文章编号:1000-5404(2008)09-827-04

论著

南蛇藤素对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉壁 MIF 及 MMP-9 表达的影响

李金平,程 军,田 卓,胡厚源 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察南蛇藤素对 ApoE 基因敲除小鼠在动脉粥样硬化斑块形成的早期阶段主动脉壁中巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor,MIF)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)表达的影响。**方法** 8 周龄雄性 ApoE 基因敲除小鼠 12 只,按随机数字表法分为南蛇藤素干预组和对照组,每组 6 只,均给予高脂饮食饲养 8 周,在高脂饲养的后 4 周,分别予以 2 mg·kg^{-1}·d^{-1}南蛇藤素和相当剂量的溶剂二甲基亚砜(DMSO)腹腔注射,每日 1 次,连续用药 4 周;小鼠处死后行主动脉连续石蜡切片,HE 染色观察组织形态学改变,测定 ApoE 基因敲除小鼠主动脉根部粥样斑块面积,同时采用免疫组化方法观察主动脉壁 MIF 和 MMP-9 蛋白表达的强度。**结果** 图像分析测量结果显示对照组形成了早期斑块;南蛇藤素干预组斑块面积较对照组明显减小($P<0.01$),斑块面积/动脉壁横切面积也明显降低($P<0.01$);南蛇藤素干预组与对照组比较,MIF、MMP-9 的表达均明显降低($P<0.01$)。**结论** 南蛇藤素可能通过下调 ApoE 基因敲除小鼠主动脉壁 MIF、MMP-9 表达,发挥一定的抗动脉粥样硬化作用。

关键词:南蛇藤素;载脂蛋白 E 基因敲除小鼠;巨噬细胞移动抑制因子;基质金属蛋白酶-9
中图法分类号:R-33;R543.1;R979.5 **文献标识码:**A

Celastrol down-regulates expressions of MIF and MMP-9 in the aorta of ApoE gene knockout mice

LI Jin-ping, CHENG Jun, TIAN Zhuo, HU Hou-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of celastrol on the expressions of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the aorta of apoE gene knockout mice with earlier atherosclerosis. Methods Eight-week-old ApoE gene knockout male mice were divided randomly into control group and celastrol treatment group ($n=6$ in each group). The mice in celastrol group were given. celastrol (2 mg·kg^{-1}·d^{-1}) by intraperitoneal injection for 4 weeks; and the mice in control group were only given equivalent amount of dimethyl sulfoxide (DMSO). HE staining of root aorta were used to observe the histomorphological changes and measure the size of plaque in ApoE$^{-/-}$ mice. The expressions of MIF and MMP-9 were detected by immunological histochemical method. Results The area of lipid plaque in the mice treated with celastrol was significantly smaller than that of the control ($P<0.01$), and so was the plaque area/aorta cross section area ($P<0.01$). The expression of MIF was significantly decreased in celastrol group compared with the control group ($P<0.01$) The expression of MMP-9 was also significantly decreased in celastrol group compared with the control group ($P<0.01$). Conclusion Celastrol can inhibit the progress of atherosclerotic plaque in ApoE$^{-/-}$ mice, which might be relative to its inhibitory effects on the expression of MIF and MMP-9 in the aorta.

Key words: celastrol; ApoE gene knockout mice; macrophage migration inhibitory factor; matrix metalloproteinase-9

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的主要疾病之一,发病率呈上升趋势,在其疾病进程中伴有各种炎症因子的过度表达、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)调节失衡等病理过程[1-3]。载脂蛋白 E(ApoE)基因敲除小鼠,在正常饮食下即可形成明显的高脂血症及 AS 病灶。高脂饮食下的 AS 灶病变得更明显、形成更早,是研究 AS 发病机制和干预措施较理想的动物模型。南蛇藤素具

作者简介:李金平,男,辽宁省黑山县人,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化发病机制与防治方面的研究。电话:(023)68765172
通信作者:胡厚源,电话:(023)68765171,E-mail:houyuanhu@medmail.com.cn
收稿日期:2007-10-09 修回日期:2007-11-09

有免疫抑制及影响细胞增殖的作用[4,5]，临床上多用于与免疫异常相关的疾病的治疗和某些肿瘤的辅助治疗，但尚未有将其用于心血管疾病治疗的报告。本研究以 ApoE 基因敲除小鼠为对象，观察南蛇藤素对动脉壁 MMP-9 和炎症因子 MIF 表达的影响，探讨其阻止斑块形成的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

南蛇藤素（Calbiochem，美国），ApoE 基因敲除小鼠（北京大学医学部实验动物中心），兔抗 MIF 多克隆抗体、兔抗MMP-9多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、即用型链霉素抗生物素蛋白过氧化物酶（SABC）、DAB 显色试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司），胆固醇（成都科龙化工公司），脂肪酸（市售猪油熬制），Image Pro Plus 6.0 图像分析软件（Media cyber，美国），数码图像采集设备（Nikon Eclipse E200 ，日本）。

1.2 动物分组

ApoE 基因敲除小鼠 12 只，雄性，8 周龄，体质量（19.41 ± 0.60）g，按随机数字表法分为 2 组：南蛇藤素干预组和对照组，每组 6 只，2 组均给予高脂饮食饲养 8 周。高脂饮食是在普通饮食中加入脂肪酸与胆固醇，其中脂肪酸含量为 21%，胆固醇含量为 0.21%[6]。在高脂饲养的后 4 周，南蛇藤素干预组予以 2 mg·kg^{-1}·d^{-1}南蛇藤素（溶于 DMSO）腹腔注射，对照组予以相当剂量的溶剂 DMSO 腹腔注射，每日 1 次，连续用药 4 周；实验第 16 周，小鼠经 20% 乌拉坦腹腔麻醉，剖开胸腔行心脏取血处死，经 4 % 多聚甲醛灌注固定后取心脏连主动脉，剥离血管外附着组织，行石蜡包埋，自主动脉根部向下行连续切片，每只小鼠切片 50 张，每张切片 2 个组织面，切片厚 5 μm ，每间隔 6 张取 1 张，分别行 HE 染色、MIF 及 MMP-9 免疫组化染色。

1.3 主动脉 AS 斑块面积的分析

小鼠主动脉切片每间隔 6 张取 1 张，共取 6 张，做 HE 染色，光镜观察血管壁 AS 病变的组织学形态 数码相机 100 倍镜下采集图像，用 Image Pro Plus 6.0 图像处理软件作形态学分析，测量动脉壁横切面积、粥样斑块面积，计算粥样斑块面积与动脉壁横切面积之比，取其均值进行统计学分析。

1.4 免疫组织化学染色及分析

取各组小鼠主动脉切片常规行脱蜡、水化、组织抗原修复，磷酸盐冲洗 3 次，一抗稀释度为 1∶50，SABC 法染色，DAB 显色 海组中另用 PBS 取代一抗作为阴性对照 光镜下见黄褐色颗粒为阳性。数码相机 400 倍镜下采集图像，采用 Image Pro Plus 6.0 图像处理软件进行积分光密度值（IOD）测定，同时测定血管壁的面积，计算出平均光密度（AOD），AOD = IOD/血管壁面积，通过 IOD 半定量目标蛋白的表达，其值越大，表达量越高。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行两组间 t 检验。

2 结果

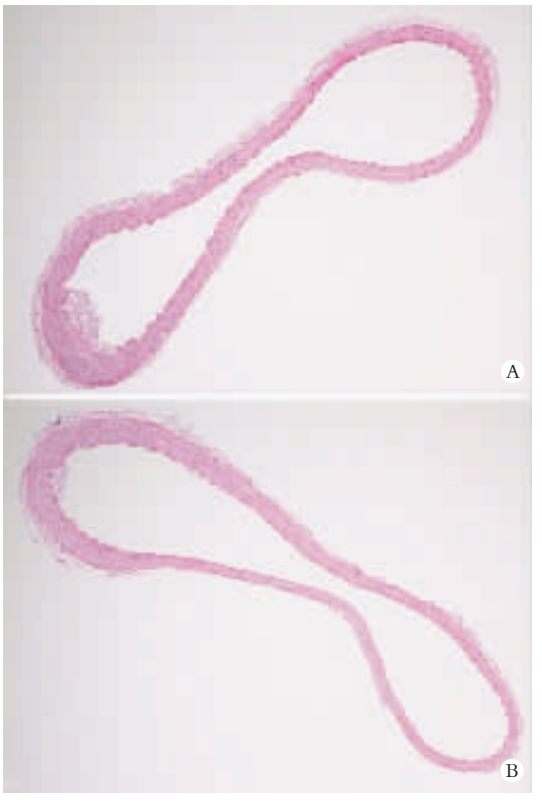
2.1 南蛇藤素对 ApoE 基因敲除小鼠斑块形成的影响

2.1.1 HE 染色结果 对照组主动脉内多可见管壁厚薄不均，中膜近内膜处平滑肌排列紊乱和增生，AS 病变血管内膜层增厚，可见由大量泡沫细胞形成的脂纹 ；南蛇藤素干预组主动脉内可见早期脂纹形成，泡沫细胞数量较少（图 1）。

2.1.2 斑块面积与主动脉壁横截面积的比较 南蛇藤素干预组与对照组比较，斑块总面积明显减少［南蛇藤素干预组（4 270.74 ± 1 027.64）μm^2、对照组（8 971.19 ± 1 665.76）μm^2，$P < 0.01$］斑块面积/动脉壁横切面积也明显降低［南蛇藤素干预组（0.044 ± 0.012）和对照组（0.090 ± 0.020），$P < 0.01$］血管壁面积无统计学差异［南蛇藤素干预组（103 729.02 ± 21 468.56）μm^2、对照组（100 142.58 ± 14 617.99）μm^2，$P = 0.238$］。

2.2 南蛇藤素对小鼠主动脉壁 MIF、MMP-9 表达的影响

MIF 阳性表达均为细胞质呈现棕黄色，细胞核不着色。对照组内皮细胞和平滑肌细胞有较强的 MIF 表达，南蛇藤素干预组 MIF 表达较弱，与对照组比较有显著性差异［光密度值为南蛇藤素干预组（0.022 ± 0.008）、对照组（0.054 ± 0.015），$P < 0.01$］，提示南蛇藤素可以显著降低动脉血管壁 MIF 的表达。MMP-9 阳性表达为细胞质呈现棕黄色，细胞核不着色。对照组中内皮细胞和平滑肌细胞有较强的 MMP-9 表达，南蛇藤素干预组 MMP-9 表达较弱［光密度值为南蛇藤素干预组（0.018 ± 0.006）、对照组（0.036 ± 0.008），$P < 0.01$］，提示南蛇藤素可以显著降低动脉血管壁 MMP-9 的表达（图 2、3）。



A 对照组 ；B 南蛇藤素干预组

图 1 ApoE 基因敲除小鼠主动脉形态学观察 （HE × 100）



A：对照组；B：南蛇藤素干预组；C：阴性对照

图 2　ApoE 基因敲除小鼠主动脉根部血管壁 MIF 的表达　（SABC　×400）



A：对照组；B：南蛇藤素干预组；C：阴性对照

图 3　ApoE 基因敲除小鼠主动脉根部血管壁 MMP-9 的表达　（SABC　×400）

3　讨论

动脉粥样硬化是指大中型动脉内膜和内膜下发生脂质沉积，并伴有中层平滑肌细胞向内膜移行增殖，内膜层增厚而形成的粥样病灶或纤维脂质斑块。在不同的发展阶段病变有以下几种组织学表现：脂纹、纤维斑块、粥样斑块及复合病变。ApoE 基因敲除小鼠是较成熟的动脉粥样硬化动物模型，在 5～6 周龄时主要是单核细胞趋附于损伤的内皮细胞处，8～10 周龄出现脂纹，15～20 周龄后逐渐出现纤维斑块，病变部位以主动脉根部最为明显，其次为胸主动脉。其斑块分布及病理特征与人类 AS 斑块极为相似。本研究采用 ApoE 基因敲除小鼠为实验动物，以斑块面积与血管壁面积比来评价动脉粥样硬化发展程度，本实验中对照组和南蛇藤素干预组 ApoE 基因敲除小鼠均有不同程度动脉粥样硬化斑块形成，证实该动物模型是成功的。

南蛇藤素（Celastrol）又名雷公藤红素（Tripterine），是从植物雷公藤中提取的一种单体，属三萜类色素，分子式为 $C_{29}H_{38}O_4$，相对分子质量为 450。本研究表明，对照组和南蛇藤素干预组都有脂纹或纤维斑块等早期 AS 病变形成，但相比较而言，南蛇藤素干预组斑块病变较局限，斑块面积与管壁面积之比值低于对照组，提示南蛇藤素在一定程度上抑制了斑块的进展，具有一定的抗动脉粥样硬化作用。

本研究表明，南蛇藤素对 MIF 表达有显著抑制作用。目前药理研究已证实，南蛇藤素具有显著的免疫抑制和抗炎作用。它可以通过 NF-κB 途径抑制内皮细胞 IL-1、VCAM-1、ICAM-1、E-选择素等因子表达[5]；在各种炎症性动物模型中，应用南蛇藤素可以降低血清的 IL-1、IL-2、IL-10、NO 水平[7]。MIF 是与动脉粥样硬化密切相关的一种炎症因子，在与动脉斑块有关的单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞中均有表达，而在正常动脉壁中基本无表达[8,9]。MIF 可以诱导单核/巨噬细胞黏附于内皮，并可以激活血管内皮细胞、平滑肌细胞等表达丰富的致炎因子和细胞介质，如 TNF-α、IL-1、IL-8、ICAM-1 和 VCAM-1 等。目前已经有很多证据表明动脉粥样硬化是一种炎症性疾病，而抑制血管的炎症反应是抗动脉粥样硬化治疗的重要手段。本研究结果提示，南蛇藤素除可直接抑制炎症因子的表达外，尚可能通过抑制 MIF 的表达进而影响众多炎症因子的分泌和表达，减轻血管的炎症反应，防止单核/巨噬细胞的进一步聚集和浸润，减少巨噬细胞源性泡沫细胞的形成，从而发挥抗动脉粥样硬化作用。

本研究观察了 ApoE 基因敲除小鼠动脉壁内 MMP-9水平的变化，结果显示，南蛇藤素可以显著降低血管壁内 MMP-9 的表达。MMPs 是调节细胞外基质动态平衡的最重要的一大酶系，对基质有广泛的降解作用，与动脉粥样斑块的关系非常密切[10,11]。与动脉斑块有关的免疫细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞等都可以分泌 MMPs，而在正常的血管壁中

MMPs 表达甚少。MMP-9 可以彻底降解胶原片段,增强血管平滑肌细胞迁移活性和收缩胶原的能力[12],对 ApoE 基因敲除小鼠的动脉粥样斑块形成有促进作用[13],在动脉粥样硬化引起的血管代偿性重塑中 MMP-9 也发挥了很大的作用[14]。在人不稳定型心绞痛病变组织中,巨噬细胞和平滑肌细胞中的 MMP-9 合成活跃,其结果是破坏斑块表面的纤维帽,斑块易于发生破裂[15]。本研究表明,南蛇藤素可以抑制 ApoE 基因敲除小鼠血管壁 MMP-9 的表达,因而可以减少胶原降解、抑制平滑肌细胞迁移,减少平滑肌源性泡沫细胞的聚集,从而延缓动脉粥样斑块形成;同时 MMP-9 表达的降低也可以减少斑块表面纤维帽中胶原降解,防止纤维帽的破裂,进而发挥稳定斑块的作用。南蛇藤素可以抑制 IL-1、TNF-α 等炎症因子的表达,已经有明确证据表明此类炎症因子可以促进 MMP-9 的表达,但并不排除南蛇藤素直接或通过其他未知的途径抑制 MMP-9 的表达,这需要进一步的研究证实。

因此,南蛇藤素可能通过降低动脉血管壁 MMP-9 和炎症因子 MIF 的水平,抑制炎症介质的表达,同时抑制血管壁胶原降解,限制平滑肌细胞向内皮迁移,从而起到抑制动脉粥样硬化和稳定动脉粥样硬化斑块的作用。

参考文献:

[1] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2):115 - 126.

[2] Lessner S M, Martinson D E, Galis Z S. Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2004, 24(11):2123 - 2129.

[3] Galis Z S, Khatri J J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly[J]. Circ Res, 2002, 90(3):251 - 262.

[4] Kusunoki N, Yamazaki R, Kitasato H, *et al*. Triptolide, an active compound identified in a traditional Chinese herb, induces apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts[J]. BMC Pharmacol, 2004, 4:2.

[5] Zhang D H, Marconi A, Xu L M, *et al*. Tripterine inhibits the expression of adhesion molecules in activated endothelial cells[J]. J Leukoc Biol,2006, 80(2):309 - 319.

[6] Raj T, Kanellakis P, Pomilio G, *et al*. Inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2006, 26(8):1845 - 1851.

[7] Li H, Zhang Y Y, Huang X Y, *et al*. Beneficial effect of tripterine on systemic lupus erythematosus induced by active chromatin in BALB/c mice[J]. Eur J Pharmacol,2005, 512(2 - 3):231 - 237.

[8] Kong Y Z, Huang X R, Ouyang X, *et al*. Evidence for vascular macrophage migration inhibitory factor in destabilization of human atherosclerotic plaques[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1):272 - 282.

[9] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, *et al*. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis[J]. Circulation, 2002, 105(13):1561 - 1566.

[10] 成 勇,李朝武,涂明义,等. 颈动脉斑块类型与 MMP-9 的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(18):1812 - 1814.

[11] 赵 瑾,迟路湘,陈德英. 基质金属蛋白酶-2 在兔颈动脉内膜损伤后动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 29(8):792 - 794.

[12] Galis Z S, Johnson C, Godin D, *et al*. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling[J]. Circ Res, 2002, 91(9):852 - 859.

[13] Choi E T, Collins E T, Marine L A, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 modulation by resident arterial cells is responsible for injury-induced accelerated atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(5):1020 - 1025.

[14] Lessner S M, Martinson D E, Galis Z S. Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,, 2004, 24(11):2123 - 2129.

[15] Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, *et al*. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome[J]. Am Heart J, 2001, 141(2):211 - 217.

(编辑 陈聪连)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准。

A:理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B:实用性技术成果报告(科技)、理论学习与社会实践总结(社科)

C:业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等)

D:一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E:文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等)

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部