

额尔敦 - 乌日勒对动脉粥样硬化家兔主动脉 PCNA 和 PDGF 表达的影响 *

董 平 麻春杰 韩雪梅 王 滨

【摘要】目的 通过观察额尔敦 - 乌日勒对动脉粥样硬化(AS)家兔主动脉平滑肌细胞(SMC)增殖细胞核抗原(PCNA)和血小板源性生长因子(PDGF-A)表达的影响,探讨额尔敦 - 乌日勒抗 AS 的作用机制。方法 随机将 36 只家兔分为正常对照组、模型组、辛伐他汀组、额尔敦 - 乌日勒组。实验 12 周后处死家兔取主动脉,观察主动脉病理形态学改变,采用蛋白印迹法(Western blot)检测动脉粥样硬化家兔 PCNA、PDGF-A 蛋白表达量。结果 喂养高脂饲料后成功建立家兔 AS 模型。模型组有严重的 AS 病理改变,辛伐他汀组和额尔敦 - 乌日勒组 AS 病变明显减轻。正常对照组 PCNA 和 PDGF-A 少量表达,分别为 (0.65 ± 0.11) 和 (0.57 ± 0.11) ;模型组表达显著升高,分别为 (1.12 ± 0.06) 和 (1.17 ± 0.12) ,与模型组相比,额尔敦 - 乌日勒组 PCNA 和 PDGF-A 蛋白表达水平显著降低,分别是 (0.82 ± 0.10) 和 (0.81 ± 0.11) ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 额尔敦 - 乌日勒可能通过减少 PCNA 和 PDGF-A 蛋白表达,进而抑制血管平滑肌细胞(VSMC)迁移、增殖而起到抗 AS 的作用。

【关键词】额尔敦 - 乌日勒;动脉粥样硬化;增殖细胞核抗原;血小板源性生长因子

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的迁移、增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成过程中的关键环节。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种核内蛋白质,是评价细胞增殖状态的可靠指标^[1],其含量在细胞周期中的变化与 DNA 的合成一致。在 AS 病变中核因子 κB (NF- κB)激活且诱导血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)表达,而 PDGF 则是诱导 SMC 增殖和迁移的重要因素,它是促使平滑肌细胞从动脉中膜迁移到内膜并增殖的重要因素^[2]。笔者前期研究表明,额尔敦 - 乌日勒具有良好的降脂、抗 AS 作用^[3],本实验通过观察额尔敦 - 乌日勒对实验性动脉粥样硬化家兔主动脉 PCNA 和 PDGF 蛋白表达的影响,探讨额尔敦 - 乌日勒抗

AS 的分子机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

额尔敦 - 乌日勒由内蒙古蒙药股份有限公司生产,批号:100336;辛伐他汀片由山东罗欣药业股份有限公司生产,批号:090723;胆固醇由北京爱普华美生物科技有限公司生产,批号:20090715;蛋白提取 Triozl 裂解液由北京博鑫森生物技术有限公司提供;Rabbit Anti-PCNA、Rabbit Anti-PDGF-A 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, inc(Europe)。

1.2 动物

健康日本大耳白家兔,雄性,体重 (2.0 ± 0.2) kg,由北京大学医学部实验动物科学部提供,许可证编号:SCXK(京)2005-0002。

suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 172(3):217-224.

- [4] 刘艳霞.郭志强教授分期治疗妇科病经验[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2007,14(4):19-21.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30860386)

作者单位:010110,内蒙古医学院中学院

通信作者:麻春节, Tel: 13514819729, E-mail: mcj2007@yahoo.com.cn

作者简介:李楠,女,32岁,2009级博士研究生。研究方向:妇科内分泌及不孕症的研究。

金哲,女,57岁,教授,博士生导师。研究方向:主要从事妇科内分泌方面的研究。

(收稿日期:211-11-21)

1.3 主要仪器

PL303 电子天平, TDL-5-A 离心机 (上海安亭科学仪器厂制造), TGL-16G 冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂制造), DYY-2 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂); U640 型核酸和蛋白质分析仪 (Beckman);

Kodak image station 2000MM 成像系统 (美国 KODAK 公司)。

1.4 分析软件

ImageTool3.0, 由 UTHSCSA 提供。

2 方法

2.1 AS 家兔模型的建立

采用喂饲高脂饲料构建家兔 AS 模型, 将 36 只家兔随机分为 4 组, 每组 9 只。正常对照组喂普通饲料, 其它 3 组喂高脂饲料 (1.5% 胆固醇、5% 猪油、10% 蛋黄粉、83.5% 基础饲料)。正常对照组与模型组分别灌胃蒸馏水, 辛伐他汀组给予辛伐他汀 $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 额尔敦-乌日勒组给予额尔敦-乌日勒 $0.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续 90 天。耳缘静脉空气栓塞处死家兔, 取出主动脉肉眼观察后将主动脉弓部约 1~2cm 放入冻存管中液氮保存; 取主动脉弓下 1cm 用 10% 中性甲醛溶液固定。

2.2 主动脉形态学观察

将 10% 中性甲醛溶液中固定的主动脉常规取材、石蜡包埋、切片、HE 染色和弹力纤维染色, 光镜下观察并取相。应用 MOTIC AE20 显微镜及高清晰度彩色医学图文分析系统 (HMIAS-2000) 进行病变取图病理学观察及分析

2.3 Western blot 检测

将冻存管中的主动脉在冷冻条件下研磨粉碎, 应用 Trizol 裂解细胞, 提取蛋白质。应用分光光度计测定总蛋白浓度进行蛋白定量。组装灌胶用槽子, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 制备电泳用蛋白样品, 电泳条件 120V, 2.5h。应用电转仪 4℃ 下转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 转膜条件恒压 15V, 15min, 将 PVDF 膜转移到大的培养皿中, 加入封闭液, 在室温条件下, 摇床上封闭过夜。将 PVDF 膜与 1:200 稀释的各种一抗室温下反应 4h, 再与 1:1000 稀释的二抗室温下反应 1.5h。采用 ECL 化学发光检测: 等量混合 ECL 中的 A 液和 B 液, 使其与 PVDF 膜充分接触 1min, 沥干膜上多余的 ECL 试剂, 然后将 PVDF 膜置于 Kodak image Station 2000MM 成像系统曝光, 获取目的条带图像。后利用 ImageTool3.0 分析软件分析以检测 PCNA、

PDGF-A 的表达水平获得图像用图像处理软件 ImageTool3.0 测灰度值, 并与 β -actin 内参相比得相对值, 取 3 次重复实验结果的均值进行比较。

2.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计学处理。采用 ANOVA 方差分析并行方差齐性检验, 两组均数间比较采用 t 检验, 结果以均数加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 肉眼观察主动脉形态学改变

正常对照组家兔动脉壁结构正常, 无粥样病损, 无脂质斑块形成。模型组家兔主动脉内膜粗糙不平, 肉眼可见有大量黄白色条纹状脂纹及斑块, 向内膜表面显著隆起。辛伐他汀组和额尔敦-乌日勒组内膜普遍无太大病损, 病变的主动脉较模型组轻, 呈早期脂纹期改变。

3.2 光镜下主动脉病理形态学改变

光镜下显示正常对照组主动脉结构形态正常, 内膜完整光滑, 中膜细胞排列整齐, 结构清晰, 弹力板完整, 未见任何异常。模型组形成典型 AS 病变, 动脉壁局部平滑肌细胞减少, 细胞排列紊乱, 可见大量泡沫细胞以及脂质核形成。而辛伐他汀组和额尔敦-乌日勒组较模型组组病变轻, 无病变的主动脉壁、内膜、中膜、外膜均清晰可见, 各层结构正常, 病变主动脉内膜轻微增厚, 内皮细胞下有少量泡沫细胞聚集, 弹力板基本完整。

3.3 各组家兔主动脉 PCNA、PDGF-A 蛋白表达水平比较

实验结果显示, 正常对照组主动脉 PCNA 和 PDGF-A 蛋白表达水平均较低, 而给予高脂饲料各组的表达水平明显提高 ($P < 0.05$)。但额尔敦-乌日勒组和辛伐他汀组较模型组 PCNA、PDGF-A 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。详见表 1, 图 1。

表 1 各组家兔主动脉 PCNA、PDGF-A 蛋白表达与内参

组别	β -actin 灰度值比 ($\bar{x} \pm s$)	
	PCNA	PDGF-A
正常对照组	$0.65 \pm 0.13^{**}$	$0.57 \pm 0.11^{**}$
模型组	$1.12 \pm 0.06^{**}$	$1.17 \pm 0.12^{**}$
辛伐他汀组	$0.78 \pm 0.05^{**}$	$0.83 \pm 0.08^{**}$
额尔敦-乌日勒	$0.82 \pm 0.10^{**}$	$0.81 \pm 0.11^{**}$

与正常对照组比较 # $P < 0.05$; 与模型组比较 ▲ $P < 0.05$; 与辛伐他汀组比较 ★ $P < 0.05$

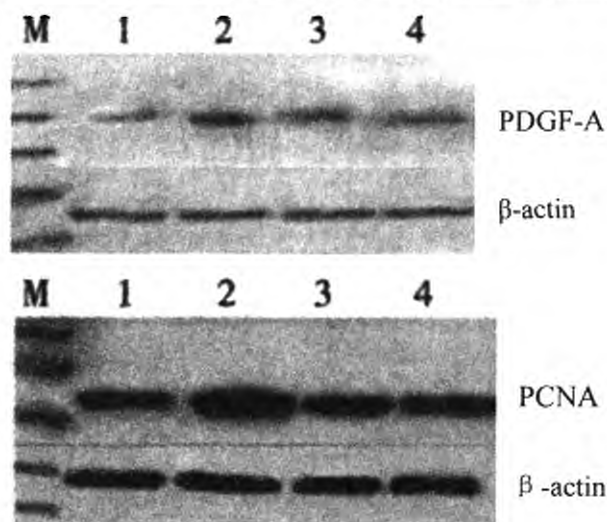


图 1 PCNA 和 PDGF-A Western blot 结果
M maker; 1 正常对照组; 2 模型组; 3 辛伐他汀组; 4 额尔敦 - 乌日勒组

3 讨论

额尔敦 - 乌日勒是传统蒙药制剂, 主要用于治疗心脑血管等疾病^[9], 我们的前期研究表明, 额尔敦 - 乌日勒具有明显的抗 AS 作用, 但其作用机制未能明确。本实验从 VSMC 增殖入手, 检测额尔敦 - 乌日勒对 SMC 增殖相关因子蛋白表达影响, 旨在进一步阐明额尔敦 - 乌日勒的抗 AS 作用。

在 AS 病变过程中, 增值的 SMC 是斑块内的主要成分之一, 它是决定血管活性和血管构型的重要因素。这些血管结构功能的变化实际上就是 VSMC 增生与肥大的过程, 其中 SMC 吞噬脂质形成泡沫细胞是 AS 形成中的重要环节^[10]。本实验通过喂饲高脂饲料构建 AS 家兔模型, 通过对主动脉的大体观察, 以及 HE 染色光镜观察显示斑块形成, 并表明斑块中存在 SMC 来源的泡沫细胞。增殖细胞核抗原 (PCNA) 是一种核内蛋白质, 它的表达与细胞增殖有关^[11], 实验结果显示, 喂饲高脂饲料后, 模型组 PCNA 大量表达, 而正常组仅有少量表达, 辛伐他汀组与额尔敦 - 乌日勒组 PCNA 的表达量亦少于模型组。

血管中膜的 SMC 发生增殖并直接向内膜迁移的机制非常复杂, 有众多生长因子参与这个过程, 在生长因子的作用下, VSMC 被激活, 其表型发生改变, 并最终导致内皮细胞的损伤, 而损伤的内皮细胞, 激活的血小板, 变型的平滑肌细胞都能以自分泌、旁分泌形式释放大量的 PDGF, PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂, 它与相应细胞膜 PDGF 受体结合可刺激多种细胞分裂和增殖, 是诱导平滑肌细胞增殖和迁移的重要因素, 亦是促使平滑肌细胞从动脉中膜迁移到内膜增殖的重要因素, 因此通过抑制

PDGF 的表达, 从而抑制 VSMC 的迁移、增殖, 亦是近年 AS 治疗的一个新靶点^[7-9]。

本研究显示额尔敦 - 乌日勒能够抑制家兔 AS 病变过程中 PCNA 和 PDGF 的表达, 减少 SMC 增殖, 明显减少斑块的形成。因此认为额尔敦 - 乌日勒可能通过降低 PCNA 与 PDGF 的表达水平, 抑制 SMC 的增殖而起到抗 AS 作用的。

参考文献

- [1] Pan D, Yang J, Lu F, et al. Platelet-derived growth factor BB modulates PCNA protein synthesis partially through the transforming growth factor beta signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Cell Biol*. 2007 Oct; 85(5): 606-15.
- [2] Ali R, Keramati, Rajvir Singha, Aiping Lin, et al. Wild-type LRP6 inhibits, whereas atherosclerosis-linked LRP6R611C increases PDGF-dependent vascular smooth muscle cell proliferation. *Cell Biol*. 2010 December; 23:1-5
- [3] 董平, 麻春杰, 温都苏毕力格, 等. 额尔敦 - 乌日勒对实验性家兔动脉粥样硬化的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2011.29 (5): 1012-1015
- [4] 蒙古学百科全书编辑委员会《医学卷》编辑委员会编. 蒙古学百科全书·医学卷 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2002, (蒙文版) 133-134.
- [5] Victor J. Dzau, Ruediger C. Braun-Dullaeus, Daniel G. Sedding, Vascular Proliferation and Atherosclerosis: New Perspectives and Therapeutic Strategies. *Nat Med* 2002.8(11):1249 - 1256.
- [6] Victor J. Dzau, Ruediger C. Braun-Dullaeus, Daniel G. Sedding. Vascular Proliferation and Atherosclerosis: New Perspectives and Therapeutic Strategies *Nat Med* 2002.8(11): 1249 - 1256.
- [7] Kai Kappert, Jan Sparwel, ?sa Sandin, et al. Cultured VSMCs and in Restenosis Antioxidants Relieve Phosphates Inhibition and Reduce PDGF Signaling in Cultured VSMCs and in Restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:2644-2651.
- [8] Brown XQ, Bartolak-Suki E, Williams C, et al. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. *J. Cell Physiol*. 2010 Oct; 225(1):115-22.
- [9] Li Li, Donald K. Blumenthal, Christi M., Terry, et al. PDGF-Induced Proliferation in Human Arterial and Venous Smooth Muscle Cells: Molecular Basis for Differential Effects of PDGF Isoforms. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011, 112:289-298.

作者简介: 董平, 男, 28 岁, 汉族, 内蒙古医学院中医学院硕士研究生。研究方向: 中 (蒙) 医药防治心脑血管病证的研究。

(收稿日期: 2011-11-26)