

● 实验研究 ●

心痛泰对动脉粥样硬化兔主动脉 NF- κ B 表达的影响任欣¹, 郭志华²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007;

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208)

[摘要] 目的: 观察心痛泰对动脉粥样硬化(AS)兔主动脉组织病理学改变和主动脉组织 NF- κ B 表达的影响。方法: 将120只新西兰大白兔随机分成6组, 分别为正常对照组、模型组(均灌胃等体积0.9%氯化钠注射液), 心痛泰低、中、高剂量组(分别灌胃心痛泰2.3g/kg、4.6g/kg、9.2g/kg), 阿托伐他汀钙组(灌胃阿托伐他汀钙1.1mg/kg), 每组20只。通过高脂饲料喂养及免疫反应损伤法制备兔AS模型, 造模的同时给予药物干预。8周后, 光学显微镜观察兔主动脉组织病理学改变; 采用Western bolt 法分别检测兔主动脉组织细胞核及细胞浆中 NF- κ B 的表达; 采用 RT-PCR 法检测兔主动脉组织 NF- κ B mRNA 的表达。结果: 与模型组比较, 各用药组主动脉内膜厚度变薄, 内膜下泡沫细胞及炎性细胞的浸润均有不同程度的减轻, 主动脉 NF- κ B 核转位及 NF- κ B mRNA 明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 心痛泰对 AS 兔主动脉组织有一定的保护作用, 通过下调 AS 兔主动脉组织 NF- κ B 核转位和 NF- κ B mRNA 表达, 抑制炎症反应, 从而延缓动脉粥样硬化的形成。

[关键词] 动脉粥样硬化; 心痛泰; 炎症反应; NF- κ B; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.11.062

**Effect of Xintongtai on the expression of nuclear factor - kappa
B in the aorta of rabbits with atherosclerosis**

REN Xin¹, GUO Zhi-hua²

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Xintongtai on pathological changes of the aorta and the expression of nuclear factor - kappa B (NF- κ B) in the aorta in rabbits with atherosclerosis (AS). Methods: A total of 120 New Zealand big-eared white rabbits were randomly divided into normal control group, model group (treated with an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage), low-, middle-, and high-dose Xintongtai groups (treated with Xintongtai at a dose of 2.3, 4.6, and 9.2 g/kg, respectively, by gavage), and atorvastatin calcium group (treated with atorvastatin calcium at a dose of 1.1 mg/kg by gavage), with 20 rabbits in each group. A rabbit model of AS was established by high-fat diet and immunoreactive injury, and drug intervention was given during modeling. After 8 weeks, a light microscope was used to observe the pathological changes of the aorta; Western blot was used to measure the expression of NF- κ B in nuclei and cytoplasm in the aorta; RT-PCR was used to measure the mRNA expression of NF- κ B in the aorta. Results: Compared with the model group, each administration group had a significant reduction in intimal thickness of the aorta, varying degrees of infiltration of foam cells and inflammatory cells in the intima, and significant reductions in nuclear translocation and mRNA expression of NF- κ B in the aorta ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: Xintongtai has a certain protective effect on the aorta of rabbits with AS and can delay the formation of AS by downregulating the nuclear translocation and mRNA expression of NF- κ B and inhibiting inflammatory response.

[Key words] atherosclerosis; Xintongtai; inflammatory response; nuclear factor - kappa B; experimental study

基金项目: 湖南省中医药科研项目(编号: 201516)

第一作者: 任欣, 女, 医师, 研究方向: 心脑血管疾病的防治

通讯作者: 郭志华, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 心脑血管疾病的防治, E-mail: guozhihua112@163.com

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 为基础的心脑血管疾病,发生率呈逐年增高的趋势,严重危害人类的健康^[1]。ROSS 在损伤反应学说的基础上明确提出“AS 是一种炎症性疾病”。核因子 NF- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种广泛存在于真核细胞内的基因多向性转录因子,活化的 NF- κ B 与炎症反应密切相关。研究表明^[2] 动脉粥样硬化病变斑块部位可见激活的 NF- κ B,而正常血管壁组织内仅检测到极微量或没有活性的 NF- κ B。另外,减少 NF- κ B 的活化,可抑制炎症相关因子表达,防止炎症反应产生不利后果^[3]。本研究采用高脂饲养加免疫损伤法建立 AS 兔动物模型,给予心痛泰进行干预观察主动脉病理组织结构,检测主动脉细胞质和细胞核 NF- κ B 蛋白和 NF- κ B mRNA 表达水平,探讨心痛泰防治 AS 的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 成年健康普通级新西兰兔 120 只,体质量 1.8~2.2kg,雄性,4 月龄,由湖南中医药大学实验动物中心提供。动物许可证号:SCXK(湘)2009-0012。单笼饲养,自由饮水,定时定量喂食,实验前适应性喂养 1 周。

1.2 药物及饲料 心痛泰由丹参、川芎、三七、郁金等中药组成,由湖南中医药大学附属一医院药剂科提供。制备过程:中药药材按照适当比例配置,加水提取 2 次。一煎加 8 倍量水提取 1.5h,二煎加 6 倍量水提取 1h,合并提取液,过滤、浓缩,微波真空干燥制成干浸膏,粉碎制粒,加适量糊精,制成颗粒后 60℃ 以下干燥整粒成成品。阿托伐他汀钙片(阿乐,每片 10mg,北京嘉琳药业股份有限公司生产,批准文号:国药准字 H19990258)。兔高脂饲料由湖南中医药大学动物实验中心加工,高脂饲料配方:15% 蛋黄粉,2% 胆固醇,5% 猪大油,0.5% 胆酸钠,77.5% 基础饲料。牛血清蛋白:每瓶 50g,美国 Roche 提供。卵清白蛋白:每瓶 10g,美国 sigma 提供。乌拉坦:山东齐鲁兴华制药有限公司生产,批准文号:国药准字 H37022259。

1.3 主要仪器和试剂 电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司,TP-2200B);全自动生化分析仪(日本东芝医疗株式会社,TBA-120FR);切片机(德国徕卡公司,RM2235);MIAS 图像分析仪(南京奥康仪器分析有限公司,KAMIA-SI)。苏丹红染色剂(广州纳特生物科技有限公司,SP1005);NF- κ B 兔多克隆抗核抗体(批号 BA6956)及 NF- κ B mRNA 试剂盒(批号 MK5174)均由武汉博士德生物工程有限公司提供。10% 甲醛、油红、石蜡、二甲苯、乙醇等试剂由湖南中医药大学病理学教研室提供。

2 实验方法

2.1 分组、造模及给药 120 只实验兔随机分为 6 组,分别为正常对照组,模型组,心痛泰低、中、高剂量组,阿托伐他汀钙组,每组 20 只。对除正常对照组外的其余组实验兔采用高脂喂养及免疫反应性损伤法制备动脉粥样硬化模型^[4-6]。家兔造模前基础饲料适应性喂养 1 周,在稳定其代谢状况后,正常对照组给予基础饲料喂饲,不进行任何处理。模型组以高脂饲料喂饲,耳缘静脉注射牛血清白蛋白,剂量按

体质量计算,125mg/kg,每 3d 1 次,共 3 次。同时皮下注射卵清白蛋白,剂量按体质量计算,2.5mg/kg,每 2d 1 次,共 5 次。造模第 1 天即开始高脂喂养和药物灌胃,灌胃剂量根据“兔-人的表面积公式”换算,心痛泰低、中、高剂量组及阿托伐他汀钙组分别为 2.3g/kg、4.6g/kg、9.2g/kg、1.1mg/kg,正常对照组和模型组灌服同等体积 0.9% 氯化钠注射液,每次 10mL/kg,各组均连续灌胃治疗 60d。

2.2 指标采集及检测 给药结束后,所有动物在 25% 乌拉坦 4mL/kg 耳缘静脉麻醉下,冰台无菌操作迅速取出主动脉弓下 2.5~4.0cm 的胸主动脉段,纵行剖开平摊,0.9% 氯化钠注射液冲洗后甲醛固定,用做 HE 染色。另取出主动脉组织后,用预备的冰 0.9% 氯化钠注射液对放在冰台上的主动脉进行冲洗,剪取部分主动脉组织放入冻存管保存,速放入 -80℃ 冰箱待检。

2.2.1 HE 染色观察兔主动脉组织病理学改变 取主动脉组织,4% 多聚甲醛固定组织 48h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明 4h,石蜡包埋,切片厚约 4~5 μ m,60℃ 温箱中烤片,HE 染色,在 400 倍光镜下观察主动脉的形态结构并采图。

2.2.2 Western blot 法检测兔主动脉组织细胞核及细胞质 NF- κ B 表达 细胞核蛋白与细胞质蛋白的提取,机械匀浆组织 60min,充分裂解,4℃ 15000r/min 离心 15min,取上清,Bradford 法测定蛋白质,制备 SDS-PAGE 浓缩胶与分离胶,上样,电泳,先 16mA/gel 电泳 15min,32mA/gel 电泳溴芬兰指示剂到达胶的底部时即停止,然后 0.2mA/cm²,转移 1、2、3h 进行转膜、封闭、配一抗、上一抗、上二抗,显影成像,分别计算 NF- κ B/H3, NF- κ B/GAPDH 比值。

2.2.3 RT-PCR 法测定主动脉 NF- κ B mRNA 表达 提取总 RNA;Trizol 抽提总 RNA,计测 OD 值,检测 RNA 的纯度及浓度并定量。逆转录合成 cDNA:配置逆转录反应体系(20 μ l),置于 PCR 仪中,37℃ 60min,85℃ 5min,4℃ 5min。合成的 cDNA -20℃ 冰箱中保存。引物设计与合成:GAPDH:上游 5'-CTCCTGCGACTTCAACAGTG-3';下游 5'-TGAGGGCTCTTACTCCTTGG-3'。NF- κ B:上游 5'-ATGCCAACATACTGCCTAACTG-3';下游 5'-CAATGCCTCCGATTGTGAAAC-3'。PCR 反应体系:配置逆转录反应体系(20 μ L),置于 PCR 仪中,95℃ 10min,94℃ 1min,60℃ 1min,95℃ 15sec,重复 40 次,然后 60℃ 15sec,4℃ 冰箱保存。琼脂糖凝胶电泳:扩增产物 12.5 μ L,电压 120V,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。数据采用仪器自带软件分析:ABI Prism 7300 SDS Software,计算 NF- κ B/GAPDH 的比值。

2.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间均数比较,符合正态性和方差齐性者,采取成组 t 检验;不符合者采取 Mann-Whitney U 检验。多个样本之间的均数若方差齐时选用 LSD 法;方差不齐时选用 Tamhane's T2。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 实验过程中正常对照组,模型组,心痛泰

低、中、高剂量组,阿托伐他汀钙组均有动物死亡,分别为 2、5、6、4、5、6 只。

3.2 心痛泰对主动脉病理组织的改变 HE 染色光镜下可见:正常对照组内膜是光滑而完整,内皮细胞连续紧密和完整的内膜下结构,未见有内膜的增厚及斑块形成。模型组内膜壁有不规则欠连续部分,明显增厚,形成较大斑块且突出管腔,斑块内可见大量体积大,圆形或椭圆形,胞质内含有小空泡的泡沫细胞,可见炎性细胞浸润。中膜被破坏,弹性纤维、平滑肌细胞排列疏松紊乱。心痛泰低剂量组内膜明显增厚形成斑块,可见泡沫细胞聚集及炎性细胞浸润,内膜破坏,与靠近内膜的部分中膜相融合。中膜内弹性纤维、平滑肌细胞排列较整齐。心痛泰中、高剂量组内膜增厚较模型组明显减轻,内膜下可见泡沫细胞聚集及炎性细胞浸润。内弹性膜未被破坏,中膜完整。阿托伐他汀钙组内膜稍增厚,内膜下可见少量泡沫细胞及炎性细胞浸润。内弹性膜未被破坏,中膜完整。(见图 1)

HE 染色结果表明:与正常对照组比较,模型组兔主动脉粥样斑块明显形成,内膜明显增厚,内膜下大量泡沫细胞聚集及炎性细胞浸润,符合 AS 病理学改变,说明高脂饲料饲养加免疫损伤方法造模 AS 兔成功。治疗后,与模型组比较,各用药组内膜增厚的厚度,及内膜下泡沫细胞聚集和炎性细胞浸润均有不同程度的减轻。

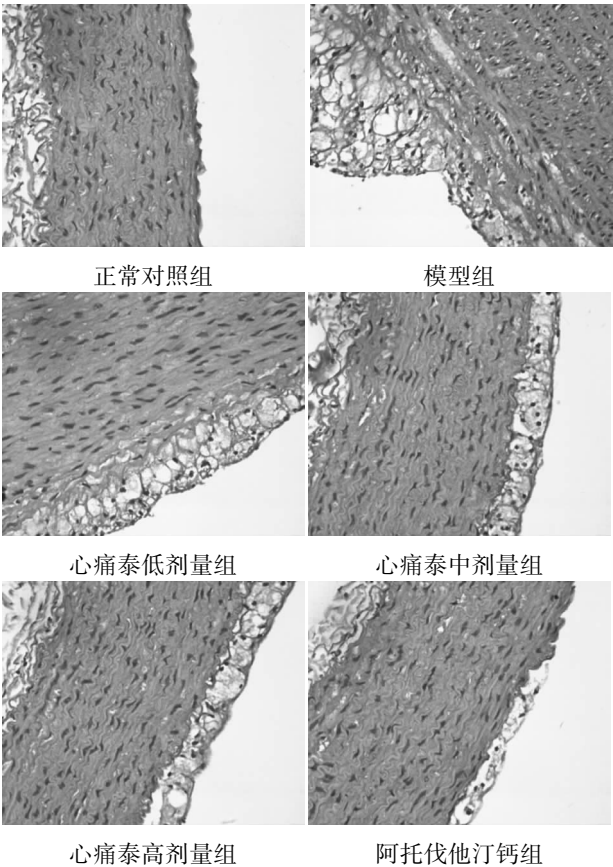


图 1 主动脉病理组织改变(HE 染色×400)

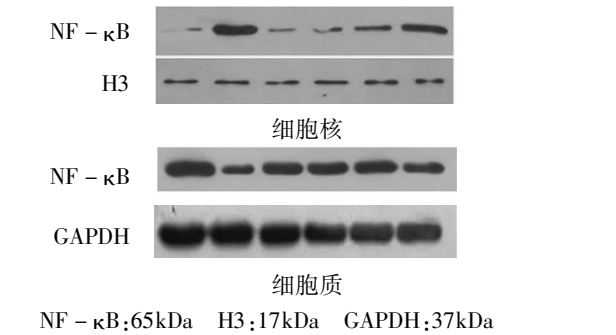
3.3 心痛泰对兔主动脉细胞核、细胞质 NF-κB 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组主动脉细胞核 NF-κB 蛋白表达增加,差异有统计学意义;与模型组比较,各治疗组细胞核 NF-κB 蛋白表达均降低;与心痛泰低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组及阿托伐他汀钙组细胞核 NF-κB 蛋白表达降低明显,差异均有统计学意义。与正常对照组比较,模型组主动脉细胞质 NF-κB 蛋白表达降低,差异有统计学意义;与模型组比较,各治疗组细胞质 NF-κB 蛋白表达均增加;与心痛泰低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组与阿托伐他汀钙组细胞质 NF-κB 蛋白表达增多明显,差异均有统计学意义。(见表 1、图 2)

主动脉细胞质 NF-κB 蛋白水平显著减少的同时伴随细胞核 NF-κB 蛋白水平显著增加,提示 NF-κB 核转位。以上数据表明:与正常对照组相比,模型组主动脉 NF-κB 核转位明显增加;与模型组比较,低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组 NF-κB 核转位明显减少;与低剂量组比较,中、高剂量组和阿托伐他汀钙组 NF-κB 核转位明显减少。

表 1 心痛泰对兔主动脉细胞核、细胞质 NF-κB 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞核	细胞质
正常对照组	18	0.52 ± 0.07	0.89 ± 0.05
模型组	15	1.17 ± 0.10 ^a	0.38 ± 0.06 ^a
心痛泰低剂量组	14	1.09 ± 0.14 ^b	0.43 ± 0.05 ^b
心痛泰中剂量组	16	0.76 ± 0.09 ^{cd}	0.68 ± 0.08 ^{cd}
心痛泰高剂量组	15	0.74 ± 0.07 ^{cd}	0.70 ± 0.07 ^{cd}
阿托伐他汀组	14	0.69 ± 0.09 ^{cd}	0.73 ± 0.08 ^{cd}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与心痛泰低剂量组比较,^d $P < 0.01$ 。



从左至右依次为:正常对照组、模型组、阿托伐他汀钙组、心痛泰高剂量组、心痛泰中剂量组、心痛泰低剂量组

图 2 细胞核、细胞质、NF-κB 的蛋白表达

3.4 心痛泰对兔主动脉 NF-κB mRNA 表达的影响 与正常对照组比较,模型组主动脉 NF-κB mRNA 表达增加,差异有统计学意义;与模型组比较,各治疗组 NF-κB mRNA 表达均降低;与低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组及阿托伐他汀钙组 NF-κB mRNA 表达降低明显,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 心痛泰对兔主动脉 NF- κ B mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF- κ B mRNA
正常对照组	18	0.0009 $\pm$ 0.0003
模型组	15	0.0052 $\pm$ 0.0011 ^a
心痛泰低剂量组	14	0.0040 $\pm$ 0.0008 ^b
心痛泰中剂量组	16	0.0023 $\pm$ 0.0007 ^{cd}
心痛泰高剂量组	15	0.0015 $\pm$ 0.0002 ^{cd}
阿托伐他汀组	14	0.0015 $\pm$ 0.0003 ^{cd}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与心痛泰低剂量组比较,^d $P < 0.01$ 。

4 讨 论

动脉粥样硬化是以血管平滑肌细胞增生和脂质在粥样硬化斑块沉积为特征的血管病变^[7]。炎症学说是 AS 发病机制的重要学说之一。AS 斑块中不仅富含脂质,而且有大量单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等炎症细胞的广泛浸润。

NF- κ B 参与多种基因的转录调控作用,而且与免疫应答、炎症反应及细胞的增生、转化和凋亡等疾病生理过程紧密相关^[8]。在静息状态时,NF- κ B 与抑制蛋白 κ B(Inhibit kappa β , I κ B)结合成三聚体以无活性形式在胞浆内。当肿瘤坏死因子- α 、白介素-1 等致炎因子或细菌产物如脂多糖等作用下,激活 I κ B 激酶使胞浆内无活性的三聚体中的 I κ B 磷酸化,磷酸化的 I κ B 则被水解从三聚体中解离下来,活化后的 NF- κ B 二聚体从胞浆转移到细胞核内与不同 DNA 位点相结合,来调控不同的基因表达。活化后的 NF- κ B 促进靶基因如黏附分子、促炎因子、趋化因子、生长因子、氧自由基、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等因子转录^[9]。趋化因子和黏附分子参与了单核细胞与血管内皮细胞黏附,并向内皮下迁移。炎症介质及生长因子的介导了血管壁炎症反应及平滑肌细胞增殖向内膜移行。M-CSF 介导单核细胞向巨噬细胞分化,MMP-9 介导细胞外基质的降解,激发形成了 AS 的过程。

中医药针对动脉粥样硬化的不同病理环节同时发挥作用,包括血管内皮保护作用及抗炎等方面^[10]。心痛泰颗粒针对气滞血瘀这一主要病机组方,由丹参、川芎、三七、枳壳、葛根组成。其中丹参活血化瘀,合有“血中气药”之称的川芎活血行气共为君药,三七助丹参活血化瘀为臣药。佐以风药葛根辛散宣畅,枳壳破气下行、一升一降共调气机共为佐药。诸药配伍,瘀血散,气机畅,全方共奏理气活血化瘀之效。气滞血瘀贯穿整个动脉粥样硬化形成过程中,治瘀以理气为先。

本研究结果显示,通过光镜下对家兔主动脉组织结构进行观察,从病理形态学的角度说明心痛泰组均能不同程度改善主动脉组织损伤程度。心痛泰组有效上调主动脉细胞质 NF- κ B 蛋白表达,下调细胞核 NF- κ B 蛋白及 NF- κ BmRNA 表达水平,且差异具有统计学意义。说明心痛泰组均能下调主动脉 NF- κ B 核转位和 NF- κ BmRNA 表达水

平,且中、高剂量组优于低剂量组。心痛泰颗粒可能通过改善主动脉组织病理形态结构,下调主动脉 NF- κ B 核转位和 NF- κ BmRNA 表达水平,抑制炎症反应,而防治 AS。但 AS 的发病机制复杂,本实验只通过 NF- κ B 这一主要指标进行相关研究,只能表明 AS 的某一可能机制,尚不能全面解释 AS 炎症反应的发生机制及心痛泰的干预机制。在 AS 的发病机制研究中,应逐步深入到 NF- κ B 的上下游指标和其交叉通路,选取全面又具有密切相关性的指标,可综合全面解释 AS 的发病机制。

参考文献

- [1] 王鹏,修春红,王岚峰. 颈动脉粥样硬化与心脑血管疾病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(11):1175-1178.
- [2] Morita M, Yano S, Yamaguchi T, et al. Advanced glycation end products-induced reactive oxygen species generation is partly through NF- κ B activation in human aortic endothelial cells[J]. J Diabetes Complications, 2013, 27(1):11-15.
- [3] 王晓晨,吉爱国. NF- κ B 信号通路与炎症反应[J]. 生理科学进展, 2014, 45(1):68-71.
- [4] 王园园,龙民慧,周磊磊,等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物学, 2008, 25(3):18-21.
- [5] 石晓理,郁保生,吕瑶,等. 四逆汤对实验性高脂血症合并动脉粥样硬化兔高、低密度脂蛋白及载脂蛋白 Apo-A, B 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1):295-299.
- [6] 刘吉勇,朱惠斌,陈懿,等. 脑泰方对家兔动脉粥样硬化模型血脂及血管形态学的影响[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2011, 19(3):267-270.
- [7] 李玉林. 病理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:115.
- [8] 薛剑,周忠光,姜波,等. 补阳还五汤对 AD 大鼠海马区 NF- κ B P65 mRNA 基因表达的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(3):36-38.
- [9] 黄文林,朱孝峰. 信号转导与疾病[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:470.
- [10] 秦合伟,刘萍. 中医药抗动脉粥样硬化作用机制的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(9):1107-1109.

(收稿日期:2018-05-21)

冬令养生——情绪

冬令养生的情绪需平和畅达。冬宜“藏”,即神藏于内,力求精神安宁,遇事节怒,宠辱不惊。冬季万物凋零,且光照时间短,褪黑激素分泌增强,容易让人出现情绪低落或抑郁,可适当晒晒太阳,光照可抑制此激素的分泌,或者与友人倾诉,可以消除烦闷和低落的情绪。切忌情绪激动,避免争吵,因为生气动怒容易肝气郁结,对心脏有明显的负面影响,尤其有心脑血管疾病者要注意保持情绪平和,可根据自身状况选择愉悦身心的活动,如听音乐、养花等。(http://www. cntcm. com. cn/yskp/2018-11/13/content_52579. htm)