

实验研究

补肾法对去势兔动脉粥样硬化原代培养平滑肌细胞凋亡及血小板源生长因子 A mRNA 等表达的影响

何春燕¹ 傅晓东² 陈伟华² 许得盛² 王文健²

摘要 目的:观察补肾煎对去势兔动脉粥样硬化原代培养平滑肌细胞凋亡及血小板源生长因子 A(PDGF-A) mRNA 与单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) mRNA 表达的影响。方法:新西兰雌兔随机分为 A 组(卵巢切除)、B 组(未切除卵巢)、C 组(卵巢切除+补肾煎),均予高脂饮食并注射胎牛血清蛋白,造成动脉粥样硬化模型。同时 C 组予补肾煎,12 周后检测相关指标。结果:C 组培养平滑肌细胞凋亡率高于 A 组、B 组,PDGF-A mRNA 及 MCP-1 mRNA 在 A 组、C 组的表达明显高于 B 组($P < 0.01$),而在 C 组的表达又显著低于 A 组($P < 0.01$)。结论:补肾煎可能通过增加血管平滑肌细胞的凋亡、降低 PDGF-A mRNA 及 MCP-1 mRNA 的表达而减轻去势兔动脉粥样硬化的形成。

关键词 动脉粥样硬化/中医药疗法 细胞凋亡/药物作用 补肾

Effects of Kidney-Tonifying Method on Apoptosis and Expressions of PDGF-A mRNA and MCP-1 mRNA in Aorta Primary Cultured Smooth Muscular Cells of Atherosclerosis in the Ovariectomized Rabbit

He Chunyan, Fu Xiaodong, Chen Weihua, et al.

(Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fudan University, Shanghai 200040)

Objective: To observe effects of Bushen Decoction on apoptosis of primary cultured smooth muscular cells and expressions of platelet derived growth factor-A (PDGF-A) mRNA and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA. **Methods:** New Zealand female rabbits were randomly divided into group A (ovariectomy), group B (ovary not removed) and group C (ovariectomy plus Bushen Decoction). They were all given high fat forage and injection of bovine serum protein to develop model of atherosclerosis. At the same time, Bushen Decoction was given to group C. The relative indexes were detected 12 weeks later. **Results:** The apoptosis rate of smooth muscular cells in group C was higher than those in group A and B; The expressions of PDGF-A mRNA and MCP-1 mRNA in group A and C were higher than those in group B ($P < 0.01$), and in group C was significantly lower than that in group A ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bushen Decoction can reduce formation of atherosclerosis in ovariectomized rabbit by increasing apoptosis of vascular smooth muscular cells and down-regulating expressions of PDGF-A mRNA and MCP-1 mRNA.

Key Words Atherosclerosis/TCM therapy; Apoptosis/drug effect; Tonifying the kidney

绝经后女性动脉粥样硬化(AS)的发生发展与绝经前后机体内分泌环境的变化密切相关。本实验室通过对切除卵巢的新西兰兔喂饲高脂饮食并注射胎牛血清蛋白,制成去势兔动脉粥样硬化动物模型^[1],在此基础上研究补肾法对血管平滑肌细胞(VMSC)凋亡及其相关因子血小板源生长因子 A(PDGF-A) mRNA、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1) mRNA 表达水平的影响,以期中医药防治女性绝经后动脉粥样硬化的实践提供依据。

1 材料

1.1 实验动物:纯种新西兰雌兔 27 只,3 月龄,体重 1.5~2.0 kg,由中国科学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂:DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、Trizol Reagent、M-MLV 逆转录酶(美国 Gibco 公司),原位细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),dNTP、pGEM-T Easy Vector System (Pharmacia 公司),总 RNA 抽提试剂盒(Qiagen 公司)。

1.3 主要仪器:透射电镜(JEM-1200EX)、美国 Becton Dickinson 公司流式细胞仪(FACSCalibur)、PE Biosystems U. S. A GeneAmp 5700 Sequence Detection Systems。

1.4 药物:自拟补肾煎,主要成分:熟地黄 10g,泽泻 10g,菟丝子 10g,枸杞子 10g,葛根 10g,何首乌 10g,淫羊藿 10g 等,由复旦大学附属华山医院制剂室制备成浓缩液,含生药 2.5 g/ml。

2 方法

2.1 动物模型的建立及分组:实验兔经过 1 周适应性喂养后随机分为 3 组,A 组(模型组)行双侧卵巢切除术,并每日自来水 4 ml · kg⁻¹ · d⁻¹灌胃;B 组(对照组)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30272664)

1 复旦大学中西医结合研究所 2002 级硕士研究生,上海市乌鲁木齐中路 12 号(200040)

2 复旦大学中西医结合研究所

收稿日期:2004-02-26;修回日期:2004-05-11

行伪手术(在卵巢周围切取一小块脂肪组织),余同模型组;C 组(治疗组)于双侧卵巢切除后同时以补肾煎 $4\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。各组给予高脂饲料(胆固醇 1%、胆酸 0.5%、猪油 5%、基础饲料 93.5%)饲养 12 周,并分别于去势后 1、5、9 周静脉注射胎牛血清白蛋白 $0.25\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。饲养过程中模型组因腹泻死亡 1 只,治疗组死亡 2 只。

2.2 血管平滑肌细胞培养:取粥样硬化主动脉血管中膜组织以“酶消化法”^[3]进行,消化结束后,将酶液稀释、离心、去上清,重悬沉淀,置培养瓶中,追加 DMEM、胎牛血清,调节 pH 值至 7.2~7.4,置 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育,2~3 天换培养液 1 次。一般 7~8 天后细胞萌出,15 天左右长成致密单层,置倒置相差显微镜下摄片。

2.3 细胞凋亡检测

2.3.1 电镜观察:收集细胞,PBS 重悬,琼脂糖凝胶包埋,离心后固定,钨酸染色制片,电镜下观察细胞形态。

2.3.2 流式细胞仪检测:同上法收集细胞,采用双激光流式细胞仪定量测定细胞凋亡的百分数^[4]。

2.3.3 TUNEL 法检测:取胸主动脉中膜组织切开,固定、包埋、切片、铁苏木染色,按细胞凋亡检测试剂盒说明书测定。

2.4 PDGF-A mRNA 的荧光实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测及 MCP-1 mRNA 的荧光定量 PCR 检测

2.4.1 RNA 制备:取原代培养平滑肌细胞,加入 Trizol Reagent 裂解,提取 RNA,测定样品在波长 260nm、280nm 的紫外吸光度值,要求比值 ≥ 2.0 ,计算 RNA 含量。

2.4.2 cDNA 的合成:使用 Superscript TM II 反应体系,取 Oligo-dT $1\mu\text{l}$ 、总 RNA $0.5\mu\text{g}$ 、 $40\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNasin $1.0\mu\text{l}$ 、Omniscript 逆转录酶 $1\mu\text{l}$,42℃55min,70℃15min 灭活逆转录酶。

2.4.3 引物设计:在 GenBank 检索兔的 PDGF-A 链的基因序列,使用 Primer Express 软件设计引物序列: CAC CCC TGT ACA TGC ACA CCA TTG TTT CA,在 5' 端标记上荧光发光基团 FAM,3' 端标记上荧光淬灭基团 TAMRA。MCP-1 的引物设计同上,序列如下: CAC CAA CAA GAC CAT CTC AGT GAA GAG GTC。

2.4.4 定量阳性模板克隆:PCR 产物纯化后用 T4 DNA 连接酶将目的基因片段与 T vector 相连接,然后转化 E. coli DH5 α 感受态细胞,抽提、纯化重组质粒 pMT-PDGF、pMT-MCP-1。

2.4.5 荧光实时定量:PCR 检测 PDGF-A mRNA,方

法同文献^[5]。

2.4.6 荧光定量:PCR 检测 MCP-1 mRNA,方法同上。

2.5 统计学方法:采用 SAS 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、Spearman 相关分析。

3 结果

3.1 细胞凋亡检测结果

3.1.1 凋亡细胞的形态观察:电镜下可见发生凋亡的平滑肌细胞出现核染色质边集、凝集及核碎裂。可见粗面内质网膜上均匀分布着的核糖体颗粒,线粒体的形态保持完整,最后细胞膜内陷,将细胞分割为多个膜包裹性的凋亡小体。

3.1.2 原位末端标记:表 1 示,经 TUNEL 染色,凋亡细胞的核为棕褐色,体积缩小,致密的染色质边集,断裂成核碎片,形成膜包裹性的凋亡小体。治疗组 TUNEL 染色阳性的比例明显高于模型组及对照组 ($P < 0.05$),但模型组和对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 3 组兔动脉平滑肌细胞凋亡检测比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	TUNEL 法	流式细胞仪检测
模型组	8	3.82 ± 0.46	7.13 ± 0.67
对照组	9	4.20 ± 0.54	11.57 ± 2.89
治疗组	7	$7.71 \pm 1.32^{* \Delta}$	$15.45 \pm 1.50^{* \Delta}$

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3.1.3 流式细胞仪检测:PI 染色后发现,在正常的二倍体峰前出现亚二倍体的程序化死亡峰。治疗组 PI 染色阳性的比例高于模型组和对照组 ($P < 0.05$),模型组和对照组之间亦有明显差异 ($P < 0.05$)。

3.2 PDGF-A mRNA 定量测定结果:表 2 示,稀释起始模板,得到不同标准模板数量级,与反转录物同时进行 PCR 检测,将阈值循环数(Ct 值)与不同浓度的定量模板的对数拟合作图,得到一条定量标准曲线,相关系数 $r = 0.99$ 。模型组、治疗组兔 VSMC 的 PDGF-A mRNA 表达较对照组显著升高 ($P < 0.01$),而治疗组较模型组显著减少 ($P < 0.01$)。

表 2 3 组兔培养 VSMC 中 PDGF-A mRNA、MCP-1 mRNA 的定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	PDGF-A mRNA 平均拷贝数(μg RNA)	MCP-1 mRNA 平均拷贝数(μg RNA)
模型组	8	$5.08 \times 10^4 \pm 1.53 \times 10^4$	$2.51 \times 10^3 \pm 0.66 \times 10^3$
对照组	9	$0.31 \times 10^4 \pm 0.09 \times 10^4$	$0.29 \times 10^3 \pm 0.09 \times 10^3$
治疗组	7	$2.37 \times 10^4 \pm 0.73 \times 10^4$	$1.43 \times 10^3 \pm 0.35 \times 10^3$

与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3.3 MCP-1 mRNA 定量测定结果:表 2 示,标准曲线和线性范围设定同上。模型组、治疗组兔 VSMC 的 MCP-1 mRNA 表达较对照组显著增加 ($P < 0.01$),而

治疗组较模型组显著减少($P < 0.01$)。

4 讨论

采用雌激素替代疗法(HRT)防治女性绝经后 AS 已受到了越来越多的质疑^[6],随着临床病例的显著增加,中医学独特的防治作用日益受到重视。但传统中医对于冠心病的治疗多集中在活血化瘀、芳香化浊等方面,而我们认为女性在围绝经期前后,由于肾气衰退,精血不足,阴阳失调等所致的冠心病的发生与雌激素水平低下密切相关,其所表现的一系列生理病理改变均可责之于肾之虚衰。因此本病的病位虽在心,而其本却在肾,治疗应以补肾精、益气血为主,治病求本。本实验通过补肾煎对血管平滑肌细胞(VSMC)凋亡影响的观察,以证实补肾法在防治女性绝经后 AS 方面的作用及其机制。

VSMC 过度增殖是 AS 形成的重要步骤,主要与增殖和(或)凋亡率下降有关。诱导细胞凋亡可相对抑制 VSMC 的增殖。本实验通过对凋亡细胞的观察,发现各组培养细胞中均存在符合形态学变化的凋亡细胞,说明细胞凋亡作为一种生理性死亡形式在正常的血管中同样存在,对调节 VSMC 的数目起着不可缺少的作用^[7],且模型组的细胞凋亡较对照组有增高的趋势,说明在 AS 形成过程中虽然 VSMC 的凋亡率有所升高,但正常的凋亡受到抑制或相对抑制(表现为细胞增生过度),使 VSMC 的增生超过凋亡,从而导致疾病的发生^[8]。治疗组的细胞凋亡率较模型组显著提高,提示补肾法可以通过增加 VSMC 的凋亡以抑制去势后 AS 的程度。

去势后 AS 的形成与细胞因子、原癌基因等很多因素有关。血小板源生长因子(PDGF)是与 AS 形成关系极为密切的一种细胞有丝分裂原。在 AS 病变组织中 PDGF 明显表达异常,它可促进动脉中膜平滑肌细胞迁移和内膜增殖、分泌,对血管平滑肌有收缩作用,特别对粥样硬化血管的收缩作用更强^[9]。PDGF 能产

生 3 种异构体(AA、AB、BB),VSMC 主要产生 PDGF-AA。血管壁分泌的单核细胞趋化蛋白(MCP-1)是针对单核细胞作用极强的趋化性分子,在介导单核细胞浸润动脉壁过程中起主要作用,与 AS 关系密切^[10]。VSMC、内皮细胞及巨噬细胞均可表达 MCP-1。本实验发现,补肾煎可明显降低粥样硬化动脉 VSMC 的 PDGF-A mRNA 及 MCP-1 mRNA 的表达水平,说明补肾法可通过下调 PDGF-A mRNA、MCP-1 mRNA 的转录水平,抑制生长因子释放,调节 VSMC 的增殖和凋亡,干预去势后 AS 的发生、发展,但其进一步的作用机理还有待于探讨。

参考文献

- 1 王文健,费震宇,傅晓东,等.家兔绝经后动脉粥样硬化模型的建立及补肾治疗对其的影响.中西医结合学报,2003,1(2):113-115.
- 2 傅晓东,王文健,陈伟华,等.补肾煎对去势兔动脉粥样硬化血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响.上海中医药杂志,2002,36(6):6-8.
- 3 Diglio CA, Grammas P, Giacomelli F, et al. Rat heart-derived endothelial and smooth muscle cell cultures: isolation, cloning and characterization. Tissue Cell, 1988, 20(4): 477-492.
- 4 Hotz MA, Gong J, Traganos F, et al. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. Cytometry, 1994, 15(3): 237-244.
- 5 费震宇,王文健,关明,等.雌激素对绝经后动脉粥样硬化模型 ET 水平及内皮细胞 ET-1 mRNA 表达的影响.复旦学报(医学版),2002, 29(5): 354-356.
- 6 Manson JE, Hsia J, Johnson KC, et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. N Engl J Med, 2003, 349(6): 523-534.
- 7 Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis. Exp Gerontol, 2001, 36(7): 969-987.
- 8 Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. Cardiovasc Res, 1999, 41(2): 361-368.
- 9 Faxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. Prog Cardiovasc Dis, 1997, 40(2): 129-140.
- 10 Lamb DJ, Avades TY, Ferns GA. Endogenous neutralizing antibodies against platelet-derived growth factor- α inhibit atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(6): 997-1003.

欢迎邮购《中华本草图库》、电子版《医方类聚》

《中华本草图库》收录中草药 7623 种,每种药材均有别名、来源、形态、采收、化学成分、毒性、用法用量等多个项目的说明,并配有图片、图文并貌,一目了然,其中有 2279 种还配有彩色图片,这是目前市场上收录最全的中草药光盘。邮购价:98.00 元,免收邮费。

《医方类聚》系朝鲜金礼蒙等收辑 150 余种中国明代以前医籍分类汇编而成,此书在朝鲜早已散失,约 1852 年,日本丹波元坚将自己收藏的此书残本,请人参考诸书加以补入,即江户学训堂本。《医方类聚》全书约 950 万字,分为九十门,收方 50000 余个,此书旁征博引历代医学典籍,兼收传记及道藏佛书中有关医药的部分,因此内容极为丰富,对研究整理中华传统医学具有很高的参考价值。《医方类聚》一书篇幅巨大,因而价格昂贵,限制了许多中医工作者接触这一医学经典,有鉴于此,嘉鸿科技以江户学训堂本为底本,聘请专业人士点校,推出了电子版《医方类聚》。

电子版《医方类聚》以电脑为使用平台,可实现全文检索、拷贝粘贴、打印,轻点鼠标,信息便历历在目。邮购价:248.00 元,免收邮费。文字版本:简体中文和繁体中文,运行环境:简体 Windows98/2000/XP 或繁体 Windows98/2000/XP

邮购地址:北京中医药大学 37 信箱,邮编:100029,收款人:李明江,电话:64287550, 66517368

欢迎光临中国医学图书网: <http://www.chinamedbook.com>