

冠心舒通胶囊对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块内 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响

霍煜, 梁卓, 韩雅玲, 姚天明

(沈阳军区总医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110016)

[关键词] 冠心舒通胶囊; 动脉粥样硬化; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1; 基质金属蛋白酶 9

[摘要] 目的 观察中成药冠心舒通胶囊对高脂饮食喂养 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化斑块病理变化、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)表达的影响,探讨冠心舒通胶囊对粥样斑块稳定性的影响以及对相关机制进行初步研究。方法 将 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 30 只给予高脂喂养,12 周时随机分为:模型组、冠心舒通胶囊高剂量[1.8 g/(kg·天)]组和冠心舒通胶囊低剂量[0.6 g/(kg·天)]组,喂养 12 周后处死,取主动脉中段,大体标本油红 O 染色观察斑块面积,冰冻切片后 HE 染色观察斑块厚度,冰冻切片免疫荧光法检测斑块内 TIMP-1、MMP-9 表达情况。结果 与模型组相比,冠心舒通胶囊组平均斑块浸润面积减小($P < 0.05$),弥漫程度减轻,斑块厚度降低,MMP-9 表达减少,而且冠心舒通胶囊高剂量组与低剂量组相比,各项统计指标亦有统计学意义($P < 0.05$),TIMP-1 表达未见明显变化。结论 冠心舒通胶囊可以对抗 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化斑块的形成和进展,以及通过降低斑块内 MMP-9 表达,从而抑制胶原纤维分解,稳定易损粥样斑块。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Guanxinshutong Capsule on the Expression of Matrix Metalloproteinases-9 and Tissue Matrix Metalloproteinase Inhibitor-1 of Atherosclerotic Plaque in ApoE^{-/-} Mice

HUO Yu, LIANG Zhuo, HAN Ya-Ling, and YAO Tian-Ming

(Department of Cardiology, Shenyang Military General Hospital, Shenyang, Liaoning 110016, China)

[KEY WORDS] Guanxinshutong Capsule; Atherosclerosis; Tissue Matrix Metalloproteinase Inhibitor-1; Matrix Metalloproteinases-9

[ABSTRACT] **Aim** To approach the possible mechanism of Guanxinshutong capsule on the progression and stability of atherosclerotic plaque through observing the effects of Guanxinshutong capsule on pathologic morphology and expression of tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice model with experimental atherosclerosis. **Methods** The animals were fed with high fat diet. They were randomly divided into 3 groups when they were 20 weeks old (10 mice in every group). They were high fat diet fed group (HF), high fat diet and high-dose Guanxinshutong capsule [1.8 g/(kg·d)] group (HH), high fat diet and low-dose Guanxinshutong capsule [0.6 g/(kg·d)] group (HL). All the animals were fed for 12 weeks. After administered for 12 weeks, mice were sacrificed. The area and thickness of atherosclerotic plaque were observed by the methods of oil red O and HE stain. The expressions of TIMP-1, MMP-9 in the plaque were detected by immune fluorescence staining method. **Results** Compared with HF group, the changes of the area and thickness of atherosclerotic plaque in HH group and HL group were obvious ($P < 0.05$). The expression of TIMP-1 didn't have significant differences between groups ($P > 0.05$) and MMP-9 in treatment groups were lower than those of model group ($P < 0.05$). Moreover, Significant differences were also observed between treatment groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Guanxinshutong capsule can

[收稿日期] 2013-12-25

[基金项目] 步长集团科研课题

[作者简介] 霍煜, 硕士, 医师, 主要从事缺血性心脏病血运重建方面的研究, E-mail 为 huoyu0112@163.com。梁卓, 硕士, 医师, 主要从事缺血性心脏病血运重建方面的研究。韩雅玲, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病预防及基础研究。通讯作者姚天明, 博士, 主治医师, 主要从事心血管疾病预防及基础研究, E-mail 为 yaotianming2003@sina.com。

inhibit the formation and progression of atherosclerotic plaque and stabilize the unstable plaque through down-regulating the MMP-9 expression in atherosclerotic plaque, inhibiting the collagen decomposition.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性、系统性的炎症反应病变,其导致的冠心病、脑卒中等已成为导致当今人类死亡的重要原因之一^[1]。目前对于 As 斑块的防治研究,不仅是如何阻止粥样斑块的形成和进展,而且,如何稳定粥样斑块,防止脱落后堵塞血管也是一个研究热点,对改善疾病预后具有重要意义。粥样斑块内的胶原含量对于稳定斑块至关重要。斑块内巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP),是一类对细胞外基质具有降解活性的蛋白酶超家族,其中 MMP-9 主要降解细胞外Ⅳ型胶原和弹力纤维,使得炎性细胞可以通过基底膜,与 As 斑块稳定性尤为相关^[2,3]。冠心舒通胶囊是步长集团研制用于治疗冠心病心绞痛的中成药,本实验观察冠心舒通胶囊灌服 ApoE^{-/-}小鼠主动脉 As 斑块进展情况,以及对 As 斑块稳定性的影响,为临床应用冠心舒通胶囊治疗 As 病变提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

冠心舒通胶囊由陕西步长制药有限公司提供(批准文号:国药准字 Z20020055,规格 0.3 g/粒)。MMP-9、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1(tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-1)抗体由北京中杉金桥提供。

1.2 动物及分组

8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠,30 只,雄性,体重 20.0 ± 2.6 g,由北京大学医学部动物实验中心提供。高脂喂养 12 周后,随机平均分为 3 组:模型组、冠心舒通胶囊高剂量[1.8 g/(kg · d)]组和冠心舒通胶囊低剂量[0.6 g/(kg · d)]组,模型组每天给予等量生理盐水灌胃,高脂饲料配方为:15 % 脂肪,0.25 % 胆固醇,84.75 % 基础饲料。喂养 12 周。

1.3 处理方法

各组动物喂养 12 周后,颈椎脱臼法处死,自主动脉根部至腹主动脉离断主动脉,取胸主动脉段做纵剖面油红 O 染色,取膈肌处主动脉,4%多聚甲醛固定半小时,7.5%蔗糖脱水过夜后,OCT 包埋,连续冰冻切片,单张厚度为 6 μm,分别行 HE 染色, TIMP-1、MMP-9 免疫荧光染色。

1.4 油红 O 染色

取主动脉中段大约 1 cm,纵向剪开,适当 PBS 冲洗后,浸入 60% 异丙醇中清洗数秒,然后浸入油红工作液约 20 min 后,60% 异丙醇清洗多余染液,蒸馏水洗 30 s,甘油明胶封片,观察动脉壁粥样斑块分布,应用 Image J 软件计算斑块面积。

1.5 免疫荧光染色

冰冻切片入 PBS 中湿润 10 min;3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,PBS 洗 3 min × 3 次;滴加 10% 正常马血清封闭液,室温孵育 20 min,甩干;滴加兔抗小鼠 MMP-9 或 TIMP-1 多克隆抗体,4℃ 过夜。复温后 PBS 洗涤 3 min × 3 次;滴加 HRP 标记的羊抗兔 IgG,室温 30 min。PBS 洗涤 3 min × 3 次;DAPI 染色,蒸馏水洗,甘油封片。后荧光显微镜观察标本,高倍镜下,每组随机选取 5 张片子拍照,用 Image Proplus 6.0 软件分析,计算每张图片阳性染色区域的积分光密度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料的比较采用方差分析,组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 病理形态学观察

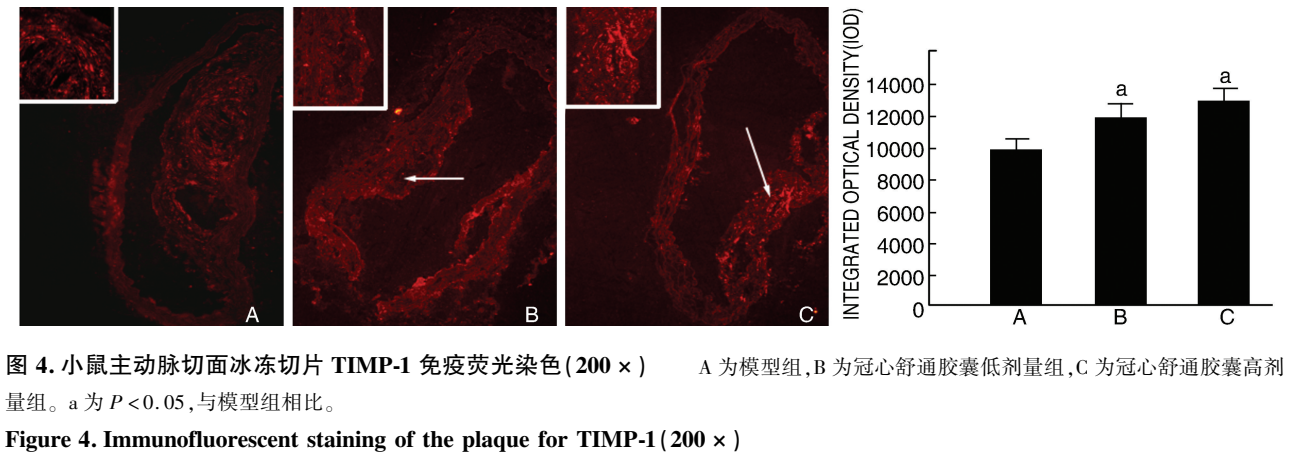
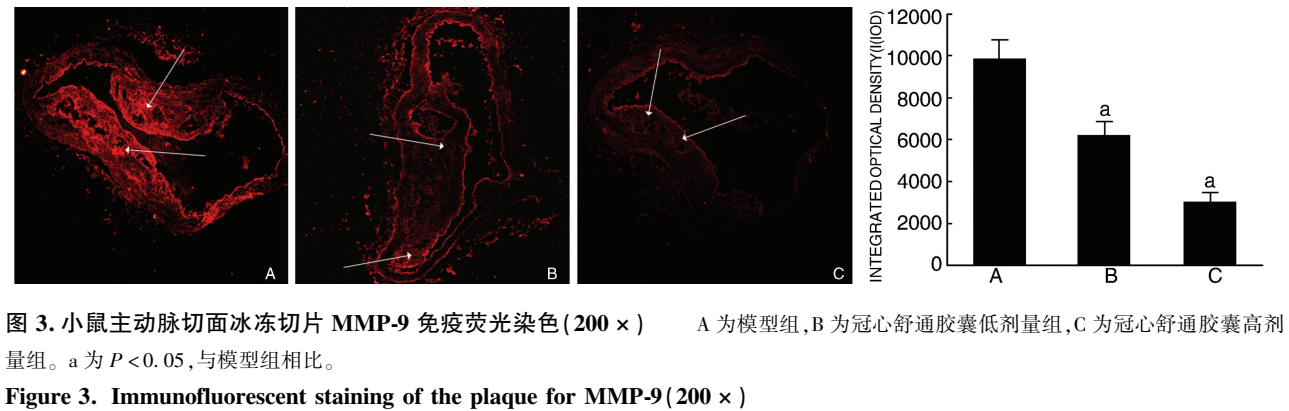
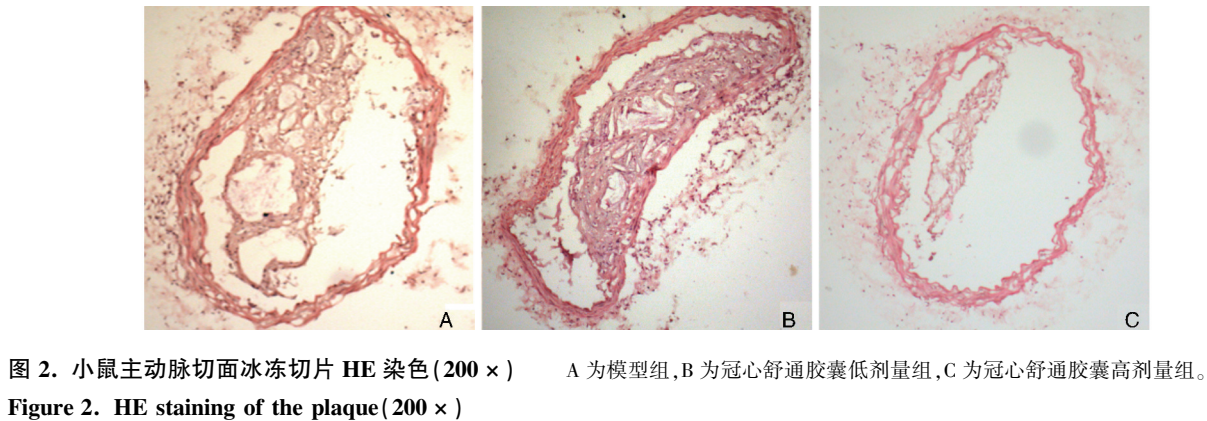
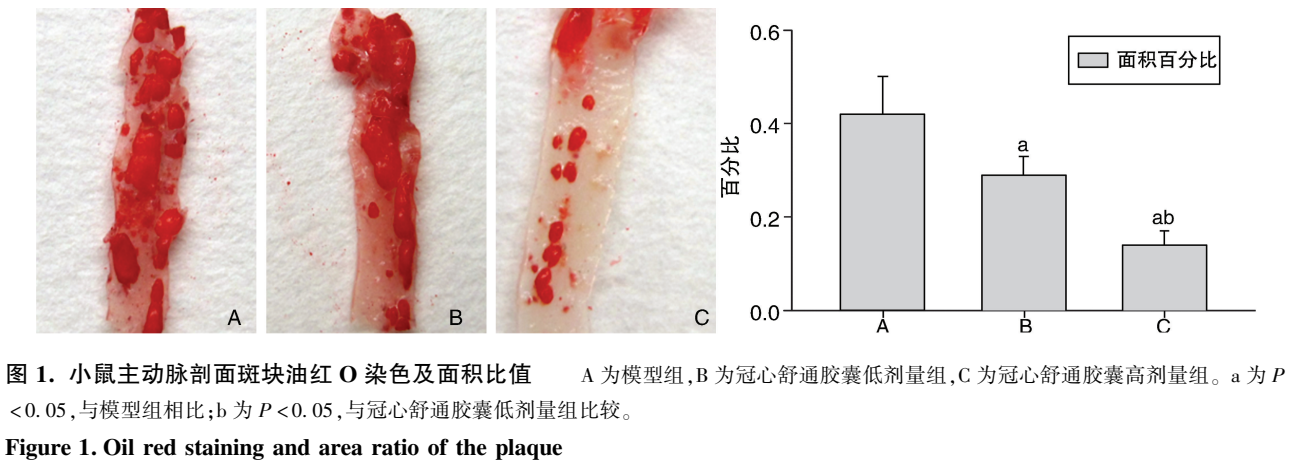
冠心舒通胶囊干预 ApoE^{-/-}小鼠后,主动脉粥样硬化斑块面积与所取血管面积比值降低($P < 0.05$),弥漫程度减轻,且高剂量组效果优于低剂量组(图 1)。

2.2 血管切面 HE 染色

与模型组相比,冠心舒通胶囊组斑块厚度有所降低,斑块内脂肪空泡减少,结构相对致密,主动脉搏腔有所扩大,且高剂量组效果优于低剂量组(图 2)。

2.3 血管切面免疫荧光染色

在冠心舒通胶囊高、低剂量组斑块中,MMP-9 蛋白表达均低于模型组,其中冠心舒通胶囊高剂量组 MMP-9 表达低于低剂量组($P < 0.05$;图 3)。TIMP-1 在各组 As 斑块中均有不同程度的荧光显示,冠心舒通胶囊高剂量组荧光强度较强,但与其它两组相比,差异无统计学意义(图 4)。



3 讨论

目前在心脑血管疾病的防治中,As 病变的防治属于研究热点,一方面是研究如何阻止 As 斑块的形成和进展,另一方面则是如何稳定已形成的 As 斑块^[4]。研究表明,稳定的斑块对生命并不构成威胁。当动脉内壁 As 斑块由稳定状态转变为不稳定状态,继而脱落直接堵塞血管,或者斑块内富含的胶原、组织因子、凝血因子、ADP、血栓素 A₂ 等与血液接触使血细胞凝集形成血栓,血管收缩,是导致脑卒中和急性冠状动脉综合征的主要发病机制^[5]。所以,对 As 易损斑块的干预对预防急性心脑血管事件有积极意义。

MMP 是一组能降解细胞外基质成分的 Zn²⁺ 依赖性蛋白酶家族,参与降解全身各种组织的细胞外基质。研究证实 MMP 在机体各种组织的发育和修复、肿瘤发生发展、炎症反应等过程中起着重要作用。在 As 病变中主要由斑块中的巨噬细胞和血管平滑肌细胞等合成与分泌。其中 MMP-9 是 As 斑块内巨噬细胞分泌的主要基质金属蛋白酶,可以降解变性的胶原和弹性蛋白,使 As 斑块纤维帽崩解,有利于平滑肌细胞迁移至内膜使内膜增厚。其表达增加、活性增强可使斑块稳定性降低,导致斑块破裂。Alvarez 等^[6-8] 人的研究提示 MMP-9 在斑块内的高表达是造成斑块不稳定的主要因素。本实验选取其作为检测指标。As 斑块内同时表达 TIMP,拮抗着 MMP 的活性^[9],在斑块稳定期,巨噬细胞和血管平滑肌细胞分泌 MMP 增多,损伤血管内皮,分解细胞外胶原等基质,同时由于机体的代偿作用,巨噬细胞等表达 TIMP 亦增加,使细胞外基质的降解减弱。随着 As 斑块发展,MMP 表达持续增高,而 TIMP 的表达进入失代偿,两者之间的比例失调,As 斑块内胶原分解失控,最终使斑块变得不稳定。

As 病变在中医理论上属于“痰淤”、“血瘀”范畴,痰浊是人体津液不归的产物^[10]。瘀血是由于人体血运不畅。这种状态持续发展,痰借血体,血借痰凝,着于血脉,日久胶结不解,愈凝愈坚,形成结块便是 As 斑块。近年来,中医药在 As 的防治领域取得了长足的进步^[11]。冠心舒通胶囊是陕西咸阳步长制药有限公司研制的治疗冠心病心绞痛的中成药,其主要成分为广枣、丹参、丁香、冰片、天竺黄等,该药具有活血化瘀、通经活络、行气止痛的作用^[12-16]。

本研究结果显示,与模型组相比,冠心舒通胶囊组主动脉斑块面积明显减小 ($P < 0.05$),MMP-9 表达受到抑制 ($P < 0.05$),而且高剂量组与低剂量

组相比亦有统计学差异,但是 TIMP-1 三组相比未得出统计学差异。

可以看出,冠心舒通胶囊可抑制 ApoE^{-/-} 小鼠 As 的形成和进展,其机制可能是通过减弱 As 斑块中 MMP-9 的表达对稳定粥样斑块发挥积极作用,为临床应用冠心舒通胶囊抗 As 作为借鉴,而其在对稳定 As 斑块的其他机制,以及影响 TIMP 与 MMP-9 的相互作用方面有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1 410-422.

[2] Martinez-Lemus LA, Galinanes EL. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling [J]. Drug Discov Today Dis Models, 2011, 8(1): 21-28.

[3] Krizkova S, Zitka O, Masarik M, et al. Clinical importance of matrix metalloproteinases [J]. Bratisl Lek Listy, 2011, 112(8): 435-440.

[4] Chyu K Y, Shah P K. Emerging therapies for atherosclerosis prevention and management [J]. Cardiol Clin, 2011, 29(1): 123-135.

[5] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008; 267-272.

[6] Blankenberg S, Rupprecht H J, Poirier O, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease [J]. Circulation, 2003, 107(12): 1 579-585.

[7] Alvarez B, Ruiz C, Chacon P, et al. Serum values of metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 as related to unstable plaque and inflammatory cells in patients with greater than 70% carotid artery stenosis [J]. J Vasc Surg, 2004, 40(3): 469-475.

[8] Liang J, Liu E, Yu Y, et al. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits [J]. Circulation, 2006, 113(16): 1 993-2 001.

[9] Ishiguro N, Ito T, Oguchi T, et al. Relationships of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover and inflammation as revealed by analyses of synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2001, 44(11): 2 503-511.

[10] 张 微, 黄小民. 动脉粥样硬化的中医辨证论治 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(2): 216-218.

[11] 宋剑男. 中医药在动脉硬化性疾病防治研究中的比较优势及思考 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 193-196.

[12] 白 勇, 爱民, 谢 军, 等. 广枣总黄酮的研究概况 [J]. 内蒙古医学院学报, 2005, 27(5): 135-137.

[13] 窦 昊, 李 薇. 丹参药理作用的研究 [J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(1): 197.

[14] 宋光西, 马玲云, 魏 锋, 等. 丁香属植物的化学成分分类及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(5): 179-181.

[15] 魏楚蓉, 伍赶球. 冰片的药理作用及其机制研究进展 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(4): 447-451.

[16] 姚天明, 梁 卓, 霍 煜, 等. 冠心舒通胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 243-245.

(此文编辑 许雪梅)