

Urantide对实验性动脉粥样硬化大鼠 C反应蛋白表达的影响

赵娟¹, 曹凯¹, 石艳², 任立群²

(1. 承德医学院病理生理学教研室, 河北省承德市 067000 2 吉林大学药学院
实验药理与毒理学教研室, 吉林省长春市 130021)

[关键词] 尾加压素 U^{I} Urantide 血管平滑肌细胞; C反应蛋白; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 观察 urantide对动脉粥样硬化大鼠 C反应蛋白表达的影响, 探讨其防治动脉粥样硬化的作用机制。**方法** 采用高脂饲料喂养及腹腔注射维生素 D3损伤动脉内膜的方法建立大鼠动脉粥样硬化模型, 随机分为四组: 对照组、模型组、氟伐他汀组、urantide组, 免疫组织化学法检测主动脉壁内 C反应蛋白的表达水平。体外培养血管平滑肌细胞, 随机分为四组: 对照组、尾加压素 U^{I} 组、氟伐他汀组、urantide组, 酶联免疫吸附法检测各组培养上清中 C反应蛋白浓度。**结果** 在胸主动脉内膜及中膜斑块内, 模型组 C反应蛋白阳性颗粒较对照组表达明显增加, urantide组及氟伐他汀组 C反应蛋白的表达减少; urantide各浓度组对血管平滑肌细胞培养上清中 C反应蛋白的表达均有下调趋势, 其中 10^{-6} mol/L urantide下调作用最强 ($P < 0.01$)。**结论** 尾加压素 U^{I} 在动脉粥样硬化中能促进炎症反应标志因子 C反应蛋白的大量表达, 而这种促进作用可以被尾加压素 U^{I} 受体拮抗剂 urantide抑制, 该研究为临床应用 urantide治疗动脉粥样硬化提供新的视角和实验依据。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Urantide on the Expression of C-reactive protein in the Experimental Atherosclerosis Rats

ZHAO Juan¹, CAO Kai¹, SHI Yan², and REN Liqun²

(1 Department of Pathophysiology, Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000 China; 2 Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, Jilin University, Jilin, Changchun 130021, China)

[KEY WORDS] Urotensin U^{I} Urantide Vascular Smooth Muscle Cell C-Reactive Protein Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of urantide on the expression of C-reactive protein (CRP) in rats with atherosclerosis and investigate its mechanism. **Methods** Model with atherosclerosis was induced by feeding high fat diet and arterial intimal injury of intraperitoneal injection of vitamin D3. rats were randomly divided into four groups: control group, model group, fluvastatin group and urantide group, and the expression of C-reactive protein in aortic wall were detected by immunological histochemical method. Cultured vascular smooth muscle cells in vitro were randomly divided into four groups: control group, urotensin U^{I} group, fluvastatin group and urantide group, and the expression of C-reactive protein in supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the plaques of thoracic aorta intima and tunica media, the expression of the positive particles of C-reactive protein in the model group was increasing obviously compared with that in the control group and the C-reactive protein expression in each experiment group of urantide was decreasing by fluvastatin. The C-reactive protein expression in the vascular smooth muscle cells supernatant of each urantide concentration group had downward trend, among which the 10^{-6} mol/L urantide was decreasing most ($P < 0.01$). **Conclusions** Urotensin U^{I} can facilitate the over-expression of C-reactive protein in atherosclerosis. However, the promotion can be inhibited by urotensin U^{I} receptor antagonist urantide. The experiment provides new views and experiment basis for the clinic treatment of atherosclerosis with urantide.

尾加压素 U^{I} (U^{I})作为目前收缩血管活性最强 的活性肽, 同时又是一种强烈的丝裂原, 它在动脉粥

[收稿日期] 2010-12-21

[基金项目] 吉林省科技厅重大项目资助 (2005040425)

[作者简介] 赵娟, 博士, 主要从事动脉粥样硬化分子病理学研究, Email为 zhaajuan811015@sina.com。通讯作者任立群, 博士研究生导师, Email为 renk@jlu.edu.cn。

样硬化 (As) 中的病理生理意义愈来愈受到人们的重视。因此, 对 U^①及其受体的直接干预, 可能为治疗 As 提供新的策略和手段^[1]。urantide 是在人尾加压素^② (hU^②) 基础上衍生的肽类 U^①受体拮抗剂, 其能竞争性拮抗 U^①对大鼠胸主动脉收缩作用及对血管壁细胞的促丝裂作用^[2]。C 反应蛋白 (CRP) 是 As 炎症反应的标志物, 可通过多种机制促进 As 的炎症反应^[3]。U^①和炎症因子 CRP 都是促 As 发生、发展的重要因素。那么 urantide 在拮抗 U^①促 As 作用的同时, 是否对炎症因子 CRP 的表达也具有一定的作用, 这对于我们研究在 As 中 U^①与炎症介质之间相互作用机制有重要的实验意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重为 180~200 g 由吉林大学白求恩医学部动物部提供。urantide 由上海华大天源生物科技有限公司合成; DMEM 干粉培养基及 U^①购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自天津灏洋公司; α -SMA 抗体、兔抗大鼠 CRP 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; 生物素标记二抗 IgG 购自武汉博士德生物工程公司; S-ABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.2 大鼠动脉粥样硬化模型制备及实验分组

Wistar 大鼠 160 只, 随机分为两组: 对照组大鼠 20 只, 饲以普通饲料; 模型组大鼠 140 只, 实验开始时在饲以高脂饲料基础上, 每只大鼠给予腹腔注射维生素 D₃ (共 70 U/kg)。实验周期为 6 周。HE 染色, 观察大鼠胸主动脉形态学改变。As 模型复制成功后, 再随机分三组: 模型组 30 只、氟伐他汀组 30 只、urantide 组 75 只, 每个时间点各 25 只。对照组和模型组每日尾静脉注射生理盐水 30 μ g/kg 连续 14 天; 氟伐他汀组每日 5 μ g/kg 氟伐他汀灌胃, 连续 14 天; urantide 组每日尾静脉注射 urantide 30 μ g/kg 给药时间分别为 3、7 和 14 天。全自动生化分析仪检测大鼠血清 Ca²⁺、TC、TG、HDL 及 LDL 含量。

1.3 CRP 免疫组织化学染色结果半定量分析

取大鼠胸主动脉石蜡切片, 采用 SABC 法进行免疫组织化学染色, 按试剂盒操作说明进行, 一抗滴加兔抗大鼠 CRP 多克隆抗体按 1:100 比例稀释, 新鲜配置的 DAB 显色液, 室温下显色约为 3~5 min, 复染, 封片。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代一抗作为

阴性对照。每张切片随机选取 10 个高倍镜视野 ($\times 400$), 用 Introduction to Image-Proplus 6.0 病理图像分析软件对所选视野内的免疫组织化学阳性信号进行图像分析, 计算各组大鼠胸主动脉阳性信号的平均光密度值。

1.4 血管平滑肌细胞原代培养及实验分组

健康雄性 Wistar 大鼠采用贴块法进行血管平滑肌细胞 (VSMC) 原代培养, 取对数生长期的细胞进行实验。按所加条件培养液分为: 对照组用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养; U^①组加入 U^①终浓度为 10⁻⁸ mol/L; 氟伐他汀组在 U^①组培养液的基础上加入氟伐他汀, 终浓度为 10⁻⁷ mmol/L; urantide 组在 U^①组培养液的基础上加入 urantide, 终浓度分别为 10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ 及 10⁻⁶ mol/L。

1.5 urantide 对 VSMC 培养上清中 CRP 表达的影响

对数生长期细胞采用 ELISA 检测细胞培养液 CRP 含量, 490 nm 波长测量平均光密度值, 平均光密度值反应 CRP 相对含量。

1.6 统计学方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较用方差分析或秩和检验, 组间两两比较采用最小显著差法 (LSD)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胸主动脉组织学改变

实验 6 周后, 胸主动脉 HE 染色显示, 对照组血管内皮完整, 中膜可见梭形平滑肌细胞, 弹力纤维层结构清晰完整; 模型组病变部位内膜明显增厚, 血管内皮细胞排列不完整, 平滑肌细胞在内膜增生显著, 大量堆积的泡沫细胞, 出现典型 As 病理改变。由此表明, 用腹腔注射维生素 D₃ 联合高脂饲料喂养的方法可成功建立大鼠 As 模型 (图 1)。

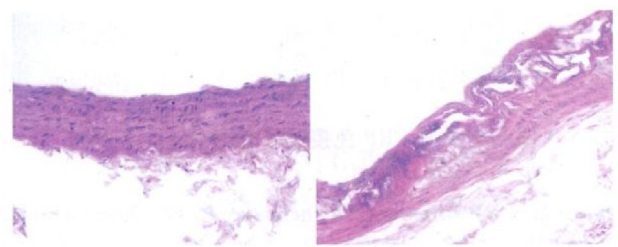


图 1. 光镜下观察大鼠胸主动脉 (HE, $\times 200$) 左为对照组, 右为模型组。

Figure 1. Observation of aorta pectoralis of rat under light microscope

2.2 血脂和血钙含量的变化

与对照组比较, 模型组血清中 Ca^{2+} 、TG、TC、HDL 及 LDL 含量均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 氟伐他汀组血清中 Ca^{2+} 、TG、TC、HDL 及 LDL

含量均明显降低 ($P < 0.01$); urantide 组血清中 Ca^{2+} 、TG、TC、HDL 及 LDL 含量随给药时间的延长呈现逐渐降低的趋势, 与模型组比较均明显降低 ($P < 0.01$), 达到或接近氟伐他汀组水平 (表 1)。

表 1. 血脂和血钙含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1. The changes of serum calcium and serum lipids

分 组	n	Ca^{2+}	TG	TC	HDL	LDL
对照组	6	2.62 ± 0.06	0.03 ± 0.01	1.20 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.16 ± 0.01
模型组	6	3.82 ± 0.01 ^a	1.74 ± 0.08 ^a	17.61 ± 0.08 ^a	2.19 ± 0.05 ^a	16.05 ± 0.15 ^a
氟伐他汀组	6	3.12 ± 0.01 ^{ac}	0.74 ± 0.05 ^{ab}	12.45 ± 0.02 ^{ac}	1.27 ± 0.00 ^{ac}	11.95 ± 0.06 ^{ac}
urantide 组						
3天	6	3.57 ± 0.00 ^{ac}	1.04 ± 0.00 ^{ac}	17.03 ± 0.01 ^{ac}	1.98 ± 0.00 ^{ac}	15.16 ± 0.01 ^{ac}
7天	6	3.48 ± 0.01 ^{ac}	0.72 ± 0.14 ^{ab}	15.87 ± 0.00 ^{ac}	1.81 ± 0.02 ^{ac}	14.20 ± 0.01 ^{ac}
14天	6	3.43 ± 0.39 ^{ac}	0.43 ± 0.04 ^{ac}	12.83 ± 0.06 ^{ac}	1.48 ± 0.06 ^{ac}	10.16 ± 0.05 ^{ac}

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.05$, c为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.3 CRP免疫组织化学染色情况

对照组大鼠胸主动脉 CRP 免疫组织化学染色阳性颗粒在内膜及中膜微量表达; 模型组大鼠胸主

动脉内膜、中膜及 As 斑块内 CRP 阳性颗粒较对照组表达明显增加, 染色增强; urantide 及氟伐他汀均可减少 CRP 的表达 (表 2 和图 2)。

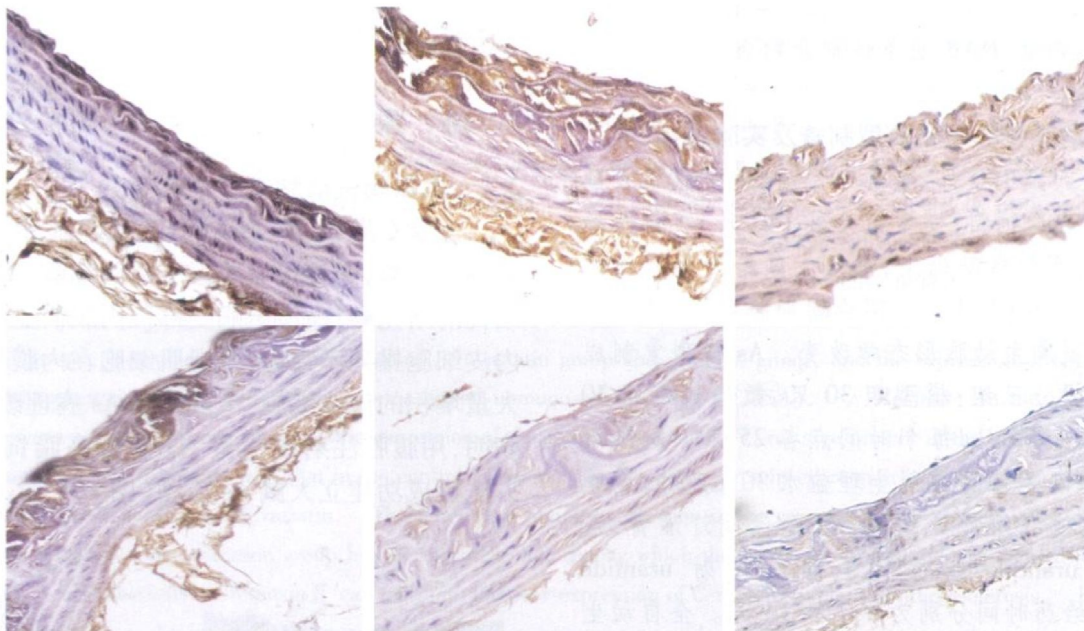


图 2. 大鼠胸主动脉 CRP 免疫组织化学染色 ($\times 200$) 上图从左至右分别为对照组、模型组、氟伐他汀组, 下图从左至右为 urantide 给药 3 天组、7 天组及 14 天组。

Figure 2. CRP immunohistochemistry in rat thoracic aorta

2.4 urantide 对 VSMC 培养上清中 CRP 含量的影响

U \oplus 组 VSMC 培养上清中 CRP 表达明显增加, 与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); 各个

urantide 浓度组均可抑制 CRP 的表达, 随着浓度的增加抑制作用逐渐增加, 各组与 U \oplus 组相比有显著性差异 ($P < 0.01$; 表 3)。

表 2. 大鼠胸主动脉 CRP 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. CRP expression in rats aortic pectoralis

分 组	n	CRP 平均光密度值
对照组	18	1.004 ± 0.002
模型组	23	10.136 ± 0.011 ^a
氟伐他汀组	25	1.265 ± 0.071 ^{ab}
urantide 组		
3 天	24	8.390 ± 0.059 ^{ab}
7 天	25	5.467 ± 0.048 ^{ab}
14 天	25	3.122 ± 0.011 ^{ab}

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

表 3. urantide 对 VSMC 中 CRP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The effect of urantide on CRP expression in VSMC

分 组	n	CRP 平均光密度值
对照组	5	1.63 ± 0.18
U \oplus 组	5	2.20 ± 0.07 ^a
氟伐他汀组	5	1.74 ± 0.03 ^b
urantide 组		
10^{-10} mol/L	5	1.90 ± 0.02 ^{ab}
10^{-9} mol/L	5	1.84 ± 0.08 ^{ab}
10^{-8} mol/L	5	1.69 ± 0.02 ^b
10^{-7} mol/L	5	1.68 ± 0.02 ^b
10^{-6} mol/L	5	1.64 ± 0.07 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 U \oplus 组比较。

3 讨 论

Ross 等^[4]在 1999 年首先提出 As 的“炎症学说”,指出 As 是具有慢性炎症反应特征的病理过程。CRP 是 As 炎症反应的标志物,可通过多种机制促进 As 的炎症反应,从而在 As 的发生、发展中发挥重要的作用: ①诱导多种细胞因子如 IL-6、MCP-1 及内皮素的表达,对 As 的炎症反应起间接调节作用^[5-7]; ②致敏内皮细胞,产生 CD4⁺ T 细胞介导的细胞毒作用造成内皮细胞损坏,CRP 水平升高与内皮细胞功能衰竭和 As 的进程相关^[8]; ③局部血管壁中 CRP 浓度的升高往往与单核巨噬细胞的浸润程度成正比,刺激外周血单核细胞合成组织因子及 PAI-1,促进血管内凝血和血栓形成^[9]; CRP 本身能降低动脉壁弹性,促进凝血及炎症反应,增加 As

的发生^[10]。因此,鉴于 CRP 在 As 中的以上生物学作用,采取相应的措施和药物抑制 CRP 的表达,及时减轻炎症反应,可降低 As 发病率。本研究中,对照组 CRP 阳性颗粒在胸主动脉内膜及中膜微量表达;模型组 CRP 阳性颗粒在胸主动脉内膜及中膜斑块内大量表达;urantide 组 CRP 阳性染色强度和范围随给药时间的延长而逐渐减少。由此表明,U \oplus 在 As 中能促进炎症反应标志因子 CRP 的大量表达,而这种促进作用可以被 U \oplus 受体拮抗剂 urantide 下调,缓解大鼠 As 症状。

在 As 病变形成早期,各种原因诱发 VSMC 生物学行为改变,使其从血管中膜迁移至内膜,进而增殖并发生表型变化,由收缩型转化为合成型,呈去分化状态。合成型 VSMC 具有较强的增殖能力,可释放多种生长因子、细胞因子,合成并分泌 ECM,还可摄取脂质成为肌源性泡沫细胞,参与肌性内膜增厚以及 As 病变的形成,是 As 斑块中主要的病变细胞成分^[11]。U \oplus 是一种具有丝裂原样作用的自分泌/旁分泌生长因子,有刺激细胞增殖和促进 ECM 表达等多种非血流动力学效应。U \oplus 的促丝裂作用最早是在大鼠主动脉 VSMC 中证明的,它通过提高 MAPK 途径中 ERK 的磷酸化水平促进 VSMC 增殖,促进 As 的发生、发展^[12]。研究发现,CRP 参与 As 早期的形成,五聚体的 CRP 在结合细胞膜表面后经过一个结构的改变,即解构成为单体 CRP,通过 ERK 途径激活 MCP-1 及 IL-6 等炎症因子在 As 病变细胞中表达,加重炎症反应,引起粥样斑块的不稳定^[13]。那么 U \oplus 受体拮抗剂 urantide 是否可通过阻断 PK 通路 (ERK、p38MAPK),从而抑制 U \oplus 及 CRP 在 As 中发挥作用呢?在本研究中取对数生长期 VSMC,加入条件培养液,于 48 h 收集培养上清,用 ELISA 检测 VSMC 上清中 CRP 含量,结果发现 U \oplus 能促进 CRP 的大量表达;各个 Urantide 浓度组均可抑制 CRP 的表达,随着浓度的增加,抑制 CRP 表达的作用逐渐增加。据此推断,在 As 中 U \oplus 可能协同 CRP 共同促进 VSMC 增殖,在 As 早期发挥生物学作用;而 urantide 则可通过阻断 PK 通路,抑制 U \oplus 及 CRP 对 VSMC 发挥作用。

综上所述,在 As 中,U \oplus 特异性受体拮抗剂 urantide 对 CRP 的表达也有下调作用,使大鼠 As 症状缓解,对 As 起一定的保护作用。其作用机制可能是 urantide 直接拮抗 U \oplus 与其受体 GPR14 结合产生的,也可能是通过调节 CRP 等炎症因子的表达间接引起的,或者是由其他途径介导的。尚有待我们进一步研究。U \oplus 受体拮抗剂 urantide 作为临床抗

As药物亦将展现出广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] Ban Y, Watanabe T, Suguro T, et al. Increased plasma urotensin II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia [J]. *J Atheroscler Thromb* 2009, 16 (3): 179-187.
- [2] Cheriyan J, Burton T, Bradley T, et al. The effects of urotensin II and urantide on forearm blood flow and systemic haemodynamics in humans [J]. *Br J Clin Pharmacol* 2009, 68 (4): 518-523.
- [3] 李志勇, 李勋. C反应蛋白与冠状动脉粥样硬化性心脏病 [J]. *医学综述*, 2008, 14 (23): 3580-585.
- [4] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993, 362 (29): 801-809.
- [5] 李建军, 李庚山, 黄从新, 等. 球囊损伤兔主动脉后核因子 κB 活性的动态变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (1): 34-36.
- [6] Penn M, Topol E. Tissue factor: the emerging link between inflammation, thrombosis and vascular remodeling [J]. *Circ Res* 2001, 89 (1): 1-2.
- [7] Yasojima K, Schwab C, McGee EG, et al. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol* 2001, 158 (34): 1039-051.
- [8] Tomai F, Crea F, Gasparone A, et al. Unstable angina and elevated C-reactive protein levels predict enhanced vasoreactivity of the culprit lesion [J]. *Circulation* 2001, 104 (74): 1471-476.
- [9] Paseeri V, Willerson T, Yeh T, et al. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells [J]. *Circulation* 2000, 102 (234): 2165-168.
- [10] Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter H, et al. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease [J]. *Circulation* 2000, 102 (43): 1000-043.
- [11] 王生兰, 苏娟, 徐一洲, 等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及其鉴定 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (4): 268-272.
- [12] Boos CJ, Lip GY. Elevated high-sensitive C-reactive protein, large arterial stiffness and atherosclerosis - a relationship between inflammation and hypertension [J]. *Hypertension* 2005, 19 (5): 511-516.
- [13] Bisioendial RJ, Kastelein JJ, Levels JH, et al. Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans [J]. *Circ Res* 2005, (6): 714-716.

(此文编辑 文玉珊)