

葛根素对动脉粥样硬化兔髂动脉 C 反应蛋白表达的影响

胡文志¹, 黄翹胜², 孙烈¹, 杨季明¹, 洪梅¹, 蒋振忠¹, 杨富¹, 张博晴¹, 周海波¹

[摘要] 目的 观察葛根素对动脉粥样硬化兔髂动脉分泌和表达 C 反应蛋白(CRP)的影响。方法 20 只家兔分为正常对照组(6 只,正常饮食)、基础对照组(8 只,球囊损伤和高脂饮食)和葛根素干预组(8 只,球囊损伤、高脂饮食和葛根素干预),球囊损伤后 4 周处死;取一侧病变髂动脉做病理切片,应用免疫组化法测定 CRP 的表达;取另一侧病变髂动脉抽提总 RNA,应用半定量逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)测定 CRP mRNA 的表达。结果 葛根素干预组髂动脉粥样斑块 CRP mRNA 及其蛋白质表达均明显低于基础对照组($P < 0.01$)。结论 葛根素可以通过调节兔动脉粥样斑块分泌 CRP 途径发挥稳定动脉粥样硬化斑块的作用。

[关键词] 葛根素;动脉粥样硬化;C 反应蛋白

Effect of Puerarin on Expression of C reactive Protein in Iliac Artery of Atherosclerotic Rabbit HU Wen-zhi, HUANG Qiao-sheng, SUN Lie, et al. The Department of Cardiology, Nanjing Medical University Second Hospital, Nanjing 210011, Jiangsu, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Puerarin on expression of C-reactive protein (CRP) in iliac artery of atherosclerotic rabbits. **Methods** Twenty male New Zealand white rabbits were divided into the normal control group ($n=6$, fed on a normal diet), basic control group ($n=8$, fed on a cholesterol diet) and Puerarin group ($n=8$, fed on a cholesterol diet). The balloon injury of iliac arteries was performed in animals of the basic control group and Puerarin group, and the animals of the Puerarin group were injected with Puerarin (25 mg/kg/d per rabbit) after injury. Four weeks after balloon injury, untreated and balloon injury iliac arteries were harvested for immunocytochemical staining. The mRNA and protein expression of CRP were tested by RT-PCR and immunocytochemistry. **Results** The mRNA and expression of CRP in atherosclerotic plaque of iliac artery in the Puerarin group was significantly lower than that in the basic control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Puerarin can make atherosclerotic plaque stable by regulating the expression of CRP in iliac artery of atherosclerotic rabbit.

Key words: Puerarin; atherosclerosis; C-reactive protein

[中图分类号] R543.5 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)04-0321-02

[本文著录格式] 胡文志,黄翹胜,孙烈,等.葛根素对动脉粥样硬化兔髂动脉 C 反应蛋白表达的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(4):321-322.

动脉粥样硬化是一种炎症性疾病,且炎症贯穿于动脉粥样硬化的发生和发展过程^[1]。大量研究结果显示,C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)在斑块的炎症发生和发展过程中扮演着重要的角色^[2]。本研究采用高脂饮食加动脉内膜损伤术建立兔动脉粥样硬化模型,观察 CRP 及其 mRNA 的表达,并用葛根素(Puerarin)进行干预,以探讨葛根素稳定斑块的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 新西兰纯种雄性大白兔 20 只(体重 2.5~3.3 kg),购自南京医科大学校部动物中心。球囊导管(球囊直径 2.5 mm,长 20 mm)为 Cordis 公司产品。主要试剂和仪器:RPMI 1640 培养粉(GIBCO 公司,美国);TRIzol 试剂盒(GIBCO 公司,美国);葛根素(扬子江制药厂);各种半定量逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)试剂和 DNA marker(Takara 生物公司,日本);羊抗 CRP 多克隆抗体(晶美生物工程公司);引物(上海

海博新生物公司合成)。超净工作台(BCM1000 型,中国苏州);CO₂ 培养箱(BBI6 型,德国 Heracus 公司产品);倒置相差显微镜(CK40, Olympus);低温离心机(GL-20B,上海安亭科学仪器厂);PC2400 扩增仪(Perkin Elmer 公司,美国);各种电泳仪、UVP 凝胶图像扫描系统等。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 20 只兔随机分为正常对照组(6 只)、基础对照组(8 只)和葛根素干预组(8 只)。

1.2.2 动脉粥样硬化模型建立及标本采集 对动物观察 7 d 后,基础对照组、葛根素干预组予高脂饮食(胆固醇 1 g/d/只,猪油 10 g/d/只),正常对照组予普通饮食。高脂喂养后 14 d 行髂动脉内膜球囊损伤术。术后葛根素干预组静脉注射葛根素 20 mg/d/只,基础对照组不用任何药物干预。术后分组喂养,28 d 后处死所有动物,取出两侧髂动脉粥样硬化段,随机选取一侧标本置液氮中保存,用作 RT-PCR 试验,另一侧置于 10%中性福尔马林中,固定 24 h 后常规石蜡包埋。

1.2.3 病理形态学和免疫组织化学检查 取石蜡包埋标本,连续切片(厚度 4 μm),分别行 HE 染色和羊抗 CRP 多克隆抗体免疫组化染色实验。应用图像分析系统对 CRP 阳性面积进行半定量分析,CRP 阳性面积表达率为 CRP 阳性面积/内膜面积。

基金项目:南京医科大学科技发展基金重点项目资助(No.

NYD2DI8)

作者单位:1. 南京医科大学第二附属医院心血管内科,江苏南京市 210011;2. 鄱阳医学院附属医院十堰市太和医院,湖北十堰市 442000。

作者简介:胡文志(1976-),男,广东清远市人,主治医师,硕士,主要从事冠心病及心衰的研究。

1.2.4 动脉硬化组织 CRP mRNA 表达检测 取液氮保存的一侧髂动脉约 1.0~1.5 cm, 加入 1 ml TRIzol 试剂并迅速剪碎, 置于组织匀浆器中匀浆, 抽提总 RNA, 采用紫外分光光度计测定其浓度。引物序列为: CRP 上游引物: 5'-TATTTTCTCGTATGCCACCA-3', 下游引物: 5'-TTTCCAATGTCTCCACCAG-3', 扩增 321 bp; β 肌动蛋白(β -actin)作为内参, 上游引物: 5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTATG-3', 下游引物: 5'-ATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAG-3', 扩增 542 bp。根据 RT-PCR 试剂盒说明书分别加入 RT-PCR 反应所需试剂、引物、mRNA 样品, 最后加入 RNA 酶无菌水至 50 μ l, 进行 RT-PCR 反应。RT-PCR 逆转录的条件为: 50 $^{\circ}$ C 1 h, 94 $^{\circ}$ C 5 min; PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环。

1.2.5 RT-PCR 产物分析 用含有 2% 琼脂糖及 0.5 μ l/ml 溴化已锭的凝胶对 RT-PCR 反应产物进行电泳, 用数字成像系统进行分析 and 拍照。以 β -actin 光密度值进行标准校正, 计算 CRP 产物的相对量。

1.3 统计学处理 所有指标用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行多组间差异比较的方差分析。

2 结果

2.1 病理形态学和免疫组织化学检查 经高脂饮食和球囊损伤的兔的髂动脉肉眼观察明显增粗, 管壁有黄色脂样斑块向管腔内突出; 光镜下可见管腔变窄且不规则, 内膜明显增厚, 内含大量泡沫细胞, 中膜平滑肌细胞增生明显(见插页 1 图 1.1)。CRP 多克隆抗体免疫组化观察, 正常对照组只有内皮细胞表达少量 CRP, 为(2.3 \pm 0.8)%; 基础对照组 CRP 阳性表达为(40.2 \pm 12.8)%, 较正常对照组明显增加($P < 0.01$), 在斑块的各部位均有分布; 葛根素干预组 CRP 阳性表达为(26.5 \pm 8.4)%, 较基础对照组明显减少($P < 0.01$), 主要局限于斑块的中底部。

2.2 髂动脉 CRP mRNA 表达 髂动脉 CRP mRNA 表达正常对照组为(0.72 \pm 0.15), 基础对照组为(5.32 \pm 1.34), 葛根素干预组为(3.68 \pm 1.02), 葛根素干预组和基础对照组均明显高于正常对照组($P < 0.01$), 但葛根素干预组明显低于基础对照组($P < 0.01$)。插页 1 图 1.2 为 RT-PCR 产物电泳结果。

3 讨论

炎症在冠心病动脉粥样硬化斑块的发生发展及其易损性中扮演了重要角色^[1-3]。各种炎症因子直接或间接导致斑块炎症的发生发展和斑块的易损, 如单核细胞趋化因子-1、干扰素 γ (interferon γ , INF- γ)、血清淀粉 A、白介素 1、可溶性黏附分子 1 和 CRP 等, 其中

CRP 与心血管事件的相关性最强^[4]。传统观点认为, CRP 由肝细胞分泌。Yasojima 等结合原位杂交核 Western 印迹法证实, 在动脉粥样硬化斑块、平滑肌细胞和巨噬细胞内有密集的 CRP mRNA 表达, 且相应蛋白水平也明显上调^[5], 而通常认为是 CRP 主要来源的肝脏和白细胞浓集的脾脏, CRP mRNA 水平则较斑块局部为低。Paul 等的研究显示, 敲除 apoE 为背景的 CRP 转基因大鼠, 由于 CRP 过表达而致主动脉粥样硬化病变加速^[6], 为 CRP 直接参与动脉粥样硬化的理论提供了更有力且更直接的证据。葛根素是葛根中异黄酮的主要有效成分之一, 化学名为 8-5-葡萄糖吡喃糖-4', 7-二羟基异黄酮。对葛根素的药理作用及机理的研究显示, 葛根素对心血管系统具有抗心律失常、降血压、扩张冠状动脉、抗心肌缺血、抗过氧化、抗缺血再灌注损伤、影响血液动力学, 以及抗血小板活性、改善纤溶活性及减轻炎症反应等作用。已有临床试验证实, 葛根素能缩小急性心肌梗死患者的心肌梗死面积, 改善心功能, 并且能降低血清中的炎症因子^[7]。但目前对葛根素的研究多限于离体器官和整体实验水平, 较少涉及酶、受体、离子通道、DNA 调节等有关细胞及分子等活性物质的影响, 而关于葛根素对动脉粥样斑块中 CRP 表达的影响, 尚未见相关研究报道。

本研究结果显示, 葛根素干预组兔髂动脉粥样硬化斑块 CRP 的表达较基础对照组明显降低, 且基因表达水平和蛋白质水平相一致, 提示葛根素能降低动脉组织的 CRP 表达, 减轻斑块的炎症反应, 延缓动脉粥样硬化斑块的发展和血管成形术后的内膜增生。

[参考文献]

- [1] Lindemann S, Kramer B, Seizer P, et al. Platelets, inflammation and atherosclerosis[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (Suppl 1): 203-211.
- [2] Subodh V, Palu E, Edward TH. C-reactive protein structure affects function[J]. Circulation, 2004, 109(3): 1914-1917.
- [3] Christos K, Paul DT. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers[J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(10): 1563-1569.
- [4] Inoue N. Vascular C-reactive protein in the pathogenesis of coronary artery disease: role of vascular inflammation and oxidative stress[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006, 6(4): 227-231.
- [5] Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, et al. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques[J]. Am J Pathol, 2001, 158(3): 1039-1051.
- [6] Paul A, Ko KW, Li L, et al. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 2004, 109(5): 647-655.
- [7] 刘素云, 李拥军, 齐华阁, 等. 葛根素注射液对急性心肌梗死患者梗死面积及心功能的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(7): 394-396.

(收稿日期: 2007-11-27)



图 1.1 光镜下兔髂动脉病理改变(HE 染色, 10 ×)



图 1.2 髂动脉 CRP mRNA 表达的改变