

低压缺氧对兔动脉粥样硬化斑块中胶原含量的影响

张司兰¹, 徐立群¹, 韩 威², 陈世伟¹, 谢 凤¹ (1. 重庆市璧山县人民医院心血管内科 402760; 2. 成都医学院医学检验系实验中心, 成都 610083)

【摘要】 目的 观察低压缺氧对兔动脉粥样硬化斑块胶原含量的影响, 并对其机制进行初步探讨。**方法** 日本大耳兔随机分为常氧对照组和低压缺氧组两组, 高胆固醇饮食 12 周建立兔动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 病变模型后, 取主动脉内膜组织分别采用 Woessner 法、western blot 法和实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测斑块组织中胶原含量、人核转录因子 (NF- κ B) 蛋白、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素 6 逆转录糖核酸 (IL-6 mRNA) 表达。**结果** 低压缺氧能明显降低斑块中胶原蛋白含量, 提高 NF- κ B 蛋白、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。**结论** 低压缺氧能明显降低斑块中胶原蛋白含量, 其机制可能与促进炎症反应, 升高 NF- κ B 蛋白、TNF- α 及 IL-6 mRNA 表达有关。

【关键词】 动脉粥样硬化; NF- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.20.004

中图分类号: R543.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)20-2183-02

Effects of hypobaric hypoxia on content of collagen in rabbit atherosclerotic plaques ZHANG Si-lan¹, XU Li-qun¹, HAN Wei², CHEN Shi-wei¹, XIE Feng¹. 1. Department of Cardiology, Bishan People's Hospital, Bisan Chongqing 402760, China; 2. Experimental Center, department of Medical Laboratory, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China

【Abstract】 Objective To study the effects of hypobaric hypoxia on collagen content in atherosclerotic plaques of rabbit models and to initially investigate its mechanism. **Methods** Rabbit atherosclerotic models were set up by high-cholesterol diet. The contents of NF- κ B and collagen in plaque were detected by Western blot and woessner method, respectively. Expression levels of TNF- α , IL-6 mRNA were determined with real-time PCR. **Results** In hypobaric hypoxia group, collagen in atherosclerotic plaques was decreased markedly, TNF- α , IL-6 mRNA and NF- κ B protein found in atherosclerotic plaques were elevated. **Conclusion** Hypobaric hypoxia could decrease the collagen content in rabbit atherosclerotic plaques, which may be concerned with its promoting inflammatory action.

【Key words】 atherosclerosis; NF- κ B; tumor necrosis factor- α ; interleukin 6

心血管疾病的发生率和死亡率逐年递增, 是目前导致人类死亡的第一大原因。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 及其并发症在其中占有重要地位, AS 斑块不稳定及其破裂是导致心脑血管事件的重要原因, 不稳定斑块破裂后产生的一系列并发症, 引起心、脑血管栓塞, 严重威胁患者生命安全^[1]。斑块中的胶原含量与斑块的稳定性密切相关, 胶原是纤维帽的主要成分之一, 胶原含量越少, 纤维帽越薄, 斑块越容易破裂^[2]。目前, 低压缺氧与动脉粥样硬化形成的相互作用机制尚不清楚, 有关低压缺氧对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响研究甚少。本试验拟选取日本大耳兔为主要研究对象, 探讨低压缺氧对 AS 斑块中胶原含量的影响, 从而揭示低压缺氧与 AS 斑块稳定性的关系。

1 材料与与方法

1.1 动物 日本大耳兔 (SPF 级), 雄性, (2.0 $\pm$ 0.2) kg, 第三军医大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK(军)2002-029。

1.2 试剂 小鼠抗兔 NF- κ B、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 一抗 (美国 Santa 公司), 山羊抗小鼠二抗、DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术公司); Trizol (德国 Roche 公司), RNasin (Takara 公司), 逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒为上海东洋坊科技有限公司产品。

1.3 仪器 紫外分光光度计 (上海亚研公司), MiniBIS Pro 凝胶成像系统 (美国 Labnet), LightCycler II 型实时荧光定量基

因扩增系统 (德国 Roche 公司)。

1.4 方法

1.4.1 实验分组 日本大耳兔 10 只随机分为常氧对照组和低压缺氧组两组。(1) 常氧对照组 5 只: 高胆固醇饲料 (含 1% 胆固醇、8% 猪油和 7.5% 蛋黄粉的粗颗粒饲料) 150 g/d^[3] 喂养 12 周。(2) 低压缺氧组 5 只: 高胆固醇饲料 150 g/d 喂养 12 周, 低压缺氧试验: 参照 Fagan^[4] 的方法加以改进制作常压低压氧动物舱, 模拟常压低压、低氧。压缩空气与混合气体 (90% N₂ + 10% O₂) 在电磁阀控制下分别以 2 L/min 的流速输入低氧舱, 间隔 30 s, 循环 1 次/分, 每天 8 h, 其余时间置饲养笼, 室温、空气、正常摄食、饮水。低压缺氧试验过程中舱内混合气体浓度由测氧仪检测, 并随机采样送气体成分分析。对照组每天同时置相同规格有机玻璃舱内, 空气输入, 无缺氧。各组实验结束当天取标本。

1.4.2 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 从血管内膜上刮取约 30 mg 粥样组织, 置于研磨钵中, 加入液氮研磨, 匀浆移入 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL Trizol, 用加样枪吹打混匀, 室温静置 5 min, 加入 0.2 mL 氯仿, 摇匀, 室温下静置 15 min, 4 $^{\circ}$ C 10 000 g 离心 15 min, 将上层水相转移至新的离心管中, 加入等体积的异丙醇, 摇匀, 室温下静置 10 min 后, 4 $^{\circ}$ C 10 000 r 离心 10 min, 弃上清液, 75% 乙醇清洗 2 次, 将 RNA 沉淀晾干, 用 20 μ L 无 RNA 酶去离子水溶解, -70 $^{\circ}$ C 保

存待用。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书:1 μL cDNA 样本作为 PCR 扩增模板,阴性对照扩增模板为去离子水;扩增条件为 94 ℃ 预变性 5 min;

随后 94 ℃ 30 s,退火温度 30 s,72 ℃ 20 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。采用 Primer premier 5.0 软件设计引物(表 1),引物由上海生工合成。

表 1 引物序列

基因	长度(bp)	上游引物	下游引物	退火温度(℃)
TNF-α	152	CTGCTGCACTTCAGGGTGATC	ACTTGCGGGTTTGCTACTACG	62.0
β-actin	144	AGATTACTGCCCTGGCTCCTAG	CATCCGTACTCTGCTTGCTGAT	59.0
IL-6	170	GAAGAAGCCACCCTCAAGCC	AAGCAAGGACACCCGCACTC	62.0

1.4.3 Woessner 法测定羟脯氨酸 从血管内膜上刮取粥样组织,标本脱水、脱脂、烘干、称重,加 100 倍于样本量的 6 mol/L 盐酸在 110 ℃ 分解 24 h,旋转蒸发器去除盐酸,双蒸水溶解残留物,加氯胺 T 溶液室温静置 20 min,加过氯酸溶液室温静置 5 min,加对苯胺基苯甲醛溶液在 60℃ 温箱加热 20 min,取出冷却后,在波长 560 nm 处测定吸光值。通过羟脯氨酸标准曲线计算出待测液内的羟脯氨酸浓度,以此推算组织总胶原蛋白含量^[5]。

1.4.4 Western-blot 法 从血管内膜上刮取粥样组织,分别提取各组细胞总蛋白,测定蛋白质浓度(考马斯亮蓝 G-250 染料法),并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳、转膜、封闭。加入一抗(Ras P21 蛋白或 GAPDH 单克隆抗体稀释度分别为 1:1 000 和 1:500)、二抗,最后进行化学发光显色,显色带经扫描仪扫描后用 BandScan 5.0 软件进行灰度值半定量分析。以 GAPDH 作内参照,Ras P21 蛋白与 GAPDH 片段的条带光密度(OD)比值为相对值分别进行比较。

1.4.5 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 专业统计学软件对数据进行统计学处理,统计学方法采用 *t* 检验,当 $P < 0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 低压缺氧对斑块中胶原含量的影响 本实验采用 Woessner 方法测定斑块中羟脯氨酸的含量,从而推算出胶原含量。结果常氧对照组胶原蛋白含量(14.58±3.15)mg/g,低压缺氧组(10.87±1.82)mg/g,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。显示低压缺氧后明显降低了斑块中的胶原蛋白含量,降低率为 25.45%($P < 0.05$)。

2.2 低压缺氧对斑块中 IL-6、TNF-α mRNA 表达的影响 本实验采用 RT-PCR 分别检测了常氧对照组和低压缺氧组斑块中 IL-6、TNF-α mRNA 的表达。结果如表 3 所示,表明低压缺氧后明显升高了斑块中 IL-6、TNF-α mRNA 的表达,分别升高了 30.43%、45.16%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 低压缺氧对斑块中 IL-6、TNF-α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	IL-6/β-actin	TNF-α/β-actin
常氧对照组	0.092±0.016	0.031±0.005
低压缺氧组	0.12±0.023*	0.045±0.007*

注:与常氧对照组比较,*: $P < 0.05$ 。

2.3 低压缺氧对斑块中 NF-κB 蛋白表达的影响 本实验采用 Western blot 法检测常氧对照组和低压缺氧组斑块中 NF-κB 的表达。结果分别为常氧对照组: $\bar{x} \pm s = 0.045 \pm 0.008$,低于缺氧组: $\bar{x} \pm s = 0.057 \pm 0.011$ 。低压缺氧后,明显升高了斑

块中 NF-κB 的表达,升高了 26.67%差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

AS 不稳定斑块破裂后产生的一系列并发症,引起心、脑血管栓塞,严重威胁患者生命安全^[6]。目前对斑块稳定性的研究也越来越受到重视,但现有的研究绝大部分局限于对尸检标本的研究,通过建立动物模型对此进行研究较少。兔是 AS 的易感动物,采用高脂饲料喂养后一般 8~12 周即可获得在腹主动脉等大血管发生 AS 的动物模型。为此,本研究选择兔作为低压缺氧干预促进 AS 形成^[7]的造模动物。胶原是纤维帽的主要成分之一,纤维帽对斑块起保护作用,纤维帽越厚,斑块越稳定。破裂的 AS 斑块的纤维帽通常胶原含量较低,能合成胶原平滑肌细胞的数目也较少^[8]。本实验研究发现,低压缺氧会使兔 AS 斑块中的胶原含量下降,说明低压缺氧可以降低 AS 斑块的稳定性。AS 斑块的稳定性除与血液流变学的改变有关外,还与斑块内的成分密切相关,斑块内的炎症反应因子可以刺激平滑肌细胞、内皮细胞等产生基质金属蛋白酶,有效降解胶原和纤维帽内其他细胞外基质,使纤维帽变薄,纤维帽的不断变薄将最终导致粥样斑块的破裂^[9]。本研究发现,低压缺氧会升高兔 AS 斑块中的炎症反应因子 TNF-α、IL-6 水平,其降低斑块中胶原含量的机制可能与升高斑块中的炎症反应因子水平有关。

参考文献

[1] Wong TY, Klein R, Amirul-Islam FM, et al. Three-year incidence and cumulative prevalence of retinopathy: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(6): 970-976.

[2] Orbe J, Fernandez L, Rodriguez JA, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed[J]. Atherosclerosis, 2003, 170(2): 269-276.

[3] 袁志兵, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七总皂苷改善兔动脉粥样硬化斑块稳定性的机制探讨[J]. 中草药, 2006, 37(5): 741-743.

[4] Fagan KA. Selected contribution: pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(6): 2502-2507.

[5] 永井裕, 藤本大三郎, 刘平. 胶原蛋白实验方法[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1992: 51.

[6] 袁小媚, 马庆华. 卡托普利和缬沙坦对大鼠心肌梗死后胶原网络重塑的干预研究[J]. 重庆医学, 2006, 35(15): 1375-1377.

(下转第 2186 页)