

间歇性低压低氧促进载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血管重构

蒋四华, 靳飞鹏, 马双陶, 杨永健

(中国人民解放军成都军区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 间歇性低压低氧; 血管重构; 基质金属蛋白酶

[摘要] **目的** 探讨高海拔间歇性低压低氧(IHH)环境对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠血管重构的影响。**方法** 将 14 只 8 周龄雌性 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为对照组和 IHH 组, IHH 组每天在低压舱模拟的 4000 m 海拔低压低氧环境中放置 8 h, 持续 60 天。干预完成后采用 Masson 染色测定胸主动脉管壁胶原含量, 采用免疫组织化学法检测基质金属蛋白酶(MMP)及其组织型基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)的表达情况。**结果** 与对照组比较, 间歇性低压低氧组小鼠主动脉管壁胶原含量显著降低, MMP-9 的表达显著增高, 而 TIMP-2 的表达显著降低($P < 0.01$), 而 MMP-2、MMP-14 在两组间没有显著差异($P > 0.05$)。**结论** IHH 可能通过加重 ApoE^{-/-} 小鼠血管壁 MMP-9 和 TIMP-2 的表达失衡减少血管壁胶原含量, 从而促进血管重构。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Intermittent Hypobaric Hypoxia Promotes Vascular Remodeling in Apolipoprotein E Gene Knockout Mice

JIANG Si-Hua, JIN Fei-Peng, MA Shuang-Tao, and YANG Yong-Jian

(Department of Cardiovascular, People's Liberation Army General Hospital of Chengdu Military Area Command, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[KEY WORDS] Intermittent Hypobaric Hypoxia; Vascular Remodeling; Matrix Metalloproteinase

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of intermittent hypobaric hypoxia (IHH) on vascular remodeling in apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** 14 female ApoE^{-/-} mice were randomly divided into control group and IHH group at 8 weeks of age. IHH group was put into a low pressure chamber simulating the hypobaric hypoxia environment of 4000 m altitude for 8 hours per day, lasting 60 days. At the end of the intervention, the collagen content and expressions of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) in aortic tissue were measured. **Results** The collagen content of aortic wall in IHH group was significantly decreased ($P < 0.01$), expression level of MMP-9 was significantly elevated and TIMP-2 was significantly reduced compared with control group ($P < 0.01$), but MMP-2, MMP-14 had no significant difference among the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** IHH might decrease the collagen content of aortic wall and promote vascular remodeling through increasing the expressional imbalance of MMP-9 and TIMP-2.

人类在高海拔地区的活动日益频繁^[1,2]。严酷的高原环境对身体机能提出了更高要求, 容易导致猝死发生^[3]。然而高海拔环境引起猝死的机制目前并不清楚。从海平面到高海拔地区时的环境变化包括大气压力、氧分压、湿度和温度降低^[4], 而气压与氧分压的降低是高原环境的突出特点。基质

金属蛋白酶(metalloproteinase, MMP)及其组织型基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP)是与血管重构相关的主要酶类之一^[5]。MMP-9 是降解主动脉壁中弹性蛋白和胶原蛋白的主要酶^[6]。MMP-9 降解这些细胞外基质会引起腹主动脉异常扩张, 导致腹主动脉瘤形成, 而

[收稿日期] 2013-06-06

[基金项目] 成都军区总医院院管课题(2011YG-B32;2011YG-B22)

[作者简介] 蒋四华, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 jsh00002011@126.com。靳飞鹏, 硕士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者杨永健, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心力衰竭与心肌重构, E-mail 为 yangyongjian38@yahoo.com。

后者是一个渐进的退化性疾病,可能导致主动脉破裂而引起死亡^[5]。

研究发现,阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea, OSA)患者的间歇性常压缺氧可通过多种途径调节斑块细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分解代谢相关酶类,引起血管重构等多种病理过程^[7]。然而,高原的低压低氧环境与模拟阻塞性睡眠呼吸暂停间歇性缺氧环境大不相同,其在血管重构过程中的作用仍待阐明。本研究旨在观察高原低压低氧环境对动脉粥样硬化血管重构的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4只载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-})小鼠,雄性,8周龄,购于南京大学模式动物研究中心。动物被安置于成都医学院 SPF 实验动物中心,采用标准的昼夜循环(12 h/12 h)、温度(22 ± 1℃)、湿度(50% ~ 60%)的饲养条件,自由采食食物和水,喂正常饲料。实验过程由医院动物管理和使用委员会批准。

1.2 主要实验试剂

戊巴比妥钠购于上海索莱宝生物科技有限公司;兔抗小鼠 MMP 抗体、兔抗小鼠 TIMP 抗体、SABC 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;快速 Masson 染色液购于南京建成科技有限公司。

1.3 分组及干预

14只 ApoE^{-/-}小鼠采用随机数字表法分配到对照组和间歇性低压低氧(intermittent hypobaric hypoxia, IHH)组。对照组放置于低压舱旁的平台上,不作特殊处理;IHH 组放入低压舱内,关闭舱门后开机,设定模拟高度 4000 m,启动 2 min 内达到目标气压值并维持 8 h,结束时再于 2 min 内恢复到常压,关机并取出小鼠,小鼠休息 16 h 后再次重复低压低氧干预。实验共干预 8 周,每天 8 h。

1.4 免疫组织化学检测血管壁 MMP-2、MMP-9、MMP-14 及 TIMP-2 的表达

干预完成后处死小鼠,取胸主动脉 1 mm,经多聚甲醛固定、脱水、包埋程序后,5 μm 切片。烤片 120 min 后脱蜡至水,热抗原修复后 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min,蒸馏水冲洗 2 min。滴加 5% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,不洗。滴加相应蛋白的兔抗小鼠一

抗工作液(稀释比例 1:50),4℃ 冰箱过夜,PBS 冲洗 5 min × 3 次。滴加适量生物素标记的山羊抗兔二抗工作液,37℃ 孵育 20 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次。滴加适量链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)工作液,37℃ 孵育 20 min,PBS 冲洗 5 min × 3 次。滴加适量 DAB 显色剂室温显色 3 ~ 15 min,镜下控制反应时间。自来水充分冲洗后以苏木素轻度复染,自来水冲洗。最后脱水,透明,封片。

1.5 Masson 染色

使用快速 Masson 染色液试剂盒对血管壁胶原进行染色,按试剂盒说明书操作:①R1 核染液染色 60 s,倒丢,R5 冲洗液冲洗 30 s;②R2 浆染液染色 30 s,倒丢,R5 冲洗液冲洗 30 s;③R3 分色液分色 6 min,镜下观察样本中胶原纤维部分退成淡粉红色时弃去分色液,不冲洗;④R4 蓝色复染液染色 5 min,倒丢,用无水乙醇冲洗干净;⑤吹干后以中性树脂胶封片。

1.6 图像采集和分析

所得染色标本在 Olympus BX41 显微镜下观察并采集图像。图像分析采用 Image Proplus 6.0 研究软件进行,分别测定阳性染色面积和血管壁面积,以阳性染色面积/血管壁面积表示胶原含量。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IHH 对 ApoE^{-/-} 小鼠胸主动脉胶原含量的影响

IHH 组小鼠胸主动脉胶原含量显著低于对照组($P < 0.01$;图 1)。

2.2 IHH 对 ApoE^{-/-} 小鼠胸主动脉 MMP 和 TIMP 表达的影响

MMP-2、MMP-14 在两组间没有显著差异($P > 0.05$),而 IHH 组 MMP-9 显著高于对照组,TIMP-2 显著低于对照组($P < 0.01$;图 2)。

3 讨论

对移居者的研究表明,环境的变化可能会极大地改变遗传稳定的人口患心血管疾病的风险^[1]。而高原环境对人体的影响越来越受到重视。据报道,日益普及的活动如徒步旅行、登山和滑雪板运动

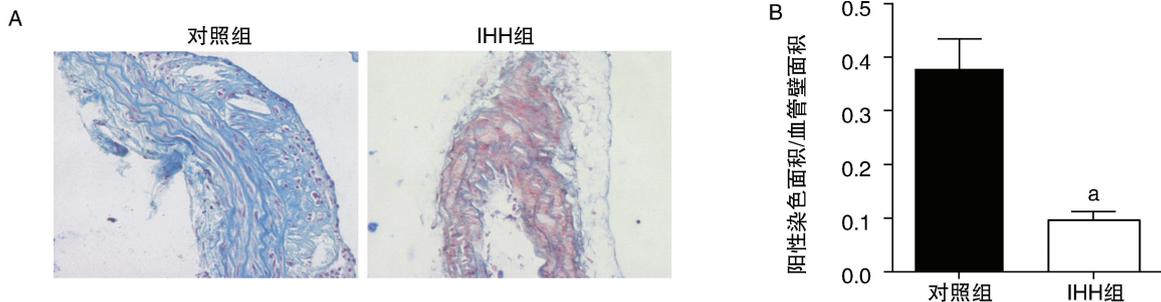


图 1. IHH 对 ApoE^{-/-} 小鼠胸主动脉胶原含量的影响 (n = 7) A 为小鼠胸主动脉 Masson 染色 (×200); B 为胶原含量定量分析。a 为 P < 0.01, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of IHH on collagen content of the thoracic aorta in ApoE^{-/-} mice

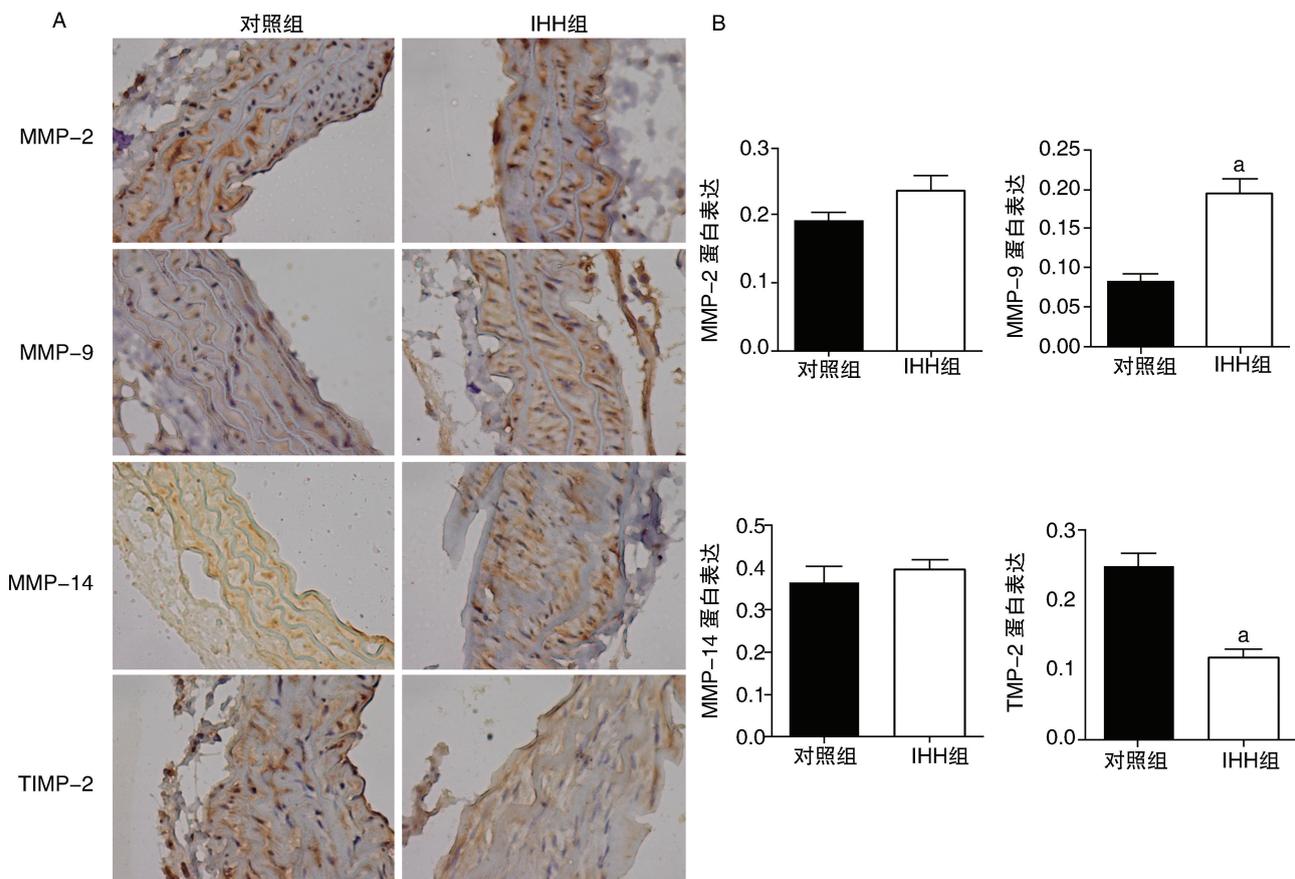


图 2. IHH 对 ApoE^{-/-} 小鼠胸主动脉 MMP-2、MMP-9、MMP-14 和 TIMP-2 表达的影响 (n = 7) A 为胸主动脉 MMP-2、MMP-9、MMP-14 和 TIMP-1 免疫组织化学染色照片 (×400); B 为蛋白表达水平, 以阳性染色面积占血管壁面积比表示。a 为 P < 0.01, 与对照组比较。

Figure 2. Effects of IHH on MMP-2, MMP-9, MMP-14 and TIMP-2 expressions in aorta of ApoE^{-/-} mice

等,使得高海拔地区的游客数量持续增加。由于这些地区巨大的身体机能需求^[8],这些活动也与相对较高的死亡风险相关^[9]。在高海拔地区最常见的死亡原因是外伤、高原病、寒冷损伤、雪崩掩埋和心源性猝死^[8]。其中心源性猝死被认为与冠状动脉疾病有着紧密联系,可能机制是需氧量增加,肾上腺素能活性增加,心率、血压和血流动力学突然变化,脆弱的动脉粥样硬化斑块破裂,从而增加血小

板活化和血栓形成^[9]。具有动脉粥样硬化病变基础的人群到高海拔地区活动可能存在很高的潜在死亡风险。

动脉粥样硬化是进展性动脉疾病^[10],其进展是由局部斑块生长和血管壁重构反应的性质决定的^[11]。在动脉粥样硬化血管重构中,ECM 的降解贯穿于动脉粥样硬化血管重构发生发展的整个过程^[12]。根据国外文献报道,ApoE^{-/-}小鼠在第 8 周

龄时即出现泡沫细胞病灶(病理表现为脂纹),15周龄时出现晚期病灶(纤维斑块)^[13],因此第8至第15周可能是动脉粥样硬化发生发展的关键时期。本实验选择8周龄 ApoE^{-/-}小鼠,并使用低压实验舱模拟4000 m高原低压低氧环境,来研究后者对动脉粥样硬化血管重构的影响。我们发现IHH干预8周的 ApoE^{-/-}小鼠其血管壁胶原含量显著减少,而胶原是ECM的主要成分之一^[14],这提示高原的IHH环境可能有促进血管重构的作用,并最终促进动脉粥样硬化的进展。

MMP在ECM的降解中发挥着重要作用,MMP可以降解ECM成分,为血管平滑肌细胞越过中膜向内膜迁移扫清障碍^[14]。TIMP是MMP的内源性抑制剂,可抑制MMP的活性。这些蛋白水解酶与心血管疾病的发生和进展相关^[15]。在正常的生理条件下,MMP的活性受到转录水平和前体酶原激活情况的调节,并与特定的ECM成分相互作用。内源性TIMP提供了一个平衡的机制,以防止ECM过度降解。MMP和TIMP之间的不平衡可能会导致大量的MMP活性增加,并可能导致与血管疾病有关的病理变化^[5]。其中MMP-9降解ECM,会引起腹主动脉异常扩张,导致腹主动脉瘤形成,最终可能导致主动脉破裂而引起死亡^[5]。

鉴于动脉平滑肌的主要间质成分为I、III型胶原、弹力纤维、硫酸软骨素、硫酸皮肤素以及其他蛋白多糖^[14],我们选择了均能分解I、III型胶原的三种MMP,即MMP-2、MMP-9、MMP-14,及其内源性抑制剂TIMP-2为检测指标,来研究IHH对血管壁ECM影响的分子机制。我们发现相比于对照组,IHH组MMP-9在主动脉管壁的蛋白表达量显著升高,而对MMP-2有抑制作用的TIMP-2显著减少,MMP-2、MMP-14在两组间无明显差异。我们的结果与以往的研究^[14]提示MMP-9在血管重构中起主要作用。而TIMP-2在IHH组显著减少提示IHH既可能通过增加MMP-9的表达促进ECM分解和血管重构,也可能通过减少MMP的内源性抑制剂TIMP-2促进上述病理过程。

总之,我们的研究发现IHH可能通过使有动脉粥样硬化基础的血管MMP-9表达增加,同时使TIMP-2表达减少而促进血管重构。然而MMP、TIMP家族还有多种分子,血管重构也还有其它多种机制的参与,IHH对血管重构的影响仍有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] O'Toole TE, Conklin DJ, Bhatnagar A. Environmental risk factors for heart disease [J]. *Rev Environ Health*, 2008, 23 (3): 167-202.
- [2] Wu TY, Ding SQ, Zhang SL, et al. Altitude illness in Qinghai-Tibet railroad passengers [J]. *High Alt Med Biol*, 2010, 11 (3): 189-198.
- [3] Rimoldi SF, Sartori C, Seiler C, et al. High-altitude exposure in patients with cardiovascular disease: risk assessment and practical recommendations [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52 (6): 512-524.
- [4] Higgins JP, Tuttle T, Higgins JA. Altitude and the heart: is going high safe for your cardiac patient [J]. *Am Heart J*, 2010, 159 (1): 25-32.
- [5] Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75 (2): 346-359.
- [6] 万招飞, 张娇, 薛嘉虹, 等. 冠心病患者动脉弹性与血清高敏C反应蛋白和基质金属蛋白酶9的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (11): 1 003-006.
- [7] Libby P, Folco E. Tension in the plaque: hypoxia modulates metabolism in atheroma [J]. *Circ Res*, 2011, 109 (10): 1 100-102.
- [8] Windsor JS, Firth PG, Grocott MP, et al. Mountain mortality: a review of deaths that occur during recreational activities in the mountains [J]. *Postgrad Med J*, 2009, 85 (1004): 316-321.
- [9] Burtcher M, Ponchia A. The risk of cardiovascular events during leisure time activities at altitude [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52 (6): 507-511.
- [10] Jun J, Reinke C, Bedja D, et al. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209 (2): 381-386.
- [11] Papafaklis MI, Koskinas KC, Chatzizisis YS, et al. In-vivo assessment of the natural history of coronary atherosclerosis: vascular remodeling and endothelial shear stress determine the complexity of atherosclerotic disease progression [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2010, 25 (6): 627-638.
- [12] 汤凤池, 陈德兴. 三七、绞股蓝对实验性动脉粥样硬化家兔血管重构的影响 [J]. *中医药信息*, 2011, 28 (1): 14-18.
- [13] Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, et al. Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (1): 70-79.
- [14] 胡志华, 吴柱国. 基质金属蛋白酶与心血管系统疾病 [J]. *广东医学院学报*, 2007, 25 (5): 584-589.
- [15] Sesso R, Franco MC. Abnormalities in metalloproteinase pathways and IGF-I axis: a link between birth weight, hypertension, and vascular damage in childhood [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23 (1): 6-11.

(此文编辑 文玉珊)