

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-07-0510-05

## 增强型体外反搏抗动脉粥样硬化内皮机制的蛋白质组学研究

陈小林<sup>2</sup>, 马虹<sup>1</sup>, 何小洪<sup>1</sup>, 张焰<sup>1</sup>, 詹澄扬<sup>1</sup>, 郑振声<sup>1</sup>, 陈林祥<sup>2</sup>

(1 中山大学附属第一医院心内科, 广东省广州市 510089; 2 江门市人民医院心血管病研究所心内科, 广东省江门市 529000)

[关键词] 增强型体外反搏; 动脉粥样硬化; 内皮细胞; 蛋白质组学

[摘要] 目的 探讨增强型体外反搏抗动脉粥样硬化及其内皮机制。方法 12只高胆固醇血症猪随机分为高脂组和反搏组。反搏36小时后,取冠状动脉和腹主动脉进行病理形态学及超微结构观察,收集胸主动脉内皮细胞进行蛋白质组学检测。结果 主动脉大体苏丹Ⅲ染色及冠状动脉HE染色示高脂组斑块形成较反搏组多,反搏组斑块/内膜面积比显著少于高脂组(1.27% ± 0.35%比7.83% ± 2.39%,  $P < 0.05$ )。扫描电镜示高脂对照组内皮细胞排列紊乱,大量破坏脱落,有较多血小板黏附;反搏组内皮细胞较完整,沿血流方向梭形排列,血小板黏附较少。透射电镜示高脂对照组内皮细胞变性凋亡脱落显著,内皮下大量泡沫细胞积聚,平滑肌细胞呈合成型改变,大量增生并向内膜移行;而反搏组上述改变明显减轻。反搏组内皮细胞检测到8种高表达的蛋白质。结论 增强型体外反搏通过修复高胆固醇引起的内皮细胞损伤发挥抗动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## A Proteomic Study of Endothelial Mechanisms Involved in Anti-atherosclerosis Effect With Enhanced External Counterpulsation

CHEN Xiao-Lin<sup>1</sup>, MA Hong<sup>1</sup>, HE Xiao-Hong<sup>1</sup>, Zhang Yan<sup>1</sup>, ZHAN Cheng-Yang<sup>1</sup>, ZHENG Zhen-Sheng<sup>1</sup>, and CHEN Lin-Xiang<sup>2</sup>

(1 Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China; 2 Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular Research of Jiangmen People's Hospital, Jiangmen 529000, China)

[KEY WORDS] Enhanced External Counterpulsation; Atherosclerosis; Endothelial Cell; Proteomics

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of enhanced external counterpulsation (EECP) against atherosclerosis and its endothelial mechanisms. **Methods** Twelve hypercholesterolemic pigs were randomly divided into the hyperlipidemia and EECP groups. After EECP, amount to 36 hours, the coronary arteries and abdominal aortas were sampled for histopathologic and ultrastructural examination. The endothelial cells (EC) were collected from thoracic aorta for proteomic study. **Results** Compared with the hypercholesterolemic animal receiving EECP, much more plaques were found in the hypercholesterolemic animal without EECP. The plaque/intimal area ratio of the aorta decreased significantly in animals receiving EECP (1.27% ± 0.35%) versus (7.83% ± 2.39%) in those without EECP,  $P < 0.05$ . Lipid deposition, endothelial damage and proliferation of smooth muscle cells were less severe in animals receiving EECP than those without EECP. Moreover, eight kinds of proteins were higher expressed in ECs from animals receiving EECP than from those without EECP. **Conclusion** EECP could prevent atherosclerotic lesion progress by repairing damaged endothelia caused by hypercholesterolemia.

慢性增强型体外反搏 (enhanced external counterpulsation, EECP) 作为一种有效的非药物治疗手段已被列入美国心脏病学会稳定型心绞痛治疗指南,但其治疗冠心病和心绞痛的确切机制,尤其是分子机制大部分仍不清楚。体外细胞培养发现,适当的切应力刺激可引起内皮细胞生物学特性改变,包括

形态学改变和基因表达及蛋白质合成、分泌的变化,如一些抗动脉粥样硬化基因或蛋白质表达的上调。众所周知,内皮损伤在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有十分重要的作用<sup>[1-3]</sup>。本研究复制猪高胆固醇血症模型,利用蛋白质组学方法,探讨 EECP 对高胆固醇血症猪动脉粥样硬化及内皮细胞蛋白质表达的影响。

[收稿日期] 2009-03-24

[修回日期] 2009-05-20

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目 (2001BA706B07); 国家自然科学基金项目 (50113-4103048)

[作者简介] 陈小林, 博士, 临床医学博士后, 副主任医师, 主要从事冠心病的基础与临床研究, E-mail为 cxlnce68@yahoo.com.cn。通讯作者马虹, 教授, 博士研究生导师, 博士后合作导师, 中山大学心血管病研究所所长, 中山大学附属第一医院心血管医学部学科带头人及首席专家, 卫生部心血管病防治研究中心专家委员会委员, 广东省心血管学会副主任委员, 主要从事冠心病防治研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 猪高胆固醇血症模型建立

雄性乳猪 12 只, Yorkshire (♂) 与 Landrace (♀) 杂交, 购自华南农业大学动物养殖场, 平均体

重  $8.7 \pm 1.2$  kg 断乳 (约猪龄 20 天) 后给予高脂饲料哺养。高脂饲料构成: 胆固醇 4%, 猪油 8%, 蛋黄粉 10%, 盐 1.2%, 余为普通饲料。总饲料为每天 50 g/kg 体重, 早晚各投食一次, 直至实验结束。喂养过程中监测体重、血脂及肝肾功能的变化。

## 1.2 体外反搏方案

高脂饲料哺养 8 周后, 实验动物随机分为高脂组 ( $n=6$ ) 和反搏组 ( $n=6$ )。速眠新  $\text{⑤}$  ( $2.0 \sim 3.0$  mL 肌肉注射) 和戊巴比妥钠 ( $30$  mg/kg 分次静脉注射) 麻醉后, 动物取右侧卧位, 以  $0.04$  MPa/cm<sup>2</sup> 压力反搏,  $2$  h/次, 隔日 1 次, 共计 36 h。反搏过程中监测心电图和指脉波。为消除麻醉药对实验结果可能的影响, 高脂组亦进行同样的麻醉。

## 1.3 光镜标本制作与观察

取材于冠状动脉前降支开口以远  $0.5$  cm 处长约  $1$  cm 血管段横切成 3 段, 4% 甲醛固定 24 h 常规包埋, 制作蜡块, 继而  $4 \sim 6$   $\mu$ m 切片行 HE 染色。德国 Zeiss 显微镜观察。

## 1.4 透射电镜标本制作与观察

取左回旋支开口以远  $0.5$  cm 处长约  $0.5$  cm 血管段, 用 2.5% 戊二醛固定 24 h, 半薄切片定位, 超薄切片制样, 日本日立 H600 透射电镜观察超微结构。在中山大学生命学院电镜室完成。

## 1.5 扫描电镜标本制作及观察

取前降支开口以远  $0.5$  cm 处约  $0.5$  cm 组织, 用 2.5% 戊二醛及 1% 锇酸固定, 扫描电镜观察冠状动脉内皮表面形态。制作及观察由中山大学生命学院电镜室完成。

## 1.6 腹主动脉大体苏丹 $\text{⑥}$ 染色及观察

动物处死后迅速取出从肾动脉开口处到髂动脉分叉处的腹主动脉, 磷酸盐缓冲液冲洗, 10% 甲醛溶液固定 24 h, 流水浸洗 8 h 后送病理科进行苏丹  $\text{⑥}$  染色, 脂质条纹及斑块处呈典型橘红色。

## 1.7 胸主动脉内皮细胞收集与鉴定

处死动物后, 迅速取胸主动脉约  $20$  cm, 立即用预冷  $4^{\circ}\text{C}$  的磷酸盐缓冲液清洗净血管中的血液, 接着用 0.2% 的 I 型胶原酶 (Sigma 公司生产) 消化动脉内膜 ( $37^{\circ}\text{C}$ ,  $15$  min), 再用预冷的磷酸盐缓冲液冲洗内膜, 收集含有内皮细胞的冲洗液, 低温 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 离心  $15$  min, 弃上清, 收集消化下来的血管内皮细胞, 分管,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存以供血管 EC 鉴定和蛋白质组学检测。将收集的猪胸主动脉内皮细胞中加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (Gibco 公司产), 加入  $6$   $\mu$ L ( $2$  g/L) DiI-Ac-LDL 试剂 (molecular probes 公司生产) 进行孵育培养 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), 4 h 后在荧

光显微镜下观察。

## 1.8 胸主动脉内皮细胞蛋白组学分析

收集到的内皮细胞送中山大学蛋白质组学实验室进行蛋白质组学分析。步骤简述如下: 蛋白质萃取、纯化及定量, 然后进行等电聚焦 (第一向) 电泳和 SDS-PAGE (第二向) 电泳、考马斯亮兰染色, 采集凝胶图像并进行对比分析, 接下来进行肽指纹鉴定及蛋白质质谱分析。

## 1.9 统计学分析

计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS12.0 软件分析数据, 各组间比较用多样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 动物血脂与体重变化

反搏前, 两组间的总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇差异无显著性; 反搏后, 两组间的总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇差异均存在显著性 ( $P < 0.05$  表 1)。两组的体重在反搏前分别为  $41.6 \pm 4.5$  kg 和  $41.7 \pm 4.7$  kg 反搏后分别为  $79.7 \pm 7.5$  kg 和  $85.7 \pm 2.5$  kg 反搏前后差异均无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 反搏效果评价及胸主动脉内皮细胞鉴定

反搏过程中获得了理想的指脉波形 (图 1), 表明反搏是有效的。由于内皮细胞吞噬了 DiI-Ac-LDL, 在荧光显微镜下发出橙黄色荧光 (图 2)。

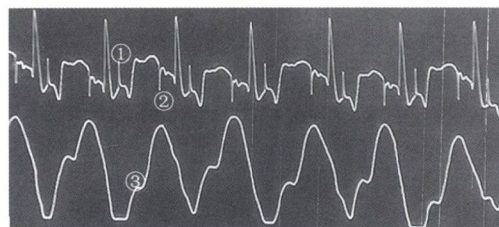


图 1. 体外反搏时心电图及指脉波型 上排为心电图波形, 下排为指脉波波形。①为反搏充气信号, ②为反搏排气信号, ③为反映有效反搏的切迹。

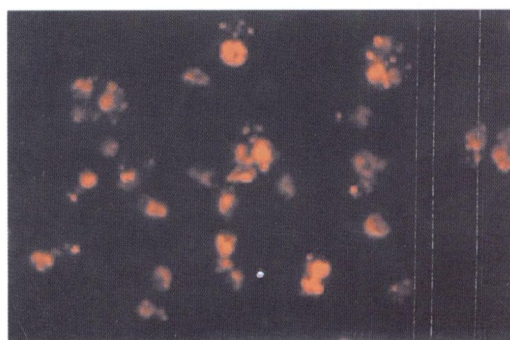


图 2. 内皮细胞鉴定 ( $\times 100$ ) 橙黄色荧光为存活的内皮细胞。



表 1 反搏前后动物血脂变化 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

时 间	TC		HDL-C		LDL-C		TG	
	反搏组	高脂组	反搏组	高脂组	反搏组	高脂组	反搏组	高脂组
反搏前	6.49 ± 2.10	6.43 ± 1.16	1.37 ± 0.19	1.63 ± 0.21	2.57 ± 1.04	2.50 ± 0.67	0.98 ± 0.47	0.45 ± 0.09
反搏后	7.93 ± 1.57	10.83 ± 0.66 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.40	1.24 ± 0.25 <sup>b</sup>	3.42 ± 1.16	5.66 ± 0.77 <sup>ab</sup>	1.07 ± 0.76	1.12 ± 0.44

a为  $P < 0.05$  与反搏组比较; b为  $P < 0.05$  与反搏前比较。

### 2.3 大体病理形态结果

高脂组腹主动脉内膜可见许多凸起内膜表面、大小不一、嗜苏丹染色阳性的脂质条纹斑块形成, 有的相互融合成片, 病变以分支血管开口处周围为主; 反搏组病变较高脂组明显减少 (图 3), 病变面积百分比反搏组和高脂组分别为  $1.27\% \pm 0.35\%$  和  $7.83\% \pm 2.39\%$ , 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

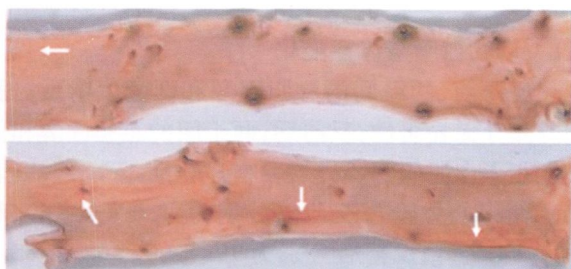


图 3 腹主动脉苏丹Ⅲ染色 高脂组(下)有明显的脂质条纹及斑块形成(桔黄色部分, 如箭头所指), 反搏组(上)脂质条纹及斑块显著减少。

### 2.4 光镜观察结果

高脂组内膜下有明显的脂质浸润, 而使内膜破损、明显增厚并向管腔内隆起, 并可见内皮间连接断裂及粥样斑块形成; 中膜平滑肌细胞极向排列紊乱, 增生活跃。反搏组内膜完整, 内皮与内皮下结构连接紧密, 脂质成分浸入较少; 中膜中度增厚, 平滑肌细胞排列整齐, 细胞核增大, 处于增生前期 (图 4)。

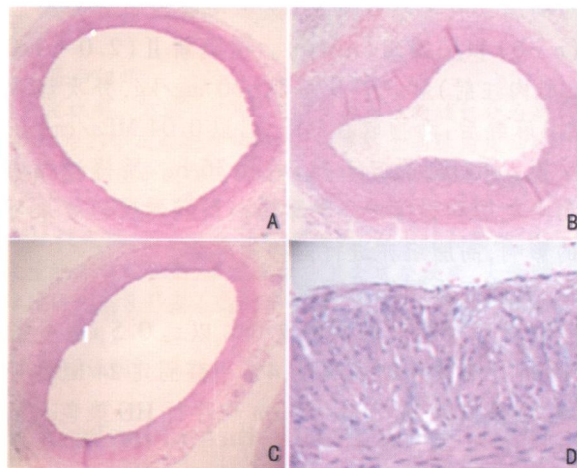


图 4 冠状动脉 HE 染色光镜观察 A 为正常冠状动脉 (×40), B 为高脂组冠状动脉 (×40), C 为反搏组冠状动脉 (×40), D 为 B 的放大图像 (×100)。

### 2.5 扫描电镜观察

扫描电镜可见正常对照组正常内皮细胞呈长梭型, 沿血管腔面纵行排列, 细胞连接紧密, 少见脱落, 亦少见有附着物 (图 5 左)。高脂组内皮细胞排列紊乱缺乏流线型, 大量内皮细胞脱落缺失, 有大量血小板、白细胞和沉积的蛋白颗粒黏附, 甚至可见内皮表面黏附的血小板被纤维素网缠绕形成早期白色血栓样改变 (图 5 中)。反搏组内皮细胞完整性较好, 细胞长轴与血流方向平行, 内皮排列与血管长径一致较光滑规则, 表面有少量血小板附着 (图 5 右)。

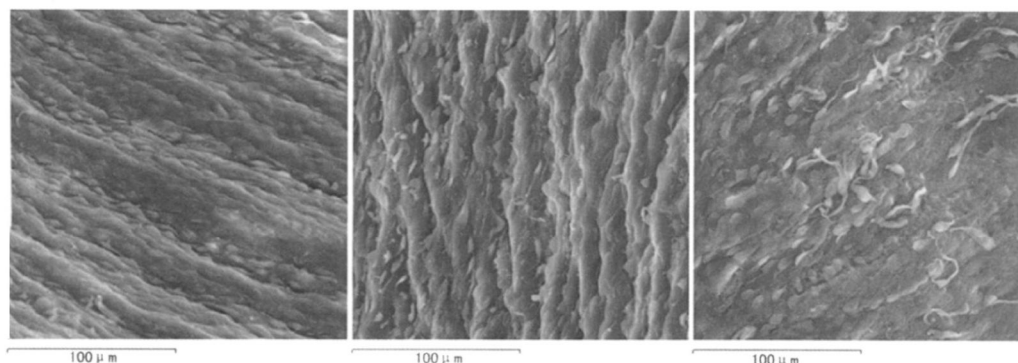


图 5 冠状动脉扫描电镜观察 (×500) 左为正常对照组, 中为反搏组, 右为高脂组。

2 6 透射电镜观察结果

透射电镜下见正常对照组冠状动脉内皮细胞呈扁平状,其下方的弹力纤维光滑连续,中膜平滑肌细胞为“收缩型”,核呈梭形,胞质内含大量肌丝(图 6 左)。高脂组大量内皮细胞出现核固缩变性,甚至凋亡、脱落,亦见胞质电子密度减低、线粒体肿胀等变性改变。内皮下大量泡沫细胞聚集(图 6 中),平

滑肌细胞增生且呈“合成型”改变,胞体肥大,核明显增大,胞质内线粒体、高尔基体、粗面内质网明显增多,线粒体增多且富含嵴,细胞内肌丝含量减少。并可见增殖的平滑肌细胞穿过断裂的内弹力膜迁移至内皮细胞下将内皮细胞顶起。反搏组内皮细胞变性程度及范围减轻,平滑肌细胞肌丝含量较多,接近收缩型,内弹力膜较完整连续(图 6 右)。

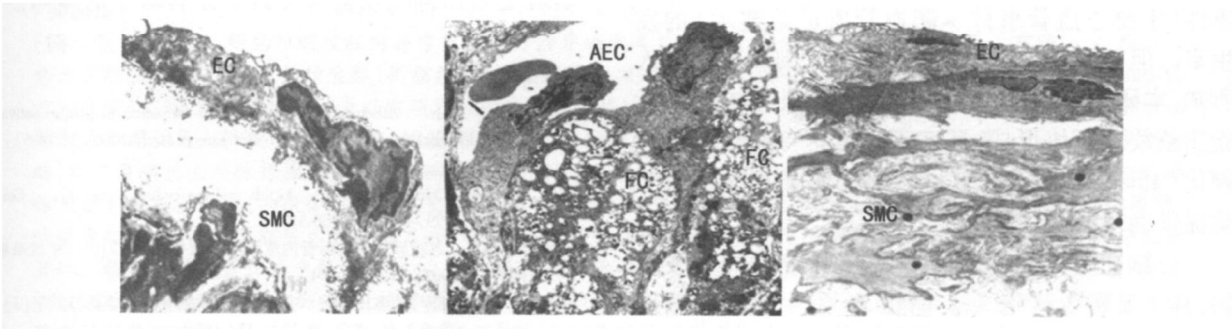


图 6 冠状动脉透射电镜观察 ( ×1000) 左为正常对照,中为高脂组,右为反搏组。EC 为正常内皮细胞, AEC 为凋亡的内皮细胞, FC 为泡沫细胞, SMC 为平滑肌细胞。

2 7 蛋白组学检测结果

与高脂组相比,反搏组检测到 7 种高表达的蛋

白质,其相关特性及功能见表 2。

表 2 反搏组猪胸主动脉内皮细胞高表达的 8 种蛋白的质谱鉴定及主要功能

Name	A cNO	Coverage	PI	MW ( kDa)	主 要 功 能
A cylam inoacy tpeptidase	89148	11. 1%	4. 89	81. 24	催化多肽或蛋白质 N 末端的 N-乙酰胺水解, 释放一个乙酰胺基。
V im entin	418884	26. 0%	6. 3	53. 579	属于细胞骨架蛋白, 与小窝蛋白 ( caveolin) 形成复合体, 调节细胞的形态、运动及粘附; 抑制花生四烯酸释放, 防止炎症反应。
M oesin	127236	12. 1%	5. 4	67. 64	在细胞骨架与细胞膜间充当连接桥梁, 控制细胞的形态、粘附、运动及信号传导; 通过调节 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 交换, 维持细胞的体积和 pH 值; 通过 PI3 激酶 和腺苷激酶信号通路抑制细胞凋亡, 促进细胞生存。
L-plastin polypeptide	190030	14. 0%	9. 4	63. 86	属于肌动蛋白家族成员, 调节整联蛋白介导的白细胞粘附、迁移和吞噬作用及细胞介导的细胞毒性作用。
Immunoglobulin heavy chain VDJ region	40805295	25. 3%	8. 6	10. 7	调节细胞的粘附, 抑制炎症及免疫反应。
A denylate kinase isoenzyme 1	125151	28. 9%	4. 8	21. 62	属于腺苷酸激酶家族成员, 催化 AMP+ ATP <=> 2ADP 反应中磷酸基转移, 将能量储存在 ADP 的 β 磷酸基中, 防止 ATP 耗竭引起的细胞凋亡。
Lam in in binding protein	34234	17. 2%		31. 78	通过与层粘连蛋白受体结合, 防止内皮细胞凋亡, 从而保护内皮。
2, 3-bisphosphoglycerate mutase	4502445	22. 0%	6. 1	29. 99	是一种具有三种功能的酶。作为合成酶, 催化 2, 3-BPG 生成; 作为变位酶, 催化 2-和 3-磷酸甘油酸相互转化, 参与糖分解与糖异生通路; 作为磷酸酶, 催化 2, 3-BPG 水解。

A cylam inoacy tpeptidase为乙酰胺基肽酶; V im entin为波形蛋白; M oesin为膜结构延伸刺突蛋白; L-plastin polypeptide为 L- 网素多肽; Immunoglobulin heavy chain VDJ region为免疫球蛋白重链 VDJ区; A denylate kinase isoenzyme 1为腺苷酸激酶同工酶 1; Lam in in binding protein为层粘连蛋白; 2, 3-bisphosphoglycerate mutase为 2, 3-二磷酸甘油酸变位酶; A cNO为蛋白组学数据库编号; Coverage为覆盖范围; PI为等电点; MW 为分子量。

### 3 讨论

国内外多中心研究表明<sup>[4-5]</sup>, EECP能显著降低心绞痛患者的心绞痛发作频率、硝酸甘油耗量,能显著延长活动平板心电图ST段下降1mm所耗时间,能显著改善心绞痛分级,促进侧支循环形成并改善心肌的核素灌注显像,能显著降低1年后主要心血管事件(心血管死亡、心肌梗死或再梗死)及联合终点事件(主要心血管事件+靶血管血运重建术)的发生率。但EECP治疗冠心病的确切机制大多不为人所知,本研究首次在体发现EECP能显著减少动脉脂质条纹及斑块形成,证实EECP具有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis As)作用,为EECP治疗冠心病提供确凿的实验证据。

心脑血管病是当前人类健康与寿命的主要威胁,其主要病变就是As。而在As发生机制的诸多环节中,血管内皮损伤是关键所在<sup>[1,2,5]</sup>,在As发生发展过程中起着扳机作用。实验研究表明,剪切应力影响动脉粥样斑块的形成<sup>[6,7]</sup>;离体实验表明<sup>[8]</sup>,提高血流剪切应力可以促进血管内皮细胞沿血流方向的梭形排列,抗击血流冲击损伤,促进血管内皮的自我修复能力,抑制内皮细胞凋亡。本实验首次在体发现,EECP可使排列紊乱的内皮细胞沿血液方向呈流线型排列,内皮细胞脱落显著减轻。这些发现说明EECP对在体的内皮细胞损伤具有修复作用,从而拮抗As的发生发展及病变进展。

本研究首次用蛋白组学手段,检测慢性EECP对EC蛋白表达的影响。查阅文献发现,在检测到的8种蛋白中,有的是细胞支架成分,与细胞的变形、粘附和运动等有关:如波形蛋白、膜结构延伸刺激蛋白、L-网素多肽和免疫球蛋白重链VDJ区等;有的参与细胞的能量代谢,与细胞凋亡有关,如腺苷酸激酶同功酶1、层粘连蛋白和膜结构延伸刺激蛋白等;有的与细胞内脂质代谢有关:如波形蛋白、2,3-二磷酸甘油酸变位酶、乙酰氨基酰肽酶和腺苷酸激酶同功酶1等<sup>[9-14]</sup>。这些结果提示,慢性EECP作用于EC,影响其蛋白分子的表达,可能通过下列分子机制拮抗As的发生发展:(1)作用于细胞支架,调节细胞的粘附,减轻免疫、炎症反应;(2)抑制内皮细胞凋亡;(3)调节EC内脂质代谢,减轻EC内脂质沉积。有关上述这8种蛋白质在冠状动脉粥样

硬化中的作用及其机制,目前尚无相关研究报道。本研究只是一个初步筛选,随后我们将进行一系列的研究,试图阐明控制这8种蛋白质的合成对动脉粥样硬化病变的影响。

[致谢] 感谢中山大学中山医学院病理教研室胡瑞德教授在病理标本取材、制作及阅片等方面给予的大力帮助,感谢中山大学中山医学院蛋白质组学实验室刘伟博士在蛋白质组学分析给予的帮助。

### [参考文献]

- [1] Keaney JF Jr. Atherosclerosis from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction [J]. *Mol Aspects Med*, 2000, **21** (4-5): 99-166
- [2] Dart AM, Chin-Dusting JPF. Lipids and the endothelium [J]. *Cardiovas Res*, 1999, **43** (2): 308-322
- [3] 黎健. 血脂异常导致血管内皮细胞的氧化损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 524
- [4] 马虹, 郑振声, 杜志民, 等. 体外反搏国内外发展动态与展望 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2003, **9** (3): 154-158
- [5] Michaels AD, Linnemeier G, Soran O, et al. Two-year outcomes after enhanced external counterpulsation for stable angina pectoris (from the International EECP Patient Registry [IEPR]) [J]. *Am J Cardiol*, 2004, **93** (4): 461-464
- [6] 危当恒, 王贵学, 王佐, 等. 剪切应力对家兔血管内膜增生及动脉粥样硬化斑块形成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (6): 410-414
- [7] 危当恒, 王贵学, 刘录山, 等. 低剪切应力上调基质细胞衍生因子1受体在动脉粥样硬化斑块中表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 558
- [8] Lip GY, Blann AD. Thrombogenesis, atherogenesis and angiogenesis in vascular disease: a new vascular triad [J]. *Ann Med*, 2004, **36** (2): 119-125
- [9] Barakat A, Lieu D. Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2003, **38** (3): 323-343
- [10] Takenouchi T, Miyashita N, Ozutsumi K, et al. Role of caveolin-1 and cytoskeletal proteins: actin and vimentin, in adipogenesis of bovine intramuscular preadipocyte cells [J]. *Cell Biol Int*, 2004, **28** (8-9): 615-623
- [11] Barreiro O, Yezli M, Serrador JM, et al. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes [J]. *J Cell Biol*, 2002, **15** (7): 1233-245
- [12] Wang J, Chen H, Brown EJ. L-plastin Peptide Activation of  $\alpha v \beta 3$  mediated Adhesion Requires Integrin Conformational Change and Actin Filament Disassembly [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (17): 14474-481
- [13] de Bruijn W, Oerlemans F, Wieringa B. Adenylate kinase I does not affect cellular growth characteristics under normal and metabolic stress conditions [J]. *Exp Cell Res*, 2004, **297** (1): 97-107
- [14] Chevalier N, Rigden DJ, Roy JV, et al. Trypanosoma brucei contains a 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase [J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (5): 1464-472

(此文编辑 李玲玲)