

烟酸对实验性动脉粥样硬化兔主动脉 斑块形成和 MK2 表达的影响

徐戈, 雷敏, 曾知恒, 李志乐

(广西医科大学附属第一医院心内科, 广西南宁市 530021)

[关键词] 烟酸; 动脉粥样硬化; 丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶 2

[摘要] 目的 探讨烟酸对动脉粥样硬化斑块形成及动脉壁 MK2 mRNA 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 ($n=8$) 和烟酸组 ($n=8$), 高脂血症组继续饲以高脂饲料 6 周, 烟酸组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, 采用实时定量 PCR 检测各组兔主动脉壁 MK2 mRNA 的表达。结果 与正常对照组相比, 高脂血症组总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平明显升高, 主动脉内膜厚度和斑块面积显著增加, MK2 mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$)。与高脂血症组相比, 烟酸组总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平显著降低, 高密度脂蛋白胆固醇水平升高, 主动脉内膜厚度和斑块面积显著减少, MK2 mRNA 表达也显著减少 (P 均 <0.01)。MK2 mRNA 表达量与动脉粥样硬化斑块面积 ($r=0.919, P<0.01$) 和内膜厚度 ($r=0.863, P<0.01$) 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 MK2 mRNA 水平有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Niacin on Plaques Formation and Expression of MK2 mRNA in Aorta of Experimental Atherosclerosis Rabbit

XU Ge, LEI Min, ZENG Zhiheng and LI Zhile

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Niacin; Atherosclerosis; MAP Kinase-Activated Protein Kinase 2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of niacin on the atherosclerotic plaques formation and MK2 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: hyperlipidemia group ($n=8$) which maintained high-fat diet for 6 weeks; niacin treatment group ($n=8$) which maintained high-fat diet supplemented with niacin ($200\text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) for 6 weeks. Control rabbits ($n=8$) were fed with normal diet for 14 weeks. At the end of the study, all rabbits were sacrificed to detect the histopathological changes and MK2 mRNA expression of the aortas. **Results** Rabbits fed with high-fat diet showed higher serum levels of total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol (LDLC), more aorta endometrial thickness, plaque area and MK2 mRNA expression (all $P<0.01$). Compared with hyperlipidemia group, rabbits treated with niacin showed less serum levels of total cholesterol and LDLC, less aorta endometrial thickness, plaque area and MK2 mRNA expression (all $P<0.01$). MK2 mRNA expression was positively correlated with atherosclerotic plaque area ($r=0.92, P<0.01$) and endometrial thickness ($r=0.863, P<0.01$). **Conclusion** Niacin's role of anti-atherosclerosis is not only due to its lipid-lowering effect, but also may be related to its MK2 mRNA-lowering effect.

随着动脉粥样硬化 (As) 炎症学说的提出, 炎症在 As 发生发展中的作用已引起人们极大的关注, 许多细胞炎症因子和调节炎症途径的信号分子均参与了 As 的炎症过程^[1]。丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶 2 (MAP kinase-activated protein kinase 2, MK2) 是炎症过程的一个关键调节信号分子, 具有稳

定富含 AU 元件的 mRNA、参与细胞迁移, 介导炎症因子产生等多种细胞炎症功能^[2-4]。国外最新研究表明, 活化的 MK2 (磷酸化 MK2) 在 As 斑块的内皮细胞及巨噬细胞中存在, 可通过促进血管壁巨噬细胞泡沫细胞形成和增加单核细胞/巨噬细胞招募的细胞因子来促进 As 的发展^[5], 是 As 性心血管疾病治疗的一个有吸引力的新靶点。烟酸早在 20 世纪 60 年代即作为调脂药物开始应用于临床, 最近研究发现这一“老药”具有明显的抗 As 作用, 能够显著降低冠心病的发病率和死亡率。烟酸抗 As 机制目前尚未完全明确, 除与其降胆固醇的多效性作用有

[收稿日期] 2010-09-13 [修回日期] 2010-10-28

[基金项目] 广西青年科学基金资助 (桂科青 0832049)

[作者简介] 徐戈, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病的诊治, Email 为 xuge@21cn.com。雷敏, 硕士, 研究方向为血脂与动脉粥样硬化机制。曾知恒, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的诊治。

关外,可能还与其抗炎、改善血管内皮功能等作用有关^[6]。本研究通过建立实验性兔 As 模型,观察 MK2 在 As 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 As 机制。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

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(亳州市红日实业有限公司),烟酸粉(北京嘉康源科技发展有限公司),Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fementas 公司),Real Master Mix 试剂盒(TIANGEN 公司),PCR 引物(上海闪晶分子生物科技有限公司),全自动生化分析仪(日立 7170 型),病理图像分析仪(DMR+ 550 德国),紫外分光光度计(PE LAMB DA BD 20 美国),荧光实时定量 PCR 仪(ABI7500 美国)。

1.2 动脉粥样硬化兔模型的建立及烟酸干预

24 只新西兰大白兔,清洁级,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% 蛋黄粉和 8% 猪油),喂养 8 周后再随机分为两组,每组 8 只:高脂血症组继续饲以高脂饲料 6 周,烟酸组在继续高脂饲料喂养的基础上予以烟酸 $[200 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 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。饲养期间高脂血症组死亡 1 只,烟酸组和正常对照组各死亡 2 只。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,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 血脂及体重测定

饲养前及饲养第 8 周和第 14 周末,称取动物体重,并经兔耳中央动脉取空腹血 2 mL,静置 30 min 后离心取血清,检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL)的浓度。

1.4 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 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。

1.5 荧光定量 PCR 法检测主动脉 MK2 mRNA 的表达

按 Trizol 说明书抽提兔动脉总 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。MK2 上游引物 5'-TCA AGA AAA ACG CCA TCA TCG-3',下游引物 5'-TTG GGG CAG TCC TGA AGC A-3',扩增目的片段长度 139 bp 内参照 β -actin 上游引物 5'-CGC AGA AAC GAG ACG AGA-3',下游引物 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-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,进行相对定量表达计算, $\text{MK2 相对 mRNA 表达量} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.6 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,相关统计采用 Pearson's 相关回归分析。

2 结果

2.1 烟酸对血脂和体重的影响

三组兔的体重在实验过程中组间无显著差异。高脂饮食 8 周时兔血清 TC、LDLC 和 TG 水平显著升高($P < 0.01$),烟酸组 14 周时 TC 和 LDLC 水平分别较其 8 周时下降 42.3%、48.9% ($P < 0.01$),TG 水平下降 17.4% ($P < 0.05$),HDL 水平升高 27.0% ($P < 0.01$),且与高脂血症组相比差异有统计学意义($P < 0.01$; 表 1)。

表 1 三组兔 0 周、8 周和 14 周时的血脂水平 (mmol/L)

指 标	正常对照组			高脂血症组			烟酸组		
	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周	0 周	8 周	14 周
TC	0.97 ± 0.26	1.04 ± 0.30	1.27 ± 0.36	1.07 ± 0.28	2.51 ± 0.57^a	2.84 ± 0.49^a	0.98 ± 0.15	2.57 ± 0.59^a	1.90 ± 0.43^b
TG	0.81 ± 0.1	0.86 ± 0.11	0.98 ± 0.5	0.72 ± 0.09	1.94 ± 0.59^a	2.39 ± 0.39^a	0.77 ± 0.10	1.78 ± 0.50^a	1.47 ± 0.43
HDL	1.72 ± 0.32	1.85 ± 0.39	1.80 ± 0.23	1.88 ± 0.37	2.23 ± 0.28	1.57 ± 0.37	1.96 ± 0.45	2.26 ± 0.47	2.87 ± 0.37^b
LDL	0.60 ± 0.33	0.73 ± 0.20	0.71 ± 0.24	0.79 ± 0.36	2.42 ± 0.27	3.03 ± 0.71	0.85 ± 0.32	2.79 ± 0.68	1.29 ± 0.64^b

a 为 $P < 0.01$ 与同组 0 周时比较; b 为 $P < 0.01$ 与高脂血症组同时期比较。

2 2 烟酸对动脉粥样硬化斑块的影响

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,中膜平滑肌细胞增殖,排列紊乱;烟酸组内膜病变较高脂血症组明显减轻(图 1和表 2)。

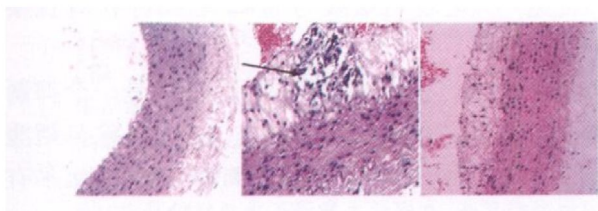


图 1 兔主动脉 HE 染色 ($\times 50$) 从左至右为正常对照组、高脂血症组、烟酸组。箭头所指为钙化。

表 2 各组主动脉内膜厚度和斑块面积 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	内膜厚度 (μm)	斑块面积
正常对照组	8.11 ± 3.86	0
高脂血症组	85.72 ± 13.42^a	$66.81\% \pm 16.47\%^a$
烟酸组	41.37 ± 15.69^b	$28.02\% \pm 8.83\%^b$

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与高脂血症组比较。

2 3 烟酸对主动脉 MK2 mRNA 的影响

各组 MK2 及内参照 β -actin 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(图 2)。高脂血症组 MK2 mRNA 的相对表达量为 19.46 ± 8.16 显著高于正常对照组的 1.08 ± 0.43 ($P < 0.01$), 烟酸组 MK2 mRNA 的相对表达量为 7.64 ± 4.10 较高脂血症组明显降低 ($P < 0.01$)。

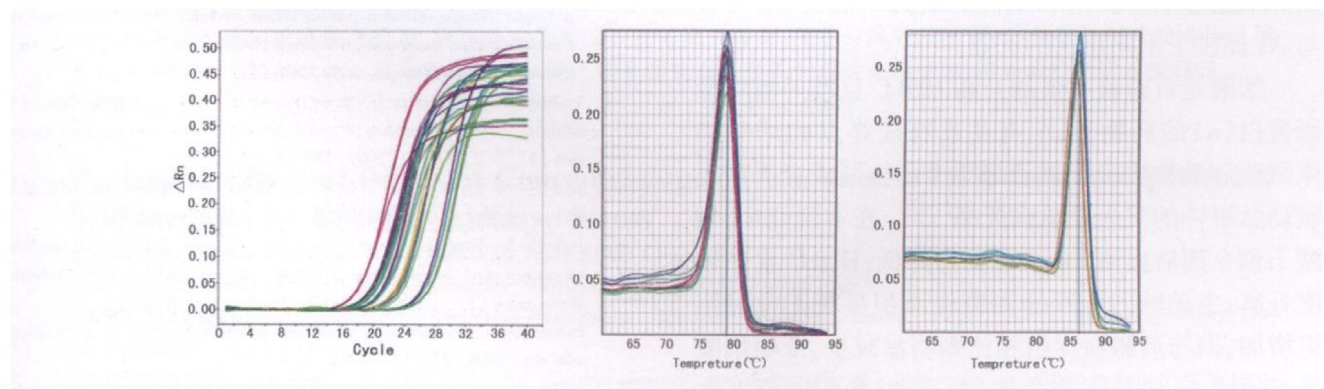


图 2 MK2 和内参照 β -actin 的扩增曲线及溶解曲线 左为 MK2 和内参照 β -actin 的扩增曲线, 中为 β -actin 的溶解曲线, 右为 MK2 的溶解曲线。

2 4 MK2 mRNA 表达量与斑块面积和主动脉内膜厚度的相关性

MK2 mRNA 表达量与 As 斑块面积呈正相关 (r

$= 0.919$, $P < 0.01$), 与动脉内膜厚度也呈正相关 (r

$= 0.863$, $P < 0.01$; 图 3)。

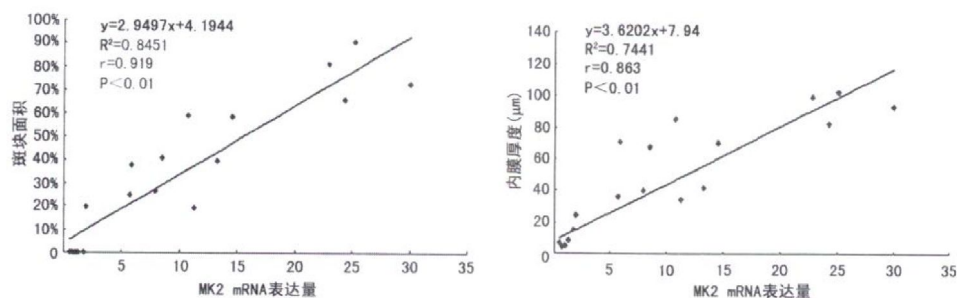


图 3 MK2 mRNA 表达量与主动脉斑块面积和内膜厚度的相关分析

3 讨论

As是一种慢性炎症性疾病,是心血管疾病发病和死亡的主要原因。MK2作为炎症过程的一个关键调节者,其促As效应引起了研究者的极大兴趣。我们的研究利用高脂饮食成功地建立了实验性As兔模型,观察到了As兔主动脉MK2 mRNA表达水平较正常对照组明显升高,且各组MK2 mRNA表达量与As斑块面积及内膜厚度呈正相关,提示MK2可能在基因水平参与了促As的进程。Jagavelu等^[5]研究也表明MK2的活性形式(磷酸化MK2)在动脉内皮和巨噬细胞丰富的斑块区域存在,MK2可通过两方面的作用促进As的发展:促进内皮细胞中招募单核细胞/巨噬细胞到病变血管壁的关键细胞因子(如VCAM-1、MCP-1等)表达,增加巨噬细胞浸润;④增强巨噬细胞中SR-A的表达,使其对修饰脂蛋白(如氧化型低密度脂蛋白)的摄取增加,促进泡沫细胞形成^[5]。这和研究一起为MK2参与As提供了不同层次的证据。

烟酸是目前最有效的升高HDL且唯一能降低脂蛋白(a)的药物,几个有关具有硬终点的烟酸临床试验和动物实验都显示烟酸类药物可减少严重冠状动脉事件的发生及总病死率^[7-9]。在本研究中,烟酸干预6周后血清TC含量明显降低,HDL水平轻度升高;主动脉内膜厚度和斑块面积虽较正常对照组增加,但与高脂血症组相比则明显减少,证明烟酸具有延缓As斑块形成的作用。同时我们的研究也观察到,烟酸治疗6周后主动脉MK2 mRNA表达水平较高脂血症组明显降低,且MK2 mRNA表达量与As斑块面积及内膜厚度呈正相关,提示烟酸抗As作用除与烟酸降脂作用有关外,还可能和降低MK2 mRNA水平有关。遗憾的是因抗兔的MK2抗体购买不到,未检测到烟酸对磷酸化MK2蛋白表达的影响。

烟酸降低MK2 mRNA表达的机制目前尚未清楚,可能与下列因素有关:降脂、抗炎作用。由于高脂血症可导致机体的慢性炎症过程,而烟酸的降脂作用可减轻炎症过程,再加上烟酸自身具有的抗炎作用^[10],从而使炎症途径的信号分子MK2 mRNA水平也降低。④减少泡沫细胞形成。烟酸可升高

HDL,同时HDL的载脂蛋白AⅣ成分可抑制LDL颗粒的聚集,以减少泡沫细胞的形成。而MK2可增强巨噬细胞中SR-A的表达,促进泡沫细胞形成^[5]。④烟酸可以降低亲炎症细胞因子细胞间黏附分子(ICAM-1)、血管细胞黏附因子1(VCAM-1)、单核细胞趋化因子1(MCP-1)、TNF- α 等的表达及NO的合成^[10],而MK2则参与了介导上述亲炎症细胞因子的表达^[11],这表明烟酸与MK2之间存在着直接或间接的作用。

总之,本研究从基因水平提示MK2是一个抑制As重要进程的潜在靶标,烟酸抗As作用除与烟酸降脂作用有关外,还可能与降低MK2 mRNA水平有关。

[参考文献]

- [1] 彭毅,邵紫璐,丁世芳. 动脉粥样硬化中的细胞因子及细胞因子相关信号通路[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(2): 161-164
- [2] Thandavarayan RA, Watanabe K, Ma M, et al. Dominant-negative p38 α mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009, 297(3): H911-H919
- [3] Yoshizawa T, Hammaker D, Boyle DL, et al. Role of MAPK kinase 6 in arthritis: distinct mechanism of action in inflammation and cytokine expression[J]. *J Immunol*. 2009, 183(2): 1360-1367
- [4] 龚小卫,姜勇. 丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶(MK)研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(7): 695-701
- [5] Jagavelu K, Tiege UJ, Gaestel M, et al. Systemic deficiency of the MAP kinase-activated protein kinase 2 reduces atherosclerosis in hypercholesterolemia mice[J]. *Circ Res*. 2007, 101(11): 1104-1112
- [6] Farmer JA. Nicotinic acid: a new look at an old drug[J]. *Curr Atheroscler Rep*. 2009, 11(2): 87-92
- [7] Taylor AJ, Zhu D, Sullenberger LE. Relationship between glycemic status and progression of carotid intima-media thickness during treatment with combined statin and extended-release niacin in ARBITER 2[J]. *Vasc Health Risk Manag*. 2007, 3(1): 159
- [8] Capuzzi DM, Morgan JM, Weiss RJ. Beneficial effects of rosuvastatin alone and in combination with extended-release niacin in patients with a combined hyperlipidemia and low high-density lipoprotein cholesterol levels[J]. *Am J Cardiol*. 2003, 91(11): 1304
- [9] Hunninghake DB, McGovern ME, Koren M. A dose ranging study of a new, once-daily, dual-component drug product containing niacin extended-release and lovastatin[J]. *Clin Cardiol*. 2003, 6(3): 112
- [10] Digby JE, McNeill E, Dyar OJ, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES, and MCP-1 and upregulation of adiponectin[J]. *Atherosclerosis*. 2010, 209(1): 89-95
- [11] Su X, Ao L, Zou N, et al. Post-transcriptional regulation of TNF-induced expression of ICAM-1 and IL-8 in human lung microvascular endothelial cells: an obligatory role for the p38 MAPK-MK2 pathway dissociated with HSP27[J]. *Biochim Biophys Acta*. 2008, 1783(9): 1623-1631

(此文编辑 文玉珊)