基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0037-04

氟伐他汀及麝香保心丸对动脉粥样硬化兔LOX-1表达影响的研究

朱 莉[1],周盛年[1],刘忠志[2],董秋立[2],董 波[2]

(1.山东大学齐鲁医院神经内科,济南 250021;2.山东大学省立医院心内科,济南 250021)

【摘 要】目的:探讨动脉硬化兔血管中的血凝素样氧化低密度蛋白受体1(Lectin like oxidized low density tipoprotein receptor-1,LOX-1)蛋白及基因的表达及氟伐他汀、麝香保心丸对LOX-1蛋白及基因表达的影响。方法:将32只新西兰大白兔随机分为高脂饮食组、高脂饮食+氟伐他汀组、高脂饮食+麝香保心丸组及正常对照组,应用免疫组化测定兔胸主动脉中LOX-1的蛋白表达水平,用RT-PCR测定兔胸主动脉中LOX-1基因表达的水平。结果:高脂饮食组、氟伐他汀组及麝香保心丸组胸主动脉中均有LOX-1蛋白的表达,氟伐他汀及麝香保心丸干预组LOX-1蛋白及基因表达水平均明显低于高脂饮食组($P<0.05$)。结论:动脉硬化兔 LOX-1蛋白及基因表达水平明显升高,氟伐他汀及麝香保心丸能够明显抑制动脉硬化兔LOX-1蛋白及基因表达,从而可能在动脉粥样硬化的预防中起重要作用。

【关键词】血凝素样氧化低密度脂蛋白受体;动脉粥样硬化;氟伐他汀;麝香保心丸

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Effects of fluvastatin and Shexiang baoxin pill on expression of 1 lectinlike oxidized low density lipoprotein receptor-1 in a rabbit model of atherosclerosis

ZHU Li,et al

(*Department of Neurology,Shandong Provincial Hospital*)

【Abstract】*Objective*:To explore the expression of LOX-1 (lectin like oxidizeol low density lipoprotein receptor-1,LOX-1) in aorta of atherosclerotic rabbits and modulating the effect of fluvastatin and Shexiang baoxin pill on the gene and protein expression of LOX-1. *Methods*:Tirty-two New Zealand white rabbits were randomly divided into four groups: hypercholesterol diet group (fed mth high cholesterol diet),hypercholesterol diet plus Fhevastatin group (fed with high cholesterol diet plus Fhe vastain 25mgl kgld),hypercholesterol diet plus shexiang Bao xin Pill group (fed with high cholesterol diet plus shegxiang Baoxinpill 25mgl kgld).normal diet gwup (fed mith regnlar chow),the protein expression of LOX-1 in aorta of rabbits were examined by immunohistochemsthy,the gene expresswin of LOX-1 in aorte of rabbits were examined by R7-PCK. *Results*:hypercholesterol diet group(fed with high cholesterol diet),hypercholesterol diet plus fluvastatin group(fed with high cholesterol diet plus Fluvastatin 25mg/kg·d), hypercholesterol diet plus Shexiang baoxin pill group(fed with high cholesterol diet plus Shexiang Baoxin Pill 25mg/kg·d), normal diet group (fed with regular chow),the protein expression of LOX-1 in aorta of rabbits were examined by immunohistochemistry,the gene expression of LOX-1 in aorta of rabbits were examined by RT-PCR. *Conclusion*:LOX-1 was expressed in rabbit aorta of hypercholesterol diet group and two treatment groups, expression of LOX-1 in two treatment groups both significantly reduced compared with hypercholesterol diet group($P<0.05$). *Conclusion*:The gene and protein expression levels of LOX-1 in aorta of atherosclerotic rabbits significantly increased in hypercholesterol diet group,and fluvastatin and Shexiang baoxin pill could strongly inhibit LOX-1 expression in aorta of atherosclerotic rabbits,which may play an important role in prevention of atherosclerosis.

【Key words】 Lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1;Atheroscleorosis;Fluvastatin;Shexiang baoxin pill

目前的研究认为动脉粥样硬化(Athe roscleorosis,AS)是一个以内皮细胞损伤为主,以炎症为特征的病理过程,故探讨内皮细胞功能的早期变化对探讨AS的发病机制有重要意义。近年来国外学者研究

作者介绍:朱 莉(1981-),女,硕士,研究方向:脑血管病。

通讯作者:黄 波,男,E-mail:dbsh 2004@163.com。

基金项目:山东省科技厅自然科学基金项目(编号:03Bs037)

发现:在人类内皮细胞上有一种能够摄取氧化型低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein,OX-LDL)的新型受体,此种受体被称之为植物血凝素样氧化低密度脂蛋白受体1(Lectin like OX-LDL receptor-1,LOX-1)。LOX-1能够促进内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞对OX-LDL的摄取及泡沫细胞的形成;促进活性氧的合成及促进炎性细胞的聚集,故目前认为LOX-1在AS的发生中起重要的作用[1,2]。

在有关动脉硬化的治疗中,目前认为中医药综合治疗是抗AS的重要基础,亦是治疗的方向。学者普遍认为他汀类药物是公认的抗AS药物,具有调脂、抗炎、抗血栓、改善血管内皮功能、稳定动脉粥样硬化斑块等作用。国内报道麝香保心丸亦具有保护内皮及抗AS作用[3,4],在临床研究中发现麝香保心丸对缓解冠心病、心绞痛症状亦具有良好疗效。为了探讨氟伐他汀及麝香保心丸对内皮的保护作用及机制,本研究通过建立兔AS模型,检测药物干预条件下AS血管LOX-1的表达,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 兔动脉粥样硬化模型的建立

32只新西兰大白兔先按常规饲料喂养1周,然后随机分为4组(n=8),单纯高脂饮食组、高脂饮食加氟伐他汀(25mg/(kg·d))组(简称氟伐他汀组)、高脂饮食加麝香保心丸(25mg/(kg·d))组(简称麝香保心丸组)及正常对照组。高脂饮食为除基础饲料喂养外,每天加胆固醇1g/每只,猪油10g/每只,饲养时间为4个月。

1.2 血脂测定

在试验结束前,于3组兔耳缘静脉取血,利用日本Olympus AU5400全自动生化分析仪及血生化测定试剂盒,测定总胆固醇(Total cholesterol,TC)及低密度脂蛋白(Low density lipoprotein,LDL)水平。

1.3 病理形态学观察及免疫组织化学染色

HE染色:取胸主动脉常规固定,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为0.4~0.5μm,做常规苏木素-伊红(HE)染色。

LOX-1免疫组织化学染色:主动脉石蜡切片经常规脱蜡和水化后,用1%的胰蛋白酶在37℃下消化20min,PBS洗3次,然后用3%的过氧化物酶浸泡20min,PBS洗3次,加一抗,4℃过夜,PBS洗3次,加酶标二抗,37℃作用30min,PBS洗3次,每次5min,加DAB显色,观察结果。然后用苏木素套染。常规脱水,甘油明胶封片。羊抗鼠LOX-1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司(sc-11653),LOX-1多克隆抗体的工作浓度为1:50。具体步骤参照试剂盒说明书。阴性对照片以PBS替代LOX-1多克隆抗体。

1.4 RT-PCR检测血管LOX-1mRNA表达

RT-PCR检测LOX-1 mRNA表达:取150mg左右兔胸主动脉剪碎加1ml Trizol并用匀浆器磨碎组织,按说明书操作一步法提取总RNA,取5μg总RNA按逆转录试剂盒的说明合成cDNA第一链。取定量cDNA模板(2μl)加入靶基因LOX-1的上下游引物,20μl体系行PCR反应。引物由济南博亚公司合成,LOX-1上游引物序列:5'-TTGACCTACCTACATCTGTCACC-3'下游:5'-CAAAGACCAACGAGCAATGA-3',PCR产物386bp;GAPDH上游引物序列:5'-GAGCTGAACGGGAAACTCAC-3',下游:5'-GGTCTGGGATGGA AACTGTG-3',PCR产物476bp。扩增条件:预变性94℃×5min,变性94℃×30s,退火 55℃×45s,延伸72℃×1min,30个循环后再72℃延伸10min,4℃终止。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,以GAPDH为内参照采用图像分析处理系统检测相对光密度。PCR反应条件为:94℃1min、58℃1min、72℃1min,共34个循环,最后72℃延长7min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫光灯下拍照,将凝胶电泳图像输入美国FluorChem TM9900凝胶成像分析系统,计算LOX-1与GAPDH扩增条带光密度值作为其相对表达强度。

1.5 统计学处理

实验数据以均数加减标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用SPSS13.0软件进行分析,多组间的均数比较用方差分析;两组间的均数比较用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血浆总胆固醇水平的变化

经4个月喂养,高脂组的血浆TC及LDL水平与氟伐他汀组及麝香保心丸组的相比,差别有统计学意义(P<0.05)(见表1)。

表1 4组血脂比较($\bar{x}\pm s$)

正常对照组	高脂饮食组	麝香保心丸组	氟伐他汀组
TC(mmol/L)	0.75±0.22	38.85±8.15*	27.64±3.70*
LDL(mmol/L)	0.44±0.04	14.05±1.18	10.29±2.15*

★P<0.05。

2.2 主动脉病理形态学改变

高脂饮食组兔主动脉管腔明显变窄,内膜明显增厚,脂质斑块弥漫,内有泡沫细胞大量积聚;氟伐它汀及麝香保心丸组管腔内径扩大,内膜增厚程度减小,泡沫细胞数目相对减少(见图1)。光镜下正常对照组兔内膜薄且结构完整。

2.3 高脂组、氟伐它汀组及麝香保心丸组内膜LOX-1蛋白的表达

棕黄色阳性颗粒主要出现在增厚的内膜中内皮细胞上。正常组未见LOX-1抗原表达,高脂饮食

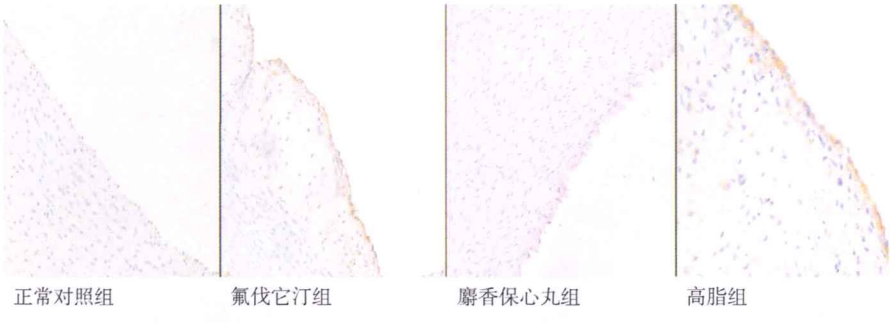
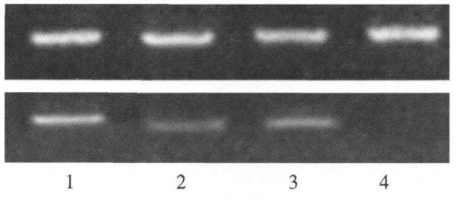


图1 高脂组、氟伐它汀组、麝香保心丸组及正常对照组LOX-1蛋白的表达(×20)

组LOX-1蛋白表达(23.35%±1.49%)明显增强,氟伐它汀(11.38%±1.29%)及麝香保心丸组LOX-1蛋白(16.39%±1.13%)表达较高脂饮食组明显减弱,棕黄色颗粒分布稀疏,差异有统计学意义($P<0.05$),说明氟伐它汀及麝香保心丸组均抑制LOX-1表达(见图1)。

2.3 主动脉LOX-1mRNA的表达

RT-PCR显示,对照组主动脉无LOX-1 mRNA的表达,高脂组光密度比值(1.36±0.12,$P<0.05$),而氟伐它汀组光密度比值(0.42±0.13,$P<0.05$)及麝香保心丸组(0.64±0.54),较高脂组明显下调($P<0.05$)(见图2)。



1.高脂组;2.氟伐它汀组;3.麝香保心丸组;4.正常对照组

图2 高脂组、氟伐它汀组、麝香保心丸组及正常对照组主动脉LOX-1mRNA表达

3 讨 论

目前的研究认为内皮损伤是AS的基础与前提,在AS的发生发展中起重要作用,故研究内皮损伤的早期发病机制对预防与治疗AS有重要意义。近年来国外学者的研究发现:在人类内皮细胞上有一种能够摄取OX-LDL的新型受体,此种受体属于C-类植物血凝素家族,被称之为LOX-1[5,6],此类受体的主要功能是介导血管内皮细胞摄取OX-LDL,进一步诱导氧自由基、内皮素-1及粘附分子的产生,导致内皮细胞功能损伤,故国外学者认为LOX-1的表达是血管内皮细胞出现功能异常的早期标志物,在AS发生中起重要作用[7,8];进一步研究还发现在AS血管的平滑肌细胞、巨噬细胞亦表达LOX-1,表明LOX-1的表达不仅在内皮细胞的激活中有意义,而且在巨噬细胞摄取脂质转变成泡沫细胞中亦起重要作用。

本研究发现,动脉粥样硬化兔中的LOX-1蛋白的表达明显增加,他汀类组及麝香保心丸组亦有LOX-1表达,但与高脂组相比,LOX-1表达较少,经统计学检验,有显著的差异。RT-PCR的结果显示,他汀类组及麝香保心丸组LOX-1mRNA的表达明显低于高脂组的水平。本文的研究表明氟伐它汀及麝香保心丸可下调LOX-1的表达,通过抑制LOX-1的产生而减少了内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞对OX-LDL的摄取,从而抑制泡沫细胞的形成,进而保护内皮功能及抑制AS的发生发展。

LOX-1的产生受多种因素的影响。国外研究发现高脂血症(尤其是OX-LDL升高)及血管紧张素Ⅱ均可诱导LOX-1的产生[9],并且其表达量的增加随着OX-LDL及AngⅡ浓度的增加而增加[10]。近年国外学者进行体外实验发现他汀类药物能够抑制OX-LDL诱导内皮细胞表达LOX-1及诱导内皮细胞产生粘附分子这一作用[11]。因此,推测他汀类及麝香保心丸抑制LOX-1表达的机制可能与其降脂、抗凝等多方面有关,至于其详细机制还有待于深入研究。

参 考 文 献

[1] Mehta JL,Li D.Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor[J]. J Am Coll Cardiol,2002;39(9):1429-1435.

[2] Murase T,Kume N,Kataoka H,et al.Identification of soluble

forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000;20(3):715-720.

[3] 洪永敦,吴 辉,赵 萍,等.麝香保心丸对颈动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2006;9:780-782.

[4] 罗心平,李 勇,范维琥,等.麝香保心丸减少高脂血症对动脉壁损害作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998;18:486-489.

[5] Hu B,Li D, Sawamura T,et al.Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;307(4):1008-1012.

[6] Chen M,Masaki T,Sawamura T.LOX-1,the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells:implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther,2002;95(1):89-100.

[7] Ruiz-Ortega M,Ruperez M,Esteban V,et al.Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury[J]. Curr Hypertens Rep,2003;5(1):73-79.

[8] Murase T,Kume N,Kataoka H,et al.Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(3):715-720.

[9] Chen M,Kakutani M,Naruko T.Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001;282:153-158.

[10] Li D,Saldeen T,Romeo F,et al.Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB[J]. Circulation,2000;102(16):1970-1919.

[11] Li D,Chen H,Romeo F,et al.Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells:role of LOX-1[J]. J Pharmacol Exp Ther,2002;302(2):601-605.

(上接第 26 页)

[4] Lewis BP,Burge CB,Bartel DP.Conserved seed pairing,often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell,2005;120(1):15-20.

[5] Kulshreshtha R,Davuluri RV,Calin GA,et al. A microRNA component of the hypoxic response[J]. Cell Death Differ,2008;15(4):667-671.

[6] Jeyaseelan K,Lim KY,Armugam A.MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke,2008;39(3):959-966.

[7] Chuang JC,Jones PA.Epigenetics and microRNAs[J].Pediatr Res,2007;61(b pt2):24R-29R.

(上接第 32 页)

参 考 文 献

[1] Adamchik Y,Frantseva MV,Weisspapir M,et al.Methods to induce primara and sec ondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain Res Brain Res Protoc,2000;5(2):153-158.

[2] Laake JH,Haug FM,Wieloch T,et al.A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence[J]. Brain Res Brain Res Protoc,1999;4(2):173-184.

[3] Gahwiler BH,Capogna M,Debanne D,et al.Organotypic slice cultures:a technique has come of age[J].Trends Neurosci,1997;20(10):471-477.

[4] Connelly CA,Chen LC,Colquhoum SD.Metabolic activity of cultured rat brainstem,hippocampal and spinal cord slices[J]. J Neurosci Methods,2000;99(1-2):1-7.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!