

温肾化痰方对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化易损斑块模型 Orai1、Caspase、Bax、Bcl-2 等基因及其相关蛋白表达的影响*

林海丹¹, 陈铭泰², 庄震坤¹, 张 忠^{2△}, 刘彩如²

(1. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 广州 510006;

2. 广州中医药大学深圳市中医院心血管科, 广东 深圳 518100;)

摘要: **目的** 观察温肾化痰方对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化易损斑块模型 Orai1 和 Caspase3、Caspase9、Bax 及 Bcl-2 等基因及其相关蛋白表达的影响。**方法** 建立 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化易损斑块模型, 随机分成空白对照组、易损斑块组、阳性对照组、温肾化痰方低、中、高剂量组。13 周后麻醉处死小鼠, 采用 RT-PCR 技术检测主动脉平滑肌细胞 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 及 Bcl-2 等基因的表达情况, 并采用 Western blot 法检测主动脉窦 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 及 Bcl-2 等蛋白表达变化。**结果** 与空白对照组相比, 易损斑块组 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax mRNA 及蛋白表达水平明显上升($P<0.01$), 而 Bcl-2 mRNA 及蛋白明显下降($P<0.01$)。与易损斑块组相比, 阳性对照组与温肾化痰方各剂量组均能下调上述基因(不包括 Bcl-2)mRNA 及蛋白表达水平, 以及同时能上调 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达, 且中药剂量越高, 调节效果越明显。与阳性对照组相比, 温肾化痰方高剂量组下调 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax mRNA 及蛋白水平以及上调 Bcl-2 mRNA 及蛋白水平的作用基本一致。这两组小鼠的上述基因及蛋白表达与空白对照组相比, 统计无显著性差异。**结论** 温肾化痰方能对应调节相关基因及蛋白表达从而干预易损斑块的形成及进展, 进而起到保护心血管的作用。

关键词: 动脉粥样硬化; 温肾化痰方; Orai1; Caspase; Bax; Bcl-2

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)01-0008-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.002

Effect of Wenshen Huatan Decoction on the Expression of Orai1, Caspase, Bax and Bcl-2 Genes and Related Proteins in Aulnerable Plaque Model of ApoE Knockout Mice

LIN Haidan¹, CHEN Mingtai¹, ZHUANG Zhenkun², ZHANG Zhong¹, LIU Cairu¹

(1. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangzhou University of TCM, Shenzhen 518000, China;

2. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of Wenshen Huatan decoction on the expression of Orai1, Caspase3, Caspase9, Bax and Bcl-2 genes and their related proteins in atherosclerotic vulnerable plaque models of ApoE knockout mice. **Methods** The model of atherosclerotic vulnerable plaque in ApoE knockout mice was established and randomly divided into six groups, like blank control group, vulnerable plaque group, positive control group, Wenshen Huatan decoction low, medium and high dose groups. After 13 weeks, the mice were sacrificed by anesthesia. The expressions of Orai1, Caspase3, Caspase9, Bax and Bcl-2 genes in aortic smooth muscle cells were detected by RT-PCR technology. The expressions of protein associated with the above genes in the aortic sinus were also detected by Western blot technology. **Results** Compared with blank control group, the expression levels of Orai1, Caspase3, Caspase9 and Bax mRNA and protein in the

收稿日期: 2019-01-15

* 基金项目: 国家自然科学基金(81573922); 深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20160428181826351); 深圳市三名工程——中国医学科学院阜外医院张健教授心血管病团队(SZSM201612033)

第一作者简介: 林海丹(1991-), 女, 在读硕士研究生, 医师, 研究方向: 中西医结合治疗心血管疾病。

△通信作者: 张忠, E-mail: zzicu@126.com

vulnerable plaque group increased significantly ($P<0.01$), while the ones of Bcl-2 decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the vulnerable plaque group, the mRNA and protein expression of the above genes (excluding Bcl-2) in the positive control group and Wenshen Huatan decoction group were down-regulated, and simultaneously the expression of Bcl-2's mRNA and protein were up regulated. It's also could be observed that the higher the dosage of the decoction, the more obvious the adjustment effect. Compared with the positive control group, the expression of those genes and protein in the high-dose group of Wenshen Huatan decoction were almost in the same. Among these two groups and blank control group, there was no statistically significant difference in the expression of those genes and proteins. **Conclusion** Wenshen Huatan decoction can prevent the formation and progression of vulnerable plaques by regulating the expression of relational genes and proteins, and thus protect the cardiovascular system.

KEY WORDS: atherosclerosis; Wenshen Huatan decoction; Orai1; Caspase; Bax; Bcl-2

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管外的基本病理基础。其形成发展与凋亡基因密切相关。大量研究表明,控制动脉粥样硬化甚至逆转其发展趋势,可以减少急性心脑血管事件意外发生。AS 主要为血管内膜发生脂质等物质沉积,中层血管平滑肌增殖迁移,导致内膜增厚,从而形成粥样病变^[1-2]。Orai1、Caspase、Bax、Bcl-2 等基因在该病理过程中起关键作用。本实验通过检测不同分组的 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化模型的 Orai1、Caspase、Bax、Bcl-2 基因及其对应的蛋白,从动物实验方面进行基因及蛋白研究,为温肾化痰方调节动脉粥样硬化提供基因及蛋白层面的实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物、饲料与药物 6 周龄 ApoE^{-/-}小鼠,均为雄性,体质量 20~30g,SPF (Specific pathogen Free, SPF)级,实验前普通饲料喂养 1 周。高脂、高胆固醇饲料含 1%胆固醇及 5%猪油。温肾化痰方:仙茅 10 g,仙灵脾 10 g,石菖蒲 15 g,瓜蒌皮 15 g,乳香 15 g 加工制成含生药 0.5265 g/mL 中药浓缩液,由广州中医药大学附属第一医院中药房提供。阳性对照组为阿托伐他汀钙片(20 mg/片,辉瑞制药有限公司)。

1.2 动物分组与给药 将 ApoE^{-/-}小鼠 120 只按体重分层随机法,平均分为 6 组,分别为空白对照组、易损斑块组、阳性对照组、低、中、高剂量中药组。普通饲料喂养空白对照组 12 周。高脂、高胆固醇饲料喂养剩余 5 组小鼠 8 周后继而予高脂饲料喂养 4 周。空白对照组及易损斑块组小鼠均不给药,予生理盐水 1 mL/d 灌胃,阳性对照组予阿托伐他汀钙喂养 5 mg/kg·d⁻¹,低、中、高剂量中药组分别予温肾化痰方 5.256 g/kg·d⁻¹、10.053 g/kg·d⁻¹、20.106 g/kg·d⁻¹ 喂养,以上药液均在 8 周后开始灌胃给药 4 周。

1.3 Western blot 法检测蛋白表达 配制 Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶及浓缩胶后,称取组织后裂解离心,取上清液,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒进行组织蛋白定量,将定量裂解后的样品取 100 μL 加入 5X 蛋白上样缓冲液 25 μL 混匀。电磁炉煮沸处理 15 min,冷却后待用。

Western blot 法检测蛋白表达:将样品滴加到凝胶孔内电泳;转膜;取膜放置脱脂奶粉(浓度 5%)封闭孵育;结束后 PBST 洗膜;再加入用 PBS 含 1%的 BSA 为稀释液的一抗摇床振荡孵育 1 h;孵育结束后 PBST 洗膜;加入 HRP 标记的二抗振荡孵育 1 h;孵育结束后 PBST 洗膜;ECL 发光显影,定影。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值并进行统计分析。

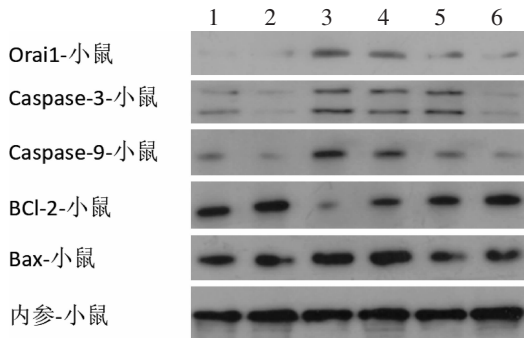
1.4 RT-PCR 检测 mRNA 表达 样品研磨成粉后于离心管中反复振荡裂解,加入 Trizol 吹打裂解;加入氯仿剧烈震荡 1 min 后静置 5 min 后 12 000r 离心 10 min;取上清液移至异丙醇 EP 管中混匀离心 10 min;去上清,加入乙醇离心 5 min,去上清;干燥后 DEPC 溶解;与 DNase I 等配置反应液;加苯酚后离心;再取上清液加氯仿后离心;再取上清液后加异丙醇静置、离心、去上清;乙醇洗涤、风干;加 DEPC 溶解;在 PCR 管中加入 RNA、引物混合物 70℃保温 10 min 后迅速在冰上冷却 2 min;加入 RNA/引物变性溶液等试剂后 42℃保温 60 min、72℃保温 15 min、-20℃保存备用;cDNA 稀释 10 倍;加入引物、ddH₂O 等配制反应体系;使用 PRIMER5 软件/NCBI 在线设计引物;使用 ViiA7 software 设定反应条件并分析基因扩增曲线和溶解曲线。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组之间的

比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用药前后各组蛋白表达情况 给药 4 周后, 各组条带灰度情况如下(见图 1 及表 1)。各组小鼠内参蛋白条带基本一致, 即各组小鼠样品上样量基本一致。



注: 条带从左到右依此为: 1. 空白对照组, 2. 阳性对照组, 3. 易损斑块组, 4. 低剂量中药组, 5. 中剂量中药组, 6. 高剂量中药组

图 1 各蛋白条带灰度情况

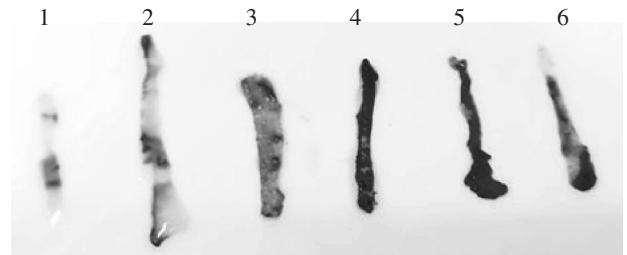
表 1 各蛋白相对灰度值

	1	2	3	4	5	6
Orai1-小鼠	0.07	0.08	0.31	0.24	0.19	0.11
Caspase-3-小鼠	0.24	0.16	0.56	0.50	0.43	0.27
Caspase-9-小鼠	0.17	0.12	0.38	0.26	0.19	0.18
Bcl-2-小鼠	0.53	0.58	0.14	0.39	0.49	0.62
Bax-小鼠	0.49	0.49	0.90	0.89	0.44	0.38

注: 1. 空白对照组, 2. 阳性对照组, 3. 易损斑块组, 4. 低剂量中药组, 5. 中剂量中药组, 6. 高剂量中药组

与空白对照组相比, 易损斑块组的 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 蛋白表达上调, Bcl-2 蛋白表达则下调明显, 表明易损斑块组的促进凋亡的相关蛋白增加, 抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白减少。与易损斑块组相比, 余 5 组的 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 蛋白表达下调, 且中药剂量越大, 下调程度越明显, 表明温肾化痰方能下调促凋亡的相关蛋白的表达; 同时余 5 组的 Bcl-2 蛋白表达上调, 且上调程度随中药剂量增加而增加, 即表明温肾化痰方能上调抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白表达。与阳性对照组相比, 温肾化痰方各剂量组下调促凋亡的相关蛋白及上调抑制凋亡的相关蛋白的作用一致。且其作用随中药剂量的增加而增强。高剂量中药组作用与阳性对照组条带基本一致, 说明高剂量温肾化痰方的作用与阿托伐他汀钙作用基本一致。

2.2 各组大体标本情况



注: 1. 空白对照组, 2. 高剂量中药组, 3. 阳性对照组, 4. 易损斑块组, 5. 低剂量中药组, 6. 中剂量中药组

图 2 各组大体标本情况

2.3 用药前后各组 mRNA 表达情况 给药 4 周后, 各组基因相对样品模板量见表 2。

表 2 各组基因相对样品模板量结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	各基因相对样品模板量				
	Orai1	Caspase3	Caspase9	Bcl2	Bax
空白对照组	0.99±0.46	0.85±0.36	0.83±0.35	1.96±0.67	0.89±0.53
易损斑块组	4.43±1.64	4.63±3.62	3.66±1.50	0.63±0.28	5.67±1.69
阳性对照组	1.32±0.62	1.49±0.26	1.30±0.14	1.88±0.35	1.30±0.28
低剂量中药组	3.84±1.25	4.27±0.73	3.43±0.72	0.84±0.22	3.65±1.36
中剂量中药组	2.70±0.88	3.53±1.59	3.10±1.18	1.16±0.25	3.34±1.06
高剂量中药组	2.50±1.59	2.38±0.88	2.13±0.52	1.47±0.36	2.65±1.10

各组基因相对样品模板量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相比结果显示: 易损斑块组的 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 含量均比空白对照组明显上升, 而 Bcl2 含量比空白对照组明显下降, 统计有显著性差异 ($P < 0.01$)。阳性对照组的 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax、及 Bcl2 含量

与空白对照组相比基本一致, 统计无显著性差异 ($P > 0.05$)。各中药组的 Orai1、Caspase3、Caspase9、Bax 含量与易损斑块组相比, 随中药剂量增加而下降, 而 Bcl2 含量则随中药剂量增加而增加。其中高剂量中药组与阳性对照组及空白对照组相比, 其各组基因含

量无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性退行性改变,由脂质等物质沉积管壁,引起细胞吞噬并泡沫化,进而血管平滑肌细胞增殖迁移,从而导致管壁硬化、管腔变细等病理性改变^[1-2]。Orail 是质膜上的控制 Ca^{2+} 流通的跨膜蛋白,在血管平滑肌细胞、上皮细胞等多种细胞中表达^[3-4]。其在被激活状态下构建钙释放激活钙通道,从而调节 Ca^{2+} 进入细胞,调控细胞分化、凋亡^[5-7]。研究表明,Orail 与动脉斑块硬化发生发展起促进作用^[8]。Bax 属 Bcl-2 家族成员,在细胞凋亡中也起到促进作用,尤其促进不稳定型粥样斑块的增生^[9-10]。Bax 促进平滑肌细胞发生凋亡,释放炎症因子,加重炎症反应,同时细胞碎片促进血栓形成,影响斑块稳定^[10-11]。而 Bcl-2 是细胞凋亡的关键调控原癌基因,主要参与调节心肌细胞凋亡过程,作用与 Bax 相反,即主要阻止 Caspase9 及后续的 Caspase3 的一系列活化,从而促进细胞生存,逆转细胞凋亡的发生^[12-15]。Caspase3、Caspase9 均属 Caspase 家族中促凋亡的基因及相对应的酶。Caspase 家族属半胱氨酸天门冬氨酸蛋白水解酶,在细胞凋亡中是多条凋亡机制通路的核心汇聚点,其中 Caspase9 起启动作用,而 Caspase3 起效应作用,且 Caspase3 活性最高,特异性彻底裂解底物使细胞最终凋亡^[16-18]。

大量研究表明,ApoE(载脂蛋白 E)的基因多态性与血脂异常、动脉粥样硬化有密切的相关性^[19-21]。为排除 ApoE 基因干扰,本实验选用 ApoE 基因敲除小鼠为实验对象,建立动脉粥样硬化易损斑块模型,观察温肾化痰方对小鼠相关促进或抑制斑块形成的基因及其蛋白的影响。温肾化痰方由广东省名中医罗陆一教授根据经典名方二仙汤结合个人经验及科研成果加减化裁而来,由仙灵脾、仙茅、石菖蒲、瓜蒌皮、乳香等药味组成。其中仙灵脾辛温,归肝肾经,补肾强骨;仙茅辛温,入肾,温肾壮阳;石菖蒲辛苦温,归心胃经,化湿豁痰,活血理气;瓜蒌皮甘寒,归肺胃经,化痰利气宽胸;乳香辛苦温,活血止痛。全方有活血化痰、温肾助阳的功效。课题组认为本病为年老肾阳衰微,痰瘀阻滞,故发本病,当以温肾化痰为法,故以此方为实验治疗方。

通过实验可知,与易损斑块组相比,温肾化痰方

可明显下调 Orail、Caspase3、Caspase9、Bax 的基因及蛋白表达。表明温肾化痰方可通过降低促凋亡基因的表达及相应蛋白的激活及表达,从而降低细胞凋亡及增殖的几率,延缓甚至改善动脉粥样硬化斑块的进展。同时温肾化痰方可上调 Bcl-2 的基因及蛋白表达。表明温肾化痰方可增加抑制细胞凋亡的基因表达,截断 Caspase 级联反应,从而减少平滑肌细胞的凋亡及增殖,正向抑制动脉粥样硬化的发生发展。高剂量中药组与阳性对照组相比,统计学无显著性差异,表明高剂量温肾化痰方调节相关基因及蛋白的作用与阿托伐他汀钙一致,但要注意剂量问题。从这方面又可表明中医药的疗效与剂量有密切关系。温肾化痰方如何调节相关基因的表达,通过何种或多种组分如何进行药理反应,实验中尚未可知,具体药理机制需待进一步研究。

综上所述:温肾化痰方可通过调节与血管平滑肌细胞的凋亡、增殖相关的基因及蛋白表达,从基因层面降低血管平滑肌细胞的凋亡率,改善动脉粥样硬化斑块形成及发展,从而起到保护心血管的作用。

参考文献:

- [1] HARTMAN J, FRISHMAN W H. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy[J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22 (3): 147-151.
- [2] FIN A V, NAKANO M, NARULA J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7): 1282-1292.
- [3] BEMA E A, WOODARD G E, ROSADO J A. Orails and STIMs: physiological mechanisms and disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(3): 407-424.
- [4] TREBAK M. STIM/Orai signaling complexes in vascular smooth muscle[J]. *J Physiol*, 2012, 590(17): 4201-4208.
- [5] WEI L L, CARRELL E M, BONCOMPAGNI S, et al. O-rail-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue[J]. *Nat Commun*, 2013(4): 2805.
- [6] PENNA A, DEMURO A, YEROMIN A V, et al. The CRAC channel consists of a tetramer formed by stim-induced dimerization of orai dimers [J]. *Nature*, 2008, 456 (7218): 116-120.
- [7] 陈梅华. Orail-BK₂(Ca)信号复合物调节血管平滑肌细胞

- 收缩和血管张力的作用及其机制[D]. 合肥:安徽医科大学,2016.
- [8] 田晋帆,葛长江,吕树铮,等. 基质交感分子 1 在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块形成中的作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志,2015,17(2):183-187.
- [9] KONSTADOU LAKIS M M, KYMIONIS G D, KARAGIANI M, et al. Evidence of apoptosis in human carotid atheroma[J]. J Vasc Surg,1998,27(4):733-739.
- [10] 门保忠,周定标,石怀银,等. Bax 基因在人颈动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 军医进修学院学报,2010,31(6):594-596.
- [11] 门保忠,周定标,石怀银. 颈动脉粥样硬化分子病理学研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2004,12(3):370-372.
- [12] VELA L, GONZALO O, NAVAL J, et al. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation[J]. J Biol Chem,2013,288(7):4935-4946.
- [13] 李录,贾绍斌,陈大鹏,等. bcl-2 在同型半胱氨酸致血管内皮细胞凋亡中的作用[J]. 临床心血管病杂志,2014,30(1):75-78.
- [14] LOOR G, KONDAPALLI J, IWASE H, et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion [J]. Biochim Bio-phys Acta,2010,1813(7):1382-1394.
- [15] 程修平,宫丽鸿. 稳斑汤对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化不稳定斑块形成 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(12):1728-1731.
- [16] 管耘园,叶炳华,卢辉和,等. 卡维地洛干预对转染 p53 基因家兔颈动脉粥样硬化斑块稳定性影响的研究[J]. 中华心血管病杂志,2007,35(1):63-68.
- [17] TSUJIMOTO Y, FINGER LR, YUNIS J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14:18) chromosome translocation [J]. Science,1984,226(4678):1097-1099.
- [18] 德乐黑巴特尔,达林泰,赵诚. YAP 和 Caspase 在恶性肿瘤中的作用机制及其关联的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志,2012,44(5):575-579.
- [19] SIEST G, PILLOT T, RÉGIS B A, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine[J]. Clin Chem,1995,41(8 Pt1):1068-1086.
- [20] SKOOG I. Vascular aspects in Alzheimer's disease [J]. J Neural Transm Suppl,2000,59:37-43.
- [21] 石佳鹭,张莉. 载脂蛋白 E 基因多态性与血脂及动脉粥样硬化相关性研究进展[J]. 现代医药卫生,2018,34(7):1032-1035.