。DMSO 注射液的配制: 取 DMSO 溶液 4 mL, 加入 0.9% NaCl 至 40 mL 配制成浓度为 110 g/L 的工作液, 每次根据体重进行腹腔注射。

### 1.2 动物分组及标本采集和 HE 染色

雄性载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 12 只, 8 周龄, 体重为  $19.4 \pm 0.6$  g 同龄雄性 C57BL/6J 小鼠 6 只 (正常对照组), 体重为  $19.2 \pm 0.8$  g 购自北京大学

医学部实验动物中心; 均给以高脂饮食饲养 8 周。高脂饮食是在普通饮食中加入脂肪与胆固醇, 其中脂肪含量为 21%, 胆固醇含量为 0.21%<sup>[6]</sup>; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠按随机数字表法分为 2 组: 动脉粥样硬化模型组和南蛇藤素干预组, 每组各 6 只; 在高脂饲养的后 4 周, 南蛇藤素组小鼠每日予以终浓度为 0.25 g/L 的南蛇藤素腹腔注射, 根据体重所用剂量为 2  $\mu$ g/g 连续用药 4 周; 模型组和正常对照组每日予以终浓度为 110 g/L 的 DMSO 腹腔注射 (剂量与南蛇藤素组相同), 连续用药 4 周; 用药后小鼠经 20% 乌拉坦腹腔麻醉, 剖开胸腔行心脏取血处死, 小鼠经 4% 多聚甲醛灌注固定后取心脏连主动脉, 剥离血管外附着组织, 行石蜡包埋, 自主动脉根部向下行连续切片, 每只小鼠切片 50 张, 每张切片 2 个组织面, 切片厚 5  $\mu$ m, 每间隔 6 张取 1 张, 分别行 HE 染色、苦味酸-天狼星红染色、MIF 及 MMP-9 免疫组织化学染色, 每项 4 张切片。

### 1.3 天狼星红染色及分析<sup>[7]</sup>

小鼠主动脉切片常规脱蜡、水化, 苦味酸-天狼星红溶液中染色 1 h 脱水、封片, 干燥 2 d 普通光学显微镜下观察可见胶原纤维呈鲜红色, 其他组织不呈色或显白色。

### 1.4 免疫组织化学染色及分析

小鼠主动脉切片常规脱蜡、水化、组织抗原修复, 磷酸盐冲洗 3 次, 一抗稀释度为 1:200 行 SABC 法染色, DAB 显色; 每组中另用磷酸盐缓冲液 (PBS) 取代一抗作为阴性对照; 普通光学显微镜下见黄褐色颗粒为阳性。

### 1.5 图片采集和分析

光镜观察血管壁 As 病变的组织学形态; 数码相机 100 倍镜下采集 HE 染色图像, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件作形态学分析, 测量动脉壁横切面积、粥样斑块面积, 计算粥样斑块面积与动脉壁横切面积之比, 取其均值进行统计学分析。400 倍视野下, 以数码图像设备采集苦味酸-天狼星红染色及免疫组织化学染色图片, 经 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统进行斑块内目标物质的累积光密度测定, 同时测定斑块面积, 计算平均光密度, 平均光密度 = 累积光密度 / 动脉粥样斑块面积, 从而对胶原含量及目标蛋白表达进行半定量。

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$

为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块形成的影响

模型组主动脉壁厚薄不均,中膜近内膜处平滑肌排列紊乱和增生,病变血管内膜增厚,可见由泡沫细胞形成的脂纹,已经形成了早期 As 病变。南蛇藤素组主动脉壁内可见少量泡沫细胞聚集。正常对照组未见 As 病变(图 1)。南蛇藤素组斑块面积较模型组明显减小,分别为  $4270.74 \pm 1027.64 \mu\text{m}^2$  和  $8971.19 \pm 1665.76 \mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ ),斑块面积/动脉壁横切面积也明显降低,分别为  $0.044 \pm 0.012$  和  $0.089 \pm 0.019$  ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样斑块内胶原含量的影响

南蛇藤素组小鼠较模型组主动脉粥样斑块内胶原含量高,其平均光密度值分别为  $0.0275 \pm 0.0068$  和  $0.0142 \pm 0.0054$  ( $P < 0.01$ ; 图 1),提示南蛇藤素可稳定载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样斑块内胶原含量。

### 2.3 南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块内基质金属蛋白酶和巨噬细胞移动抑制因子表达的影响

MMP-9 及 MIF 阳性表达均为细胞质呈现棕黄

色,细胞核不着色。模型组斑块内有较强的 MMP-9 表达,南蛇藤素组 MMP-9 表达较弱,平均光密度分别为  $0.0054 \pm 0.0020$  和  $0.0263 \pm 0.0080$  ( $P < 0.001$ ),正常对照组未见 MMP-9 表达;模型组斑块内有较强的 MIF 表达,南蛇藤素组 MIF 表达较弱,平均光密度分别为  $0.0114 \pm 0.0016$  和  $0.0227 \pm 0.0039$  ( $P < 0.001$ ),正常对照组无 MIF 表达(图 3),提示南蛇藤素可以降低斑块内 MIF 的表达。

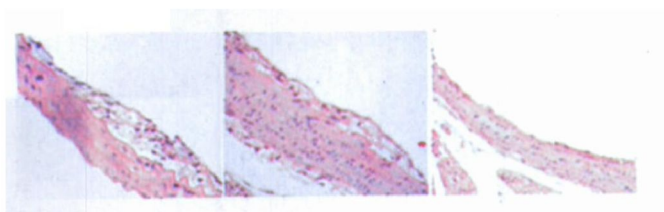


图 1 各组小鼠主动脉根部 HE 染色 ( $\times 200$ ) 左为模型组,中为南蛇藤素组,右为正常对照组。

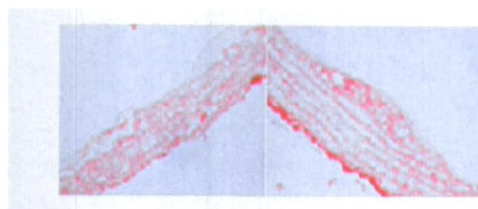


图 2 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块内胶原表达 ( $\times 400$ ) 左为模型组,右为南蛇藤素组。

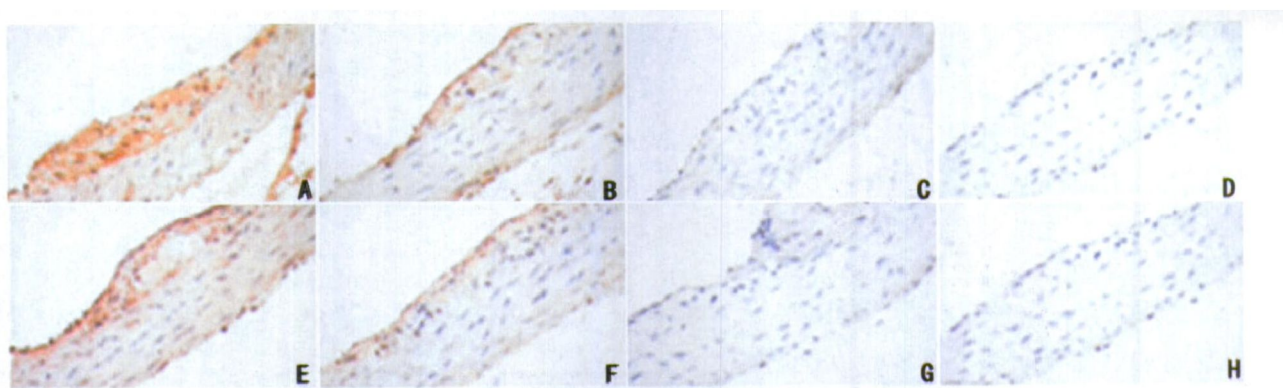


图 3 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块内基质金属蛋白酶 9 及巨噬细胞移动抑制因子的表达 ( $\times 400$ ) 上图为基质金属蛋白酶 9 下图为巨噬细胞移动抑制因子。A 和 E 为模型组, B 和 F 为南蛇藤素组, C 和 G 为正常对照组; D 和 H 为 PBS 阴性对照。

## 3 讨论

南蛇藤素是从植物雷公藤中提取的一种单体,属三萜类色素,多用于免疫系统疾病及肿瘤的治疗,目前尚未有将其用于心血管疾病治疗的报告。本研究以载脂蛋白 E 基因敲除小鼠为实验动物,通过高脂饮食饲养后形成了早期 As 病变,而相同遗传背景

的 C57BL/6J 小鼠作为对照无 As 病变形成,说明早期 As 动物模型的建立是成功的;采用南蛇藤素干预后小鼠 As 病变较模型组轻,提示南蛇藤素有抑制 As 发展的作用。南蛇藤素具有抗炎、抗氧化及抗增殖的作用,而 As 本身就是一种慢性炎性疾病,作者推测南蛇藤素可能通过影响炎症因子和 MMP 等表达而起到抗 As 的作用。



动脉粥样斑块稳定性主要依赖由胶原纤维、弹性蛋白和蛋白聚糖组成的纤维帽的厚度。在一定范围内,胶原纤维含量越多则斑块越稳定,因此胶原纤维含量是动脉粥样硬化斑块稳定性的预测因素之一<sup>[8-9]</sup>。MMP是调节细胞外基质动态平衡的重要酶系,MMP-9可以彻底降解胶原片断,增强血管平滑肌细胞迁移活性和收缩胶原的能力<sup>[10]</sup>,导致斑块不稳定<sup>[11-12]</sup>。本研究发现,南蛇藤素可以显著降低血管壁内MMP-9的表达,增加载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉粥样斑块内胶原纤维含量。南蛇藤素具有很强的抗氧化作用,在大鼠体内南蛇藤素可以通过抑制线粒体膜的过氧化反应而阻止氧自由基的损害<sup>[13]</sup>。而氧化应激是As的重要致病原因之一,在氧化应激过程中可产生大量MMP并降解胶原,因此推测南蛇藤素可能通过抗氧化作用减少MMP表达,减少纤维帽胶原的降解,稳定动脉粥样斑块。

本研究发现,南蛇藤素可以抑制斑块内MIF表达。MIF作为一种促炎因子,在As的发生发展过程中起重要作用,MIF可以诱导血管内皮细胞细胞间粘附分子-1的表达<sup>[14]</sup>;也可以促进巨噬细胞的粘附、向内膜下迁移和聚集;临床研究发现,急性心肌梗死患者的血浆中MIF水平明显升高<sup>[15]</sup>。南蛇藤素有着较强的免疫抑制和抗炎作用,有研究表明南蛇藤素可明显抑制血管内皮细胞株的体外增殖,抑制新生血管的形成<sup>[16]</sup>,但南蛇藤素对As的直接影响尚未有报道;作者既往的研究表明,南蛇藤素可以抑制载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块内C反应蛋白和组织因子的表达<sup>[17]</sup>。而本研究提示,南蛇藤素有可能通过抑制MIF的表达防止单核/巨噬细胞的进一步聚集和浸润,减少巨噬细胞源性泡沫细胞的形成,同时进一步抑制其他炎症因子的分泌和表达,减轻血管的炎症反应,从而发挥稳定斑块的作用。因此,南蛇藤素可能通过抑制斑块内MMP-9表达和胶原降解、降低斑块内炎症因子MIF水平,进而稳定斑块内胶原含量和抑制其他炎症介质的表达,最终起到稳定As斑块的作用。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Lessner SM, Martinson DE, Galis ZS. Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (11): 2123-129
- [3] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly [J]. *Circ Res*, 2002, **90** (3): 251-263
- [4] Natsuko Kusunoki, Ryuta Yamazaki, Hidero Kitasato, et al. Triptolide, an active compound identified in a traditional Chinese herb, induces apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts [J]. *BMC Pharmacol*, 2004, **4** (1): 2-11
- [5] Zhang DH, Marconi A, Xu LM, et al. Tripterine inhibits the expression of adhesion molecules in activated endothelial cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, **80** (2): 309-319
- [6] Tina Ra, Peter Kanellakis, Giovanna Panilio, et al. Inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (11): 1845-851
- [7] Dandapat A, Hu CP, Chen J, et al. Over-expression of angiotensin II type 2 receptor (agr2) decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **366**: 871-877
- [8] Ghesquiere SA, Gijbels MJ, Anthonen MW, et al. Macrophage-specific overexpression of group IIa sPLA2 increases atherosclerosis and enhances collagen deposition [J]. *J Lipid Res*, 2005, **46**: 201-210
- [9] 颜东, 赵全明, 许金鹏, 等. 罗格列酮增加载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块的稳定性研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2006, **25** (3): 204-208
- [10] Galis ZS, Johnson C, Godin D, et al. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling [J]. *Circ Res*, 2002, **91** (9): 852-860
- [11] Choi ET, Collins ET, Marine LA, et al. Matrix metalloproteinase-9 modulation by resident arterial cells is responsible for injury-induced accelerated atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (5): 1020-025
- [12] 周志斌, 郭毅, 王思鸿, 等. 基质金属蛋白酶9及转化生长因子 $\beta$ 1在人动脉粥样硬化斑块的表达及其与斑块稳定性的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (3): 217-220
- [13] Sassa H, Kogure K, Takaishi Y, et al. Structural basis of potent anti-peroxidation activity of the triterpene celastrol in mitochondria: effect of negative membrane surface charge on lipid peroxidation [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, **17**: 201-207
- [14] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, et al. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor [J]. *Exp Med*, 1994, **179**: 1895-902
- [15] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler Rüdiger. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (1): 561-566
- [16] 黄煜伦, 周幽心, 周岱, 等. 雷公藤红素抑制血管生成的实验研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, **25** (5): 429-432
- [17] 程军, 李金平, 田卓, 等. 南蛇藤素对载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉壁C反应蛋白及组织因子表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (5): 341-344

(此文编辑 李玲玲)