

烟酸对实验性动脉粥样硬化兔主动脉骨桥蛋白表达的影响

文伟明¹, 雷敏², 徐戈¹, 李志乐¹

(1. 广西医科大学第一附属医院心血管病研究所, 广西南宁市 530021; 2. 广西玉林市红十字会医院心内科, 广西玉林市 537000)

[关键词] 烟酸; 动脉粥样硬化; 骨桥蛋白

[摘要] **目的** 探讨烟酸对动脉粥样硬化兔主动脉壁骨桥蛋白表达的影响。**方法** 16 只雄性新西兰大白兔给予高脂饮食 8 周后, 随机分为高脂血症组与烟酸组; 高脂血症组 ($n=8$) 继续饲以高脂饲料 6 周; 烟酸组 ($n=8$) 在高脂饮食基础上给予烟酸 $[200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 6 周。另选 8 只兔给予普通饮食 14 周作为正常对照组。14 周末处死动物进行主动脉病理学检测, 采用免疫组织化学染色检测兔主动脉壁骨桥蛋白的表达水平, 采用实时定量 PCR 检测各组兔主动脉壁骨桥蛋白 mRNA 的表达。**结果** 与正常对照组相比, 高脂血症组主动脉内膜厚度和斑块面积显著增加, 骨桥蛋白和 mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$)。烟酸组主动脉内膜和斑块面积显著缩小, 骨桥蛋白和 mRNA 表达显著减少 (均 $P<0.01$)。相关性分析显示: 骨桥蛋白表达量与动脉粥样硬化斑块面积 ($r=0.821, P<0.01$) 及内膜厚度 ($r=0.818, P<0.01$) 均呈正相关; 骨桥蛋白 mRNA 表达量与动脉粥样硬化斑块面积 ($r=0.888, P<0.01$) 及内膜厚度 ($r=0.874, P<0.01$) 也均呈正相关。**结论** 烟酸抗动脉粥样硬化作用除与其降脂作用有关外, 还可能与其降低骨桥蛋白和 mRNA 水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Nicotinic Acid on Plaques Formation and Expression of Osteopontin mRNA in Aorta of Experimental Atherosclerosis Rabbit

WEN Wei-Ming¹, LEI Min², XU Ge¹, and LI Zhi-Le¹

(1. Research Institute of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Cardiology, the Red Cross Hospital of Yulin, Yulin, Guangxi 537000, China)

[KEY WORDS] Nicotinic Acid; Artery Atherosclerosis; Osteopontin

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of nicotinic acid on the atherosclerotic plaques formation and osteopontin (OPN) mRNA expression of aorta. **Methods** 16 New Zealand white rabbits were fed with high-fat diet for 8 weeks, and then were randomly divided into two groups: (1) hyperlipidemia group ($n=8$): maintained high-fat diet for 6 weeks; (2) niacin treatment group ($n=8$): the same fat diet supplemented with niacin $[200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ for 6 weeks. Control group ($n=8$) was fed with normal diet for 14 weeks. At the end of the study, all rabbits were sacrificed to detect the histopathological changes and OPN mRNA expression of the aortas. **Results** Rabbits fed with high-fat diet showed more aorta endometrial thickness, plaque area and OPN mRNA expression (all $P<0.01$). Compared with hyperlipidemia group, rabbits treated with niacin showed less aorta endometrial thickness, plaque area and OPN expression (all $P<0.01$). Correlation analysis suggested that expressions of OPN mRNA ($r=0.888, P<0.01$) and OPN protein ($r=0.821, P<0.01$) were positively correlated with area of atherosclerotic plaque, expressions of OPN mRNA ($r=0.874, P<0.01$) and OPN protein ($r=0.818, P<0.01$) were also positively correlated with intimal thickness of aorta. **Conclusion** Niacin's role of anti-atherosclerosis not only is due to its lipid-lowering effect, but also may be related to its OPN expression-lowering effect.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是危害人类健康的主要疾病, 是心血管疾病发病和死亡的主要

[收稿日期] 2012-05-13

[基金项目] 广西青年科学基金资助 (桂科青 0832049)

[作者简介] 文伟明, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病的诊治, E-mail 为 pigapic@163.com。雷敏, 硕士, 住院医师, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化机制, E-mail 为 toleimin@163.com。徐戈, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病的诊治, E-mail 为 xuggee@21cn.com。

原因。尽管目前已广泛使用他汀类药物对动脉粥样硬化进行防治,但依然有心血管风险残留存在^[1]。因此,进一步寻找能有效优化血脂、降低心血管风险的辅助治疗药物已成为抗 As 治疗的策略之一。烟酸因其具有全面而独特的调脂和升高高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)最有效的作用而得到了更多的关注。研究表明,烟酸抗动脉粥样硬化的机制除与其全面的调脂作用有关外,还可能与其他作用有关^[2]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)作为 As 病变部位合成和分泌的一种细胞因子,在动脉粥样硬化斑块中巨噬细胞和活化了的淋巴细胞高度表达,在 As 发展过程中具有调节炎症因子产生、趋化巨噬细胞、促进平滑肌细胞增殖和迁移、促进脂纹形成和斑块发展及参与粥样硬化斑块的钙化过程等多方面的作用;通过用抗 OPN 抗体阻断 OPN 的作用,可缓解 As 的病变进展^[3]。目前,烟酸对 OPN 表达的影响国内外文献未见相关报道。本研究通过建立实验性动脉粥样硬化兔模型,观察 OPN 在动脉粥样硬化兔主动脉壁的表达以及烟酸对其表达的影响,进一步探讨烟酸抗动脉粥样硬化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新西兰雄性大白兔(广西医科大学实验动物中心),胆固醇(安徽天启化工科技有限公司),蛋黄粉(安徽亳州市红日实业有限责任公司),烟酸粉(北京嘉康源科技发展有限公司);Trizol 总 RNA 提取试剂(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司),Real Master Mix 试剂盒(SYBR Green 染料法)(TIANGE 公司),聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物(上海闪晶分子生物科技有限公司),小鼠抗兔 OPN 单克隆抗体(Novus Biologicals 公司);病理图像分析仪(DMR + 550, 德国),紫外分光光度计(PE LAMB DA BIO 20, 美国),荧光实时定量 PCR 仪(ABI 7500, 美国)。

1.2 动脉粥样硬化兔模型的建立和烟酸干预

24 只新西兰大白兔(清洁级动物, 雄性, 3 月龄, 体重 2.05 ± 0.20 kg), 随机取 16 只予以高脂饲料(1% 胆固醇、7.5% 蛋黄粉、8% 猪油), 喂养 8 周后再随机分为两组:高脂血症组(8 只), 继续饲以高脂饲料 6 周;烟酸组(8 只), 在继续高脂饲料喂养的基础上, 予以烟酸 $[200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 口服治疗 6 周;其余 8 只兔予以普通饲料喂养 14 周作为正常对

照组。每只兔每日总食量约为 120 g, 饮水不限。至第 14 周末, 空气栓塞处死存活动物, 无菌条件下分离主动脉血管(从主动脉起始处至髂动脉分叉处), 生理盐水冲洗。部分用作病理学检测, 部分置液氮中冻存待行实时定量 PCR 检测。

1.3 主动脉病理学检测

选取靠近主动脉弓部的主动脉约 1.5 cm, 置于 4% 福尔马林溶液内固定 24 h 以上, 梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 血管横断面作 5 μm 连续切片, 常规苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)染色做病理学检测。由有经验的病理科医师采用高清晰度的病理图像分析系统测定主动脉内膜厚度及斑块的最大横截面积, 计算其占主动脉横截面积的比例。

1.4 免疫组织化学法测定主动脉壁骨桥蛋白的表达

用 SABC 法对石蜡切片进行免疫组织化学染色。OPN 原液按 1:100 稀释。阳性对照参考 Novus Biologicals 公司提供的已知阳性切片, 阴性对照以 PBS 液代替一抗。阳性表达染色呈棕黄色或褐色, 定位于靶细胞胞浆内。参照 Soslow 等^[4]提到的方法, 从两方面进行免疫组织化学评分(immunohistochemical scores, IHS): (1) 阳性细胞显色强度分级: 0 (阴性)、1 (弱阳性)、2 (阳性)、3 (强阳性); (2) 阳性细胞百分比分级: 阳性细胞 $\leq 1\%$ 为 0 分、2% ~ 10% 为 1 分、11% ~ 50% 为 2 分、51% ~ 80% 为 3 分、81% ~ 100% 为 4 分。将这两方面评分相乘得出 IHS。每例的评分均为高倍($\times 200$)镜下观察 5 个视野求得的平均分。

1.5 荧光定量 PCR 法检测主动脉 OPN mRNA 表达

按 Trizol 说明书抽提兔动脉的总 RNA, 紫外分光光度仪测定 RNA 量和纯度。取 1 μg RNA 在 20 μL 逆转录体系中逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物进行荧光定量 PCR。OPN 上游引物: 5'-TAAACACGCTGATTCGGGC-3', 下游引物: 5'-CTTCAATGGACTTACTCGGGA-3', 扩增目的片段长度: 186 bp; 内参照 β -actin 上游引物: 5'-CGCAGAAACGAGACGAGA-3', 下游引物: 5'-GCTGTCACCTTACCGTTCC-3', 扩增目的片段长度: 126 bp。实时定量 PCR 反应在荧光实时定量 PCR 仪上进行。根据得出的 Ct 值, 进行相对定量表达的计算, 其计算公式为: OPN 相对 mRNA 表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct}-Q) - (\Delta\text{Ct}-C)$, $\Delta\text{Ct}-Q$ 为目标组靶基因的 Ct 值与内参照基因 Ct 值之差; $\Delta\text{Ct}-C$ 为正常对照组靶基因的平均 Ct 值与内参照基因的平均 Ct 值之差。

1.6 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的显著性检验采用 t 检验,多组间差异的显著性检验采用方差分析,相关统计采用 Pearson's 相关回归分析。采用 SPSS 13.0 软件处理数据。

2 结 果

2.1 烟酸对动脉粥样硬化斑块的影响

HE 染色结果显示,正常对照组血管内膜连续、光滑、内皮完整;高脂血症组血管内膜明显增厚,内皮下见脂质沉积和泡沫细胞形成,泡沫细胞分布于整个血管壁,局部聚集成脂质斑块,斑块内纤维成

分少,细胞成分多,可见钙化(图 1 箭头处),中膜平滑肌细胞增生,排列紊乱;烟酸组内膜病变较高脂血症组明显减轻(表 1 和图 1)。

表 1. 各组主动脉内膜厚度和斑块面积变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Changes of area of atherosclerotic plaque and intimal thickness of aorta in three groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	内膜厚度(μm)	斑块面积
正常对照组	8. 11 \pm 3. 86	0
高脂血症组	85. 72 \pm 13. 42 ^a	66. 81% \pm 16. 47% ^a
烟酸组	41. 37 \pm 15. 69 ^b	28. 02% \pm 8. 83% ^b

a 为 $P < 0. 01$,与正常对照组相比;b 为 $P < 0. 01$,与高脂血症组相比。

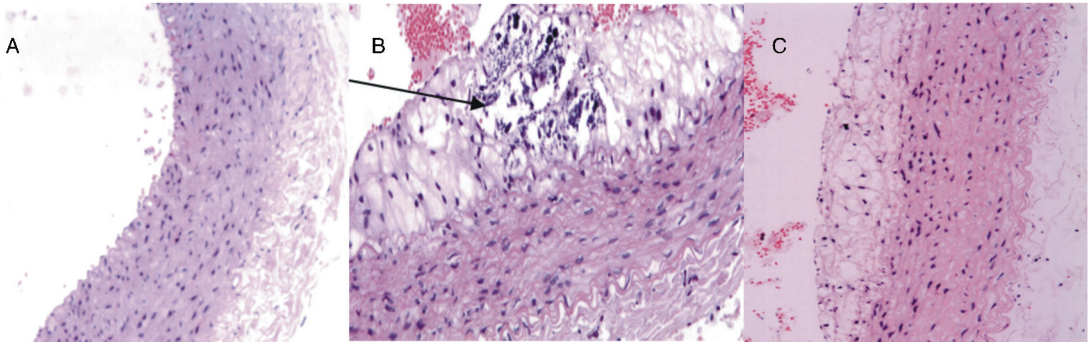


图 1. 各组兔主动脉 HE 染色结果对比 ($\times 100$) A 为正常对照组,B 为高脂血症组,C 为烟酸组。

Figure 1. The aortas of rabbits in three groups dyed by HE stain ($\times 100$)

2.2 烟酸对兔主动脉骨桥蛋白表达的影响

正常对照组几乎无 OPN 的表达;高脂血症组 OPN 的表达明显增强,包括整个动脉血管壁的内膜层和平滑肌层,呈向心性分布;烟酸组动脉 OPN 的表达量降低(图 2)。免疫组织化学评分结果显示,

正常对照组为 $0. 50 \pm 0. 55$,高脂血症组为 $7. 25 \pm 1. 98$,烟酸组为 $3. 60 \pm 0. 89$;其中高脂血症组较正常对照组明显升高,烟酸组较高脂血症组明显降低,差异均具有统计学意义 ($P < 0. 05$),烟酸组与正常对照组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。

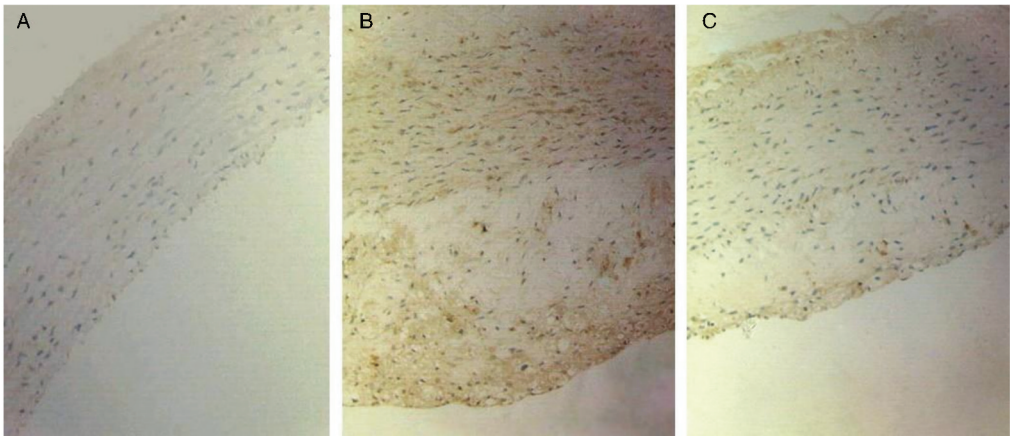


图 2. 各组兔主动脉 OPN 表达情况 (免疫组织化学染色, $\times 200$) A 为正常对照组,B 为高脂血症组,C 为烟酸组;图中染成棕黄色或褐色染色的为 OPN 表达。

Figure 2. The expression of OPN proteinin in three groups (immunohistochemistry, $\times 200$)

2.3 烟酸对主动脉 OPN mRNA 的影响

各组标本 OPN 及内参照 β -actin mRNA 的扩增曲线光滑, 溶解曲线均为单峰, 说明产物单一, 无非特异性扩增。相对定量分析结果显示, 高脂血症组 OPN mRNA 的相对表达量为 38.68 ± 15.87 , 显著高于正常对照组的 1.08 ± 0.46 ($P < 0.01$); 烟酸组 OPN mRNA 的相对表达量为 11.63 ± 3.44 , 较高脂血症组明显降低 ($P < 0.01$) (图 3)。

2.4 OPN 表达与斑块面积、主动脉内膜厚度的相关性

OPN 蛋白表达量与动脉粥样硬化斑块面积呈正相关 ($r = 0.821, P < 0.01$), 与动脉内膜厚度也呈正相关 ($r = 0.818, P < 0.01$) (图 4)。OPN mRNA 表达量与动脉粥样硬化斑块面积呈正相关 ($r = 0.888, P$

< 0.01), 与动脉内膜厚度也呈正相关 ($r = 0.874, P < 0.01$) (图 5)。

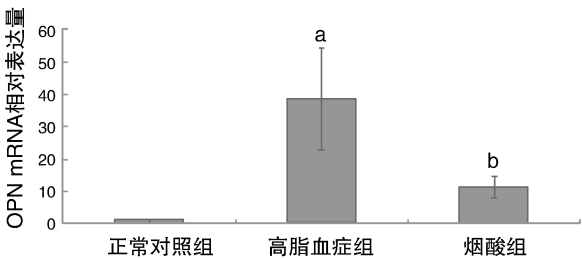


图 3. 各组 OPN mRNA 的表达情况 a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与高脂血症组相比。

Figure 3. The expressions of OPN mRNA in three groups

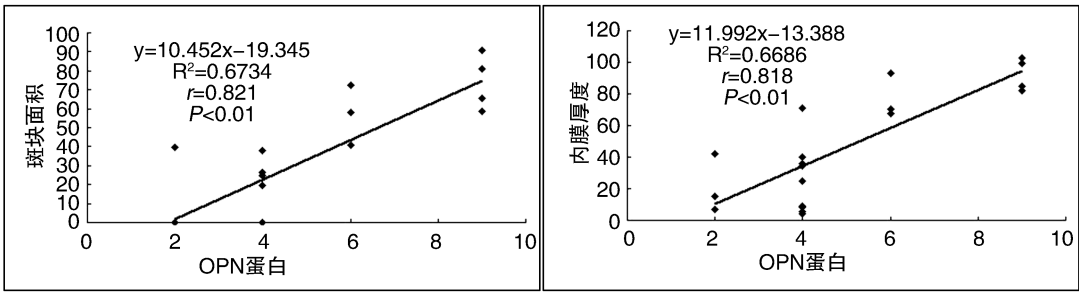


图 4. OPN 蛋白表达量与主动脉斑块面积及内膜厚度的相关分析

Figure 4. Correlation analysis between expressions of OPN protein and area of atherosclerotic plaque, intimal thickness of aorta

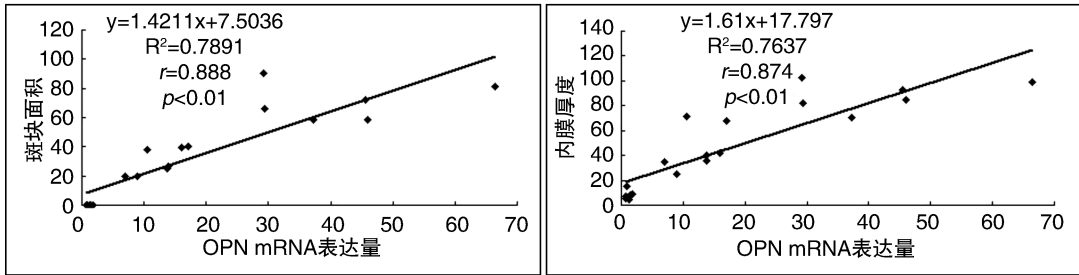


图 5. OPN mRNA 表达量与主动脉斑块面积及内膜厚度的相关分析

Figure 5. Correlation analysis between expressions of OPN mRNA and area of atherosclerotic plaque, intimal thickness of aorta

3 讨论

在本实验中, 我们观察到与正常对照组相比, 高脂血症组主动脉内膜和斑块面积也显著增加, 揭示了血脂异常与 As 的发生密切相关。同时还观察到烟酸干预 6 周后主动脉斑块面积和内膜厚度与高脂血症组相比明显减少, 证明烟酸确能延缓动脉粥样硬化斑块形成。已发表的具有硬终点 (hard end point) 的临床试验结果也表明, 烟酸能降低急性心肌梗死的复发率, 抑制冠心病的病情进展, 减少冠

状动脉缺血终点事件, 并可降低冠心病死亡率。

本实验中高脂血症组兔主动脉 OPN mRNA 和蛋白表达水平均较正常对照组明显升高, 烟酸组 OPN mRNA 和蛋白表达均较高脂血症组明显降低, 且各组 OPN mRNA 和蛋白表达量与动脉粥样硬化斑块面积及内膜厚度呈正相关, 表明 OPN 与 As 发生、发展密切相关, 这与目前人们对 OPN 在 As 中具有重要作用的广泛认知一致。而烟酸可能通过下调 OPN mRNA 和蛋白表达延缓动脉粥样硬化斑块形成。研究发现, 在病理状态时, OPN 在炎症部位

和重构组织中表达明显上调,通过与细胞表面整合素受体和 CD44 黏附性糖蛋白等结合后激活细胞内多条信号通路发挥细胞信号转导作用,具有介导细胞趋化、黏附和迁移,调节细胞因子表达、免疫功能和抑制细胞凋亡等多种生物学功能,在 As 过程中发挥着重要作用^[5]。各种 As 危险因素损伤了血管内膜,刺激内皮细胞和血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC),释放包括 OPN 在内的活性物质,活化 T 细胞和巨噬细胞等并使其细胞表面整合素受体和 CD44 表达增强。OPN 与受体结合后通过信号转导途径,促进了巨噬细胞、VSMC、外膜成纤维细胞和肌成纤维细胞向内膜的迁移^[6],并诱导细胞因子和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 产生,进一步放大炎症免疫反应,促进了 As 的发生和发展。

烟酸下调 OPN 表达的机制目前尚未完全明确,可能与以下因素有关:(1) 烟酸的调脂作用。烟酸降低了甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 等 As 危险因素,并升高了 HDLC 这一心血管保护因素,减轻了脂质沉积和高血脂对血管细胞的刺激,从而使细胞表达和分泌 OPN 减少。(2) 烟酸的抗炎作用。烟酸具有独立于调脂作用之外的抗炎抗氧化等作用。烟酸可下调动脉粥样硬化斑块单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等的表达,因 IL-1、TNF- α 、MCP-1 等细胞因子能诱导 OPN 表达,故 OPN 表达减少。(3) 烟酸具有抗氧化作用。研究表明氧化应激可以上调 OPN 蛋白的表达^[7],烟酸可能通过抗氧化作用抑制了骨桥蛋白的表达。(4) 改善了动脉血管内皮功能。研究表明烟酸可以改善血管内皮功能,升高一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平,降低内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 水平^[8],而 NO 和 ET-1 分别可抑制和促进平滑肌细胞中 OPN 的表达。(5) 烟酸可上调过氧化物增殖体激活型受体 α (proxisome proliferator activated receptor- α , PPAR- α) 和肝 X 受体 α (liver X receptor- α , LXR- α) 等的表达^[9],而 PPAR- α 配体和 LXR- α 合成激动剂已被证明可抑制细胞因子诱导的巨噬细胞 OPN 的表达^[10,11]。

总之,本研究证实烟酸具有全面的调脂作用,并能延缓动脉粥样硬化斑块形成。烟酸具有下调 OPN mRNA 和蛋白表达的作用,这可能是烟酸抗动脉粥样硬化的机制之一。但烟酸下调 OPN 表达的机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Silverman MG, Blaha MJ, Blumenthal RS. Adjunctive lipid lowering therapy in the era of surrogate endpoints [J]. *Cardiol Rev*, 2011, 19(1): 17-22.
- [2] Farmer JA. Nicotinic acid; a new look at an old drug [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2009, 11(2): 87-92.
- [3] Witkiewicz W, Czyzewska-Buczynska A, Balasz S, et al. The role of osteopontin in cardiovascular diseases [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2010, 29(170): 79-83.
- [4] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2 637-645.
- [5] Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes [J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(3-4): 311-322.
- [6] 邱志兵, 万松. 骨桥蛋白与血管再狭窄的关系 [J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 36(5): 3.
- [7] Maziere C, Gomila C, Maziere JC. Oxidized low-density lipoprotein increases osteopontin expression by generation of oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(10): 1 382-387.
- [8] 陈瑶, 汪翼, 李倩, 等. 烟酸改善实验性肥胖大鼠血脂及血管内皮功能障碍的研究 [C]//中华医学会儿科学分会. 中华医学会第五次全国儿科中青年学术交流大会论文集. 济南: 中华医学分会儿科学分会, 2008; 64-67.
- [9] Wu ZH, Zhao SP. Niacin promotes cholesterol efflux through stimulation of the PPAR gamma-LXR alpha-ABCA1 pathway in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Pharmacology*, 2009, 84(5): 282-287.
- [10] Nakamachi T, Nomiya T, Gizard F, et al. PPAR alpha agonists suppress osteopontin expression in macrophages and decrease plasma levels in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2007, 56(6): 1 662-670.
- [11] Ogawa D, Stone JF, Takata Y, et al. Liver X receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways [J]. *Circ Res*, 2005, 96(7): e59-67.

(此文编辑 曾学清)