

[文章编号] 1007-3949(2009)17-10-0797-05

• 实验研究 •

# 脉心康对平滑肌细胞源性泡沫细胞过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ 与腺苷三磷酸结合盒转运体 1 mRNA 表达的影响

郑广娟<sup>1,2</sup>, 朱莹<sup>1,2</sup>, 王婷<sup>1,2</sup>, 张文高<sup>3</sup>

(1. 广东省中医院, 广东省广州市 510120 2. 广东省中医药科学院, 广东省广州市 510006

3. 山东中医药大学, 山东省济南市 250014)

[关键词] 脉心康; 血管平滑肌细胞源性泡沫细胞; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ ; 腺苷三磷酸结合盒转运体 A1; 原位杂交

[摘要] 目的 观察脉心康干预大鼠血管平滑肌细胞源性泡沫细胞中过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 、腺苷三磷酸结合盒转运体 A1(ABCA1)mRNA 表达变化, 以探讨脉心康对动脉粥样硬化泡沫化细胞形成的可能调控机制。方法 用组织块培养法培养大鼠血管平滑肌细胞, 以氧化型低密度脂蛋白使其泡沫化, 并以脉心康、罗格列酮分别干预。采用原位杂交技术观察过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 、腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 mRNA 表达变化。结果 脉心康与罗格列酮均能提高过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 、腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 mRNA 表达, 与生理盐水组、空白对照组相比, 均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 脉心康组优于罗格列酮组 ( $P < 0.01$ )。结论 脉心康具有与罗格列酮相似的过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动作用, 且优于罗格列酮。其抗动脉粥样硬化作用的分子机制与过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  调控途径有关, 有望成为中医药领域中新的、特异性较高的过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂, 为抗动脉粥样硬化和脂代谢异常提供更佳的药物选择。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

## Effect of Maixinkang on PPAR $\gamma$ and ABCA1 mRNA in Vascular Smooth Muscle Cells-derived Foam Cells in Rats

ZHENG Guang-Juan<sup>1,2</sup>, ZHU Ying<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>1,2</sup>, and ZHANG Wen-Gao<sup>3</sup>

(1. Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510120 2. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

[KEY WORDS] Maixinkang Vascular Smooth Muscle Cells-derived Foam Cells Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  ATP-binding Cassette Transporter A1 Hybridization in Situ

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Maixinkang on peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) derived foam cells to approach Maixinkang possible regulation mechanism for atherosclerosis (As) foam cells. **Methods** The cultured VSMCs were loaded with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and intervened by Maixinkang and Rosiglitazone. The expressions of PPAR $\gamma$  and ABCA1 mRNA were detected with hybridization in situ. **Results** Maixinkang and Rosiglitazone could raise PPAR $\gamma$  and ABCA1 mRNA, which were significant different to that in the isotonic Na chloride group and the blank group. Moreover, Maixinkang had difference with Rosiglitazone. **Conclusions** Maixinkang have effect of exciting PPAR $\gamma$  ( $P < 0.01$ ), it is surpass to Rosiglitazone ( $P < 0.01$ ). The molecule mechanism of antiatherosclerosis is related with the channel of regulating PPAR $\gamma$ . As a new and higher specificity PPAR $\gamma$  excitatory, Maixinkang is anticipated to supply more effective treatments for antiatherosclerosis and lipid anomaly metabolism.

核受体过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )是目前动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)研究中的热点之

一。PPAR $\gamma$ 属于核受体超家族中 PPAR 家族的成员,是配体依赖性的转录因子,在调节脂质代谢、脂肪细胞分化和能量代谢中起关键性作用。现已公认 As 为一类动脉壁退行性病理变化,其发生发展过程包括多个环节,如血管内皮损伤、脂质浸润、单核及淋巴细胞浸润、免疫反应、平滑肌细胞及细胞外基质增殖、血栓形成等。该病变的特征性病理变化之一为动脉壁内皮下堆积许多富含脂质的巨噬细胞源性和平滑肌细胞源性泡沫细胞。平滑肌细胞泡沫化细胞形成可以说是 As 发生的第一步。平滑肌细胞通

[收稿日期] 2009-08-14 [修回日期] 2009-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (30472275)

[作者简介] 通讯作者郑广娟,博士,教授,研究方向为中西医结合治疗心血管系统疾病及肿瘤的基础和临床,Email为 zhengguangjuan@163.com。朱莹,博士,研究方向为中西医结合治疗心血管疾病,Email为 debora\_407@163.com。王婷,硕士,研究方向为中西医结合治疗肿瘤,Email为 wangting109@26.com。

过清道夫受体途径,摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized-low density lipoprotein, ox-LDL),导致细胞内大量胆固醇酯积聚。近年研究表明,PPAR $\gamma$ 可能通过其活化后对下游靶基因腺苷三磷酸结合盒转运体A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)转录水平调控及相关细胞因子的释放来影响As泡沫化细胞的形成。本研究在既往研究证实脉心康胶囊对As临床及实验干预效果肯定的基础上,结合最新As研究进展,通过应用原位杂交技术观察具有活血化痰降浊功效的脉心康胶囊及罗格列酮(PPAR $\gamma$ 合成配体)干预大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)泡沫化过程的PPAR $\gamma$ 、ABCA1 mRNA表达,从分子细胞水平探讨脉心康干预大鼠VSMC源性泡沫化细胞形成的可能调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

体重150 g左右SD大鼠2只,雌性;体重200 g左右SD大鼠15只,雄性。

### 1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基(美国GIBCO公司),胎牛血清(杭州四季青公司),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(北京鼎国公司),0.25%胰酶(北京索莱宝公司), $\alpha$ -SM-action(mouse anti- $\alpha$ -smooth muscle action)(武汉博士德公司),FITC标记的羊抗兔IgG(北京中杉公司),ox-LDL(北京协和公司),脉心康(济南孟氏生物科技研究所有限公司生产,由人参皂苷、银杏叶提取物、茶多酚及降脂红曲组成,胶囊剂型,每粒0.25 g)含药血清,罗格列酮(天津葛兰素史克公司)含药血清,PPAR $\gamma$ 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德公司)、ABCA1原位杂交试剂盒(武汉博士德公司)。

### 1.3 主要仪器

气体培养箱(贺利氏BB5060),超净工作台(苏州佳宝公司),恒温杂交箱(美国PE公司),倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司)。

### 1.4 含药血清的制备

参照杨奎等<sup>[1]</sup>与徐海波等<sup>[2]</sup>方法,将体重200 g左右SD大鼠15只,分为3组,每组5只。按照成人用药量7.5倍给药灌胃,脉心康组给予脉心康每只每天0.06 g,罗格列酮组给予罗格列酮每只每天0.1 g,生理盐水组给予生理盐水每只每天3 mL,灌胃5天后,末次灌胃1 h后取血制备含药血清。

### 1.5 平滑肌细胞的培养及鉴定

参照徐正云等<sup>[3]</sup>与周晓莉等<sup>[4]</sup>方法,取体重150 g左右SD大鼠胸主动脉,剥离外膜,置于PBS中洗净血迹。取中膜(平滑肌层),剪成1 mm<sup>2</sup>左右小块,移植于培养瓶中,4 h后加培养基。4天左右换液,7天左右细胞爬出,约两周,瓶底覆盖约80%细胞时传代,以后根据生长情况,4~10天传代1次,取3~5代性状稳定细胞,用免疫荧光进行 $\alpha$ -SM-action鉴定,纯度>98%,细胞可用于试验。

### 1.6 平滑肌细胞泡沫化及药物干预

取3~5代性状稳定的VSMC,消化后植于24孔培养板中培养48 h,每孔中加入20  $\mu$ L ox-LDL,油红O染色观察平滑肌细胞内脂质,可见大量的泡沫细胞,细胞内有大小不等的脂滴,肌丝较少,证实为泡沫细胞(图1)。同时分别加入脉心康含药血清、罗格列酮含药血清、生理盐水含药血清,并设不加含药血清的空白对照组1组,每组做4个复孔。

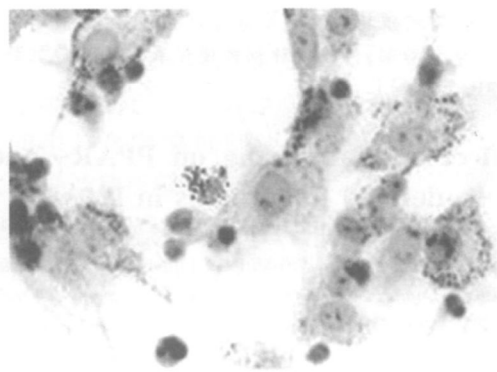


图1 油红O染色观察VSMC内脂质(10 $\times$ 40)

### 1.7 原位杂交检测过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ 、腺苷三磷酸结合盒转运体A1 mRNA表达

各组分别按上述药物干预48、72 h后,按照试剂盒说明书要求进行检测。以倒置相差显微镜观察后,用AO万能研究显微镜拍照;用OPTMAS(MEDIA CYBER NETICS)图像分析仪(美国)和OLYMPUS显微镜采集图像,计数其阳性细胞数,进行统计学分析(图2和图3)。

### 1.8 统计学方法

采用软件系统SPSS 13.0进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用方差分析。

## 2 结果

氧化型低密度脂蛋白作用24 h后,各组平滑肌细胞泡沫化,PPAR $\gamma$  mRNA表达开始升高。进行药物干预48、72 h,脉心康组、罗格列酮组与空白对照

组相比, PPAR $\gamma$  mRNA 表达均有显著升高; 脉心康组、罗格列酮组与生理盐水组相比, PPAR $\gamma$  mRNA

表达也有显著升高; 而脉心康组与罗格列酮组相比, PPAR $\gamma$  mRNA 表达也有显著升高 (表 1)。

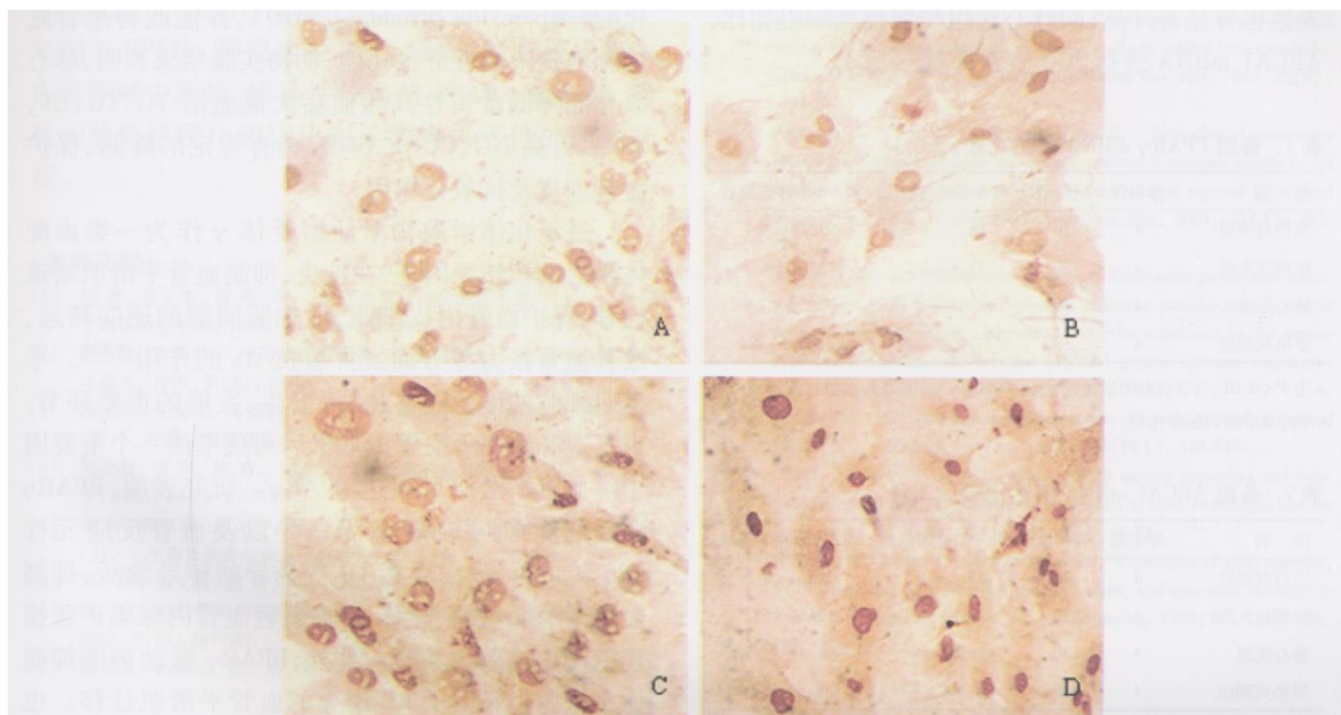


图 2. 72 h 原位杂交法检测 PPAR $\gamma$  mRNA 表达 (10 × 40)

A 为空白对照组, B 为生理盐水组, C 为脉心康组, D 为罗格列酮组。

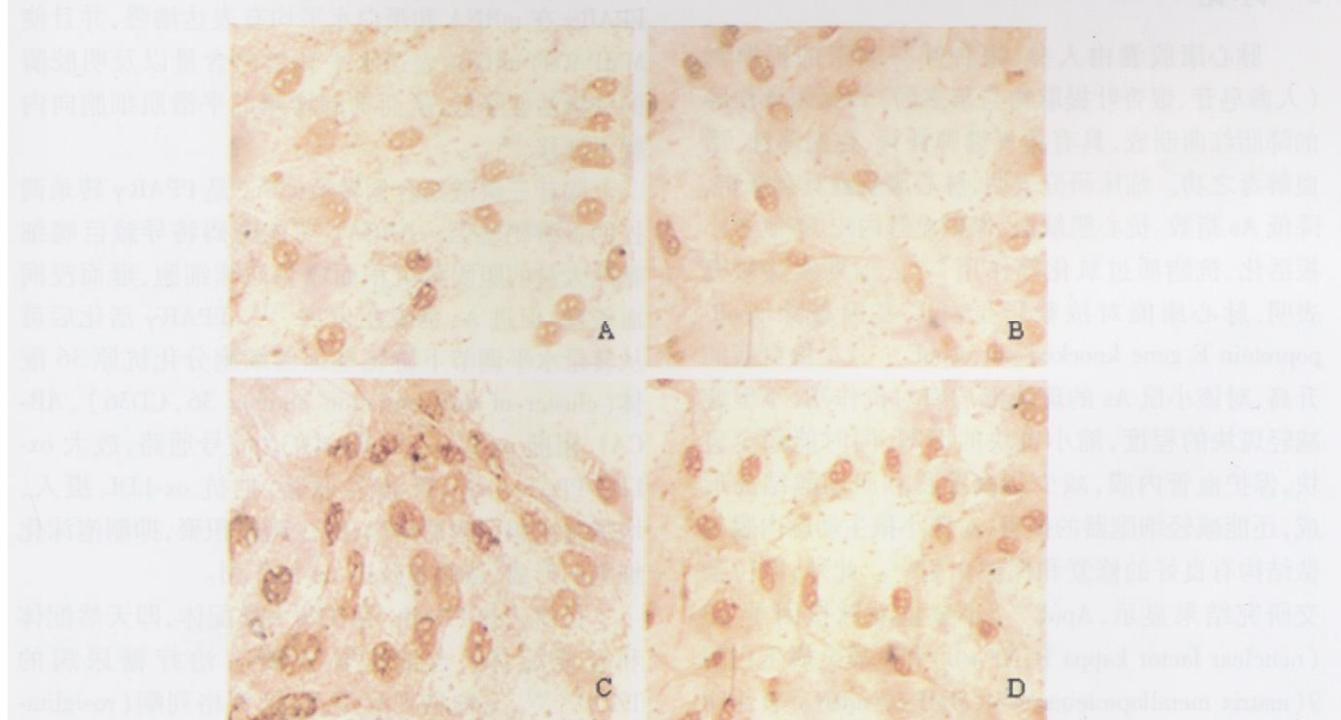


图 3. 72 h 原位杂交法检测 ABCA1 mRNA 表达 (10 × 40)

A 为空白对照组, B 为生理盐水组, C 为脉心康组, D 为罗格列酮组。

氧化型低密度脂蛋白作用 24 h 后, 各组平滑肌

细胞泡沫化, ABCA1 mRNA 表达开始升高, 进行药



物干预 48、72 h 脉心康组、罗格列酮组与空白对照组相比, ABCA1 mRNA 表达均有显著升高; 脉心康组、罗格列酮组与生理盐水组相比, ABCA1 mRNA 表达也有显著升高; 而脉心康组与罗格列酮组相比, ABCA1 mRNA 表达也有显著升高 (表 2)。

表 1 各组 PPAR $\gamma$  mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	视野数	48 h 阳性细胞数	72 h 阳性细胞数
空白对照组	4	30	28.3 $\pm$ 1	32.8 $\pm$ 4
生理盐水组	4	30	32.4 $\pm$ 2	34.4 $\pm$ 2
脉心康组	4	30	47.2 $\pm$ 8 <sup>abc</sup>	51.7 $\pm$ 9 <sup>abc</sup>
罗格列酮组	4	30	37.2 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	43.2 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$  与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与生理盐水组比较; c 为  $P < 0.01$  与罗格列酮组比较。

表 2 各组 ABCA1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	视野数	48 h 阳性细胞数	72 h 阳性细胞数
空白对照组	4	30	25.8 $\pm$ 5	26.4 $\pm$ 5
生理盐水组	4	30	23.2 $\pm$ 2	25.4 $\pm$ 1
脉心康组	4	30	43.1 $\pm$ 6 <sup>abc</sup>	50.9 $\pm$ 8 <sup>abc</sup>
罗格列酮组	4	30	31.2 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	38.8 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$  与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与生理盐水组比较; c 为  $P < 0.01$  与罗格列酮组比较。

### 3 讨论

脉心康胶囊由人参、银杏叶与绿茶的提取物 (人参皂苷、银杏叶提取物与茶多酚) 和经超微粉碎的降脂红曲制成, 具有益气健脾补肾、化痰降浊、活血解毒之功。临床研究表明, 脉心康胶囊具有降脂、降低 As 指数、抗心肌缺血、保护血管内皮、抑制血小板活化、抗脂质过氧化等作用<sup>[5,6]</sup>。前期实验研究表明, 脉心康能对抗载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked-out ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠血脂的升高, 对该小鼠 As 的斑块形成有对抗作用, 不但能减轻斑块的程度, 缩小斑块的面积, 同时能稳定斑块, 保护血管内膜, 减少脂滴沉积和胆固醇结晶形成, 还能减轻细胞器的损害, 对该小鼠主动脉内膜超微结构有良好的修复和保护作用<sup>[7]</sup>。此外, 原位杂交研究结果显示, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) mRNA 表达明显增加, 脉心康可降低 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 mRNA 表达<sup>[8]</sup>。我们还对脉心康降脂、抗 As 作用及其部分机理进行了临床和实验研究, 临床结果表明, 脉心康能够显著降低高脂血症患者总胆固醇 (total cholesterol TC)、甘油三酯 (triglyceride TG)、内皮素 (en-

dothelin, ET)、丙二醛 (malondialdehyde MDA), 升高一氧化氮 (nitric oxide NO)、降钙素基因相关多肽 (calcitonin gene-related peptide CGRP)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase SOD), 并能改善患者肱动脉内皮依赖性舒张功能; 动物实验结果表明, 脉心康亦能降低食饵性高脂血症大鼠血清 TC、TG、ET、MDA, 升高 NO、CGRP、SOD, 具有肯定的降脂、保护血管内皮及抗氧化作用。

过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  作为一类由配体激活的核转录因子, 在抗炎、抑制血管平滑肌增殖迁移、保护血管内皮细胞、增加胆固醇的逆向转运、改善血管张力等方面发挥着抗 As 的作用<sup>[9,10]</sup>。平滑肌细胞的增殖迁移是 As 发生、发展的重要环节, 也是冠心病患者血管成形术后再狭窄的一个重要因子。血管平滑肌可表达 PPAR $\gamma$ 。研究表明, PPAR $\gamma$  激动剂能抑制 c-fos 基因诱导以及血管反应元件 E26 转录因子、白介素 1 $\beta$  等诱导的转录激活, 抑制血管平滑肌增殖、迁移, 并能减轻血管内球囊扩张损伤模型中血管再狭窄。此外, PPAR $\gamma$  激动剂能抑制血小板源生长因子 BB 诱导的血管平滑肌迁移。也有研究发现, 在体外培养的平滑肌细胞中加入 PPAR $\gamma$  配体 15-脱氧前列腺素或噻唑烷酮类化合物 (thiazolidinediones TZD), 测得平滑肌细胞中 PPAR $\gamma$  在 mRNA 和蛋白水平均有表达增强, 并且使 MMP-9 的 mRNA 表达水平和蛋白含量以及明胶酶的分解活性降低, 从而抑制增殖的平滑肌细胞向内膜下迁移<sup>[11]</sup>。

腺苷三磷酸结合盒转运体 A1 是 PPAR $\gamma$  转录调控的下游靶基因。ABCA1 功能障碍将导致巨噬细胞内大量的胆固醇沉积而成为泡沫细胞, 继而浸润血管壁, 促进 As 的发生发展<sup>[12]</sup>。PPAR $\gamma$  活化后可从转录水平调节下游靶基因白细胞分化抗原 36 配体 (cluster of differentiation antigen 36 CD36)、ABCA1, 阻断 ox-LDL-PPAR $\gamma$ -CD36 信号通路, 放大 ox-LDL-PPAR $\gamma$ -ABCA1 信号通路, 拮抗 ox-LDL 摄入, 增加胞内胆固醇的排出, 减少脂质积聚, 抑制泡沫化细胞的形成, 从而起到抗 As 的作用。

目前已知 PPAR $\gamma$  存在两大类配体, 即天然配体和合成配体。合成配体主要有治疗糖尿病的 TZDs<sup>[13,14]</sup>, 又称格列酮类, 包括罗格列酮 (rosiglitazone)、曲格列酮 (troglitazone)、吡格列酮 (pioglitazone) 等。但合成配体现有的格列酮类药物选择性较低, 效果和安全性仍不甚满意。初步的临床和基础实验研究结果表明, 具有活血化瘀作用的脉心康胶囊具有显著的抗 As 和一定的稳定斑块作用, 本试

验通过应用原位杂交技术观察脉心康干预大鼠 VSMC 泡沫化过程的 PPAR $\gamma$  及其下游靶基因 ABCA1 mRNA 表达, 进一步证实了脉心康具有与罗格列酮相似的 PPAR $\gamma$  激动作用, 其抗 AS 作用的分子机制与 PPAR $\gamma$  调控途径有关。脉心康有望成为中医药领域中新的、特异性较高的 PPAR $\gamma$  激动剂, 为抗动脉粥样硬化和脂代谢异常提供更佳的药物选择。

#### [参考文献]

- [1] 杨奎, 王宇生, 雷燕, 等. 关于血清药理学的若干思考 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 5 (19): 263-266
- [2] 徐海波, 李彩君. 中药学清药理学方法探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5 (8): 13-16
- [3] 徐正云, 任国珍, 马爱群. 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的培养与鉴定 [J]. 岭南心血管病杂志, 2005, 11 (3): 202-204
- [4] 周晓莉, 雷寒, 柳青. 血管平滑肌细胞的培养及鉴定 [J]. 重庆医学, 2005, 34 (6): 877-878
- [5] 蔚青, 张文高, 刘龙涛, 等. 脉心康胶囊治疗血脂异常的疗效观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6 (2): 143-142
- [6] 郑广娟, 张文高, 蔚青, 等. 脉心康胶囊对颈动脉粥样硬化病人肱动脉内皮依赖性舒张功能的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3 (7): 567-669
- [7] 张文高, 杜景云, 郑广娟, 等. 透射电镜观察脉心康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化内膜及中膜超微结构的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 13: 83
- [8] 郑广娟, 张文高, 刘龙涛, 等. 脉心康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉核因子  $\kappa$ B 和基质金属蛋白酶 9 表达的调控 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (5): 444-445
- [9] Jackson SM, Parhami F, Xi XP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (9): 2094-104
- [10] Argnann CA, Sawyez GG, McNeil CJ, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (3): 475-482
- [11] Benson S, Wu J, Padmanabhan S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma expression in human vascular smooth muscle cells: inhibition of growth, migration, and c-fos expression by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activator troglitazone [J]. *Am J Hypertens*, 2000, 13 (1 Pt 1): 74-82
- [12] Knight BL. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux [J]. *Biochim Soc Trans*, 2004, 32 (Pt 1): 124-127
- [13] Chavla A, Barak Y, Nagy L, et al. PPAR gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation [J]. *Nat Med*, 2001, 7 (1): 48-52
- [14] Hilunen TP, Luoma JS, Makkari T, et al. Expression of LDL receptor, VLDL Receptor, LDL Receptor related protein, and scavenger Receptor in Rabbit Atherosclerotic lesions [J]. *Circulation*, 1998, 97: 1079-086

(此文编辑 曾学清)