

活血化瘀法对鼠颈动脉粥样硬化损伤血管 wnt/ β -catenin 信号通路的影响

余文珍¹ 陈 实² 张永亮² 涂春香¹ 陈 勇¹

(1 福建中医药大学中西医结合学院 福州 350122; 2 厦门大学附属福州市第二医院神经外科 福州 350007)

摘要 目的: 观察活血化瘀法对颈动脉粥样硬化血管内皮损伤模型大鼠 wnt/ β -catenin 信号通路的影响, 探讨其可能的作用机制。方法: 32 只 SD 大鼠高脂喂养 1 个月后, 随机取 8 只作为假手术组(仅切开皮肤), 其余大鼠均行颈总动脉球囊损伤术, 成膜后再随机分为模型组($n=8$ 只)、活血化瘀中药方中剂量(临床等效量)组($n=8$ 只)和高剂量(临床 2 倍量)组($n=8$ 只)。从术后第 4 天开始予以相应药物灌胃治疗(模型组、假手术组灌等量生理盐水), 2 周后取术侧颈总动脉段, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 wnt、FzD1、AXIN1、GSK-3 β 、 β -catenin、VEGF mRNA 基因表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组 wnt、FzD1、AXIN1、 β -catenin、VEGF 等 mRNA 水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。经活血化瘀中药方干预后, 上述各基因 mRNA 水平均有不同程度升高, 尤其是高剂量组与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05 \sim 0.01$); 只有 GSK-3 β mRNA 水平各组无明显差异。结论: 活血化瘀法可通过上调 wnt/ β -catenin 信号通路表达, 使损伤血管 VEGFmRNA 基因表达水平上升, 提示该法可保护颈动脉粥样硬化血管内皮损伤。

关键词 活血化瘀法; 颈动脉粥样硬化; 血管损伤; wnt/ β -catenin 信号通路

Effect of Activating Blood and Resolving Stasis Therapy on Injured Vascular wnt/ β -catenin Signal Pathway of Rats with Carotid Atherosclerosis

Yu Wenzhen¹, Chen Shi², Zhang Yongliang², Tu Chunxiang¹, Chen Yong¹

(1 College of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China;

2 Department of Neurosurgery, Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China)

Abstract Objective: To observe the effect of activating blood and resolving stasis on injured vascular wnt/ β -catenin in carotid atherosclerosis mode rats and its possible mechanism. **Methods:** After one-month high fat-diet, 32 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, middle dose (dose in clinical equivalent) group and high dose of (2 times the amount of clinical) group. Except for the sham operation group, the other rats underwent carotid artery balloon injury surgery. After 3 days of intraperitoneally administered orally, model group and sham operation group were given equal volume of physiological saline, administered continuously for 14d. Then the expression of wnt, FzD1, AXIN1, GSK-3 β , β -catenin, VEGF mRNA in injured vascular were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR in all groups. **Results:** Compared with the sham operation group, the expression of Wnt, FzD1, AXIN1, β -catenin, and VEGF mRNA levels in model group decreased($P < 0.01$); and after treated by activating blood and resolving stasis therapy, the expression of the above genes increased in different degrees, especially in the high dose group ($P < 0.01 \sim 0.05$); but there was no significant difference among groups on the expression of GSK-3 β mRNA. **Conclusion:** The therapy of activating blood and resolving stasis therapy can increase the expression of VEGF mRNA of balloon injured carotid artery vascular through up-regulating wnt/ β -catenin signal pathway, which suggested that it can protect the injured vascular of carotid atherosclerosis.

Key Words Activating blood and resolving stasis therapy; Carotid atherosclerosis; Injured vascular; wnt/ β -catenin signal pathway

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.034

目前我国心脑血管疾病呈高发上升趋势, 其中动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS) 是其主要的病理学基础。研究表明, 血管内皮细胞(Vascular Endothelial Cells, VECs) 损伤是动脉粥样硬化的始动环节

或关键因素^[1-2]。因此, 保护 VECs 及其功能对预防和治疗 AS 具有重要意义。而 AS 与传统医学的“血瘀”表现极为相似, 活血化瘀中药在临床中大量应用, 对其机制研究表明^[3-4], 活血化瘀中药具有调脂、

基金项目: 福建省教育厅 A 类科技项目(编号: JA13165); 福州市科技计划项目(编号: 2012-S-455-1); 福建中医药大学校管科研项目(编号: X2012018)

作者简介: 余文珍(1977.01—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 代谢性疾病研究, E-mail: 110035632@qq.com

抗炎、抗氧化、保护内皮等作用进而起到抗 AS。我们的前期研究发现,具活血化瘀功效的中药方能有效修复损伤的血管内皮,为进一步探讨其分子机制,本研究以颈动脉球囊损伤大鼠为模型,研究活血化瘀法对损伤血管内皮 Wnt/ β -catenin 经典信号通路上相关信号分子表达的影响,如 wnt、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、轴蛋白 (Axin)、 β -catenin 及下游靶基因血管内皮生长因子 (VEGF) 等,探讨其修复损伤血管内皮的作用机制,为活血化瘀法防治 AS 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,体重 (200 ± 20) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司 (SCXK(沪)2007-0005)。

1.2 中药与试剂、仪器 中药方组成:桃仁 12 g、红花 9 g、当归 9 g、生地黄 9 g、牛膝 9 g、川芎 6 g 等(从福建中医药大学国医堂医院中药房购得)。中药预先浸泡 30 min,后水煎 3 次,再合并水煎液,于水浴锅中浓缩成含生药量 2 g/mL,分装冻存备用。胆固醇(批号:20111108)购自上海惠兴生化试剂有限公司产品;胆酸钠(批号:20110508),购自北京奥博星生物技术有限责任公司。PCR 引物,生工生物工程(上海)有限公司合成。手术显微镜(美国 world precision instruments)。PCR 仪(ABI 7500 型)。

1.3 实验分组及治疗 大鼠予以高脂饲料(自制,配方如下:25% 猪油,2% 胆固醇,0.1% 胆酸钠,72.9% 基础饲料)喂养 1 个月后,随机取 8 只作为假手术组(仅切开颈部皮肤)(A 组);余下均行颈动脉球囊损伤术,再随机分为模型组(B 组, $n=8$ 只)、中药方中剂量(临床等效量)(C 组, $n=8$ 只)和高剂量(临床 2 倍量)(D 组, $n=8$ 只)。并于术后第 4 天开始予以相应药物灌胃治疗(模型组、假手术组予等量生理盐水)2 周后禁食不禁水处死大鼠,取术侧颈总动脉段,迅速置于液氮中,后转移保存在 -70 °C 冰箱中备用。注:大鼠颈动脉球囊损伤模型制备参照 David Anthony 等^[5]方法稍进行改良。术后可在水瓶中加入苜蓿青霉素以通过饮水预防感染,并单笼喂养。另外因未找到合适西药,故未设阳性对照组。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测各组 wnt、FzD1、AXIN1、GSK-3 β 、 β -catenin、VEGF mRNA 的表达 按 Trizol 法提取各组大鼠颈动脉总 RNA,并参照逆转录扩增试剂盒操作程序进行 cDNA 合成。扩增条件为:95 °C 2 min 变性,95 °C 10 s,60 °C 30 s,70 °C,30 s,扩增 40 个循环,获得各样本待测基因的 CT

值,各组间相对基因表达用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 [$\Delta\Delta CT = \text{AVERAGE}(\text{样本 CT 值}) - \text{AVERAGE}(\text{内参 CT 值})$]。采用 ACTB 作为内参照,所用引物序列见表 1。

1.5 统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析,数值均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 代表有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

引物名称	寡核苷酸序列(5'-3')
内参 ACTB	For: CTGCGGCTATCCATGAGA Rev: TACCACCACTGAGAACCGATG
Wnt-1-G2	For: TGATGATGTGGAATGAGGTTG Rev: ATCCAAACTCGTGGCTCTGTAT
FzD1-G3	For: AAGCCAACCTCACAGTATTTTCACC Rev: CACTCCGCTCAGCACATCG
AXIN1-G4	For: TCCAGACCCTTGTCCCTTGAG Rev: GTAGTACGCCACACAGCATGCTG
GSK3B-G5	For: CGCCCGCTCTGACTGAC Rev: CGGAGATCGCAGCGGAA
β -catenin-G6	For: CCACAAGATTACAAGAAACGGCT Rev: ATCCACCAGAGTGAAGAAGACGA
VEGF-G7	For: GAACTTTCTGCTGTCTTGGGCTG Rev: GAACTTCACCACTTCGTGATGATT

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察 假手术组大鼠未见有明显异常改变。模型组大鼠术后前 3 d 大鼠精神较差,后稍有好转,但毛发欠光泽,体重增长缓慢,未见感染死亡现象。中药方治疗组大鼠较模型组大鼠毛色光泽,活动度较好。

2.2 各组 wnt、FzD1、AXIN1、GSK-3 β 、 β -catenin、VEGF mRNA 的表达比较 用 QPCR 方法检测上述基因表达,结果显示各引物溶解曲线(图 1)均呈现单峰,说明其具有较强的特异性。每个样品扩增曲线(图 2)呈 S 形,CT 值 ≤ 30 ,均阳性,抛物线平滑,基线平坦,并经指数扩增期依次达平台期,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析统计相对表达值。定量分析显示,与假手术组比较,模型组 wnt、FzD1、AXIN1、 β -catenin、VEGF 等 mRNA 水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。药物干预后,上述各基因 mRNA 水平均有不同程度升高,尤其是高剂量组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05 \sim 0.01$);只有 GSK-3 β mRNA 水平各组无明显差异。(图 1、图 2 表 2)

3 讨论

中医学认为“久病必有瘀,怪病必有瘀”,而 AS 的发生是一个长期的过程,最终导致脏腑功能失调,故而治疗上当以活血化瘀为主^[6-7]。田金洲等对脑梗死患者进行中医证候分析,发现分型属血瘀证的

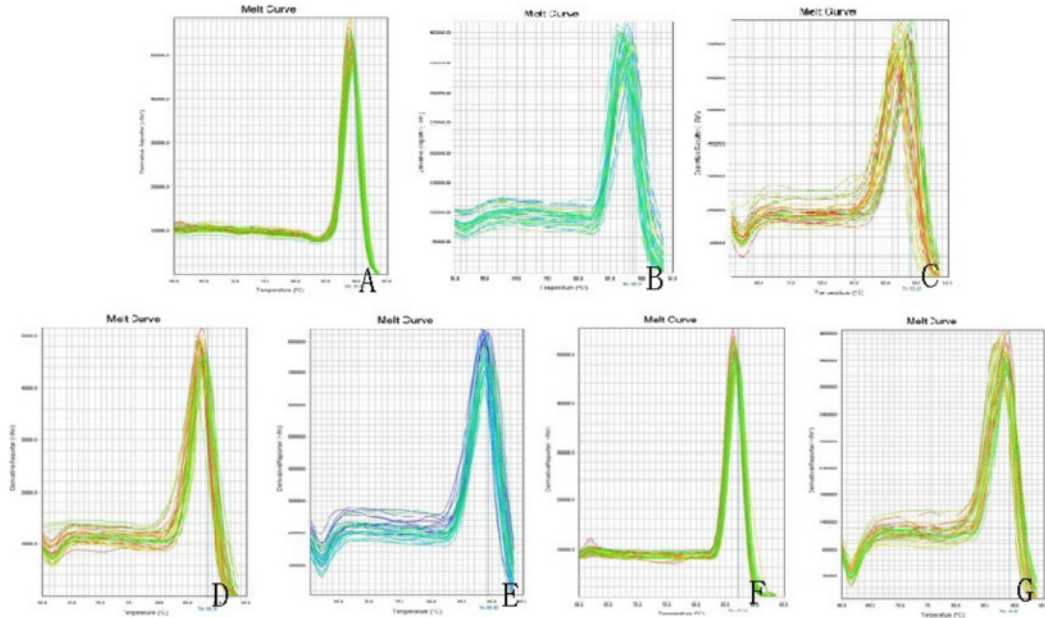


图 1 相关基因溶解曲线

注: A 为 ACTB; B 为 Wnt-1-G2; C 为 FzD1-G3; D 为 AXIN1-G4; E 为 GSK3β-G5; F 为 β-catenin-G6; G 为 VEGF-G7; 下图同

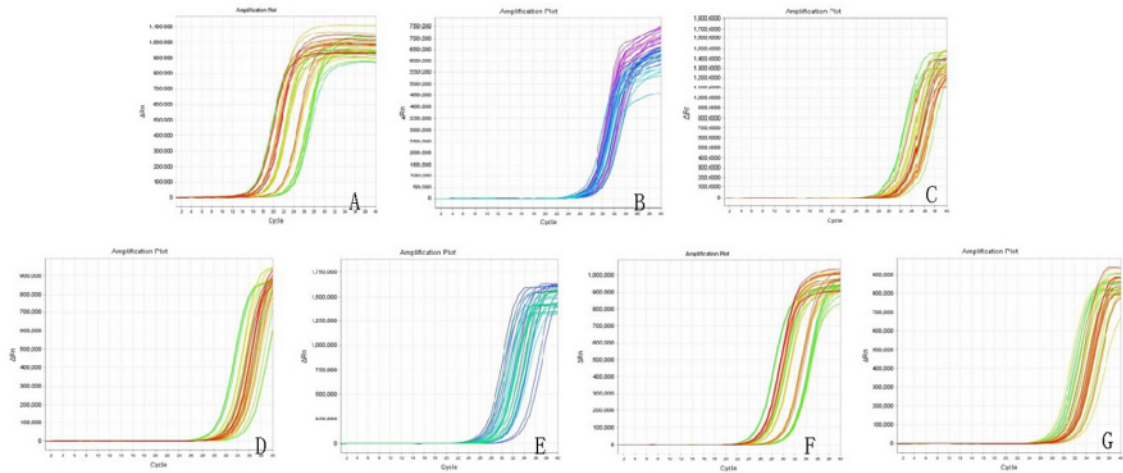


图 2 相关基因扩增曲线

表 2 各组 wnt、FzD1、AXIN1、GSK-3β、β-catenin、VEGF mRNA 相对表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	假手术组 (A)	模型组 (B)	中药中剂量组 (C)	中药高剂量组 (D)
只数	8	8	8	8
wnt	1.0000 ± 0.1442	0.3191 ± 0.0464 **	0.7239 ± 0.0940 **△△	0.4493 ± 0.0403 **△△
FzD1	1.0000 ± 0.1792	0.0065 ± 0.0004 **	0.0226 ± 0.0014 **	0.1238 ± 0.0099 **△
AXIN1	1.0000 ± 0.0791	0.0208 ± 0.0014 **	0.2799 ± 0.0365 **△△	0.6699 ± 0.0357 **△△
GSK-3β	1.0000 ± 0.0815	1.0269 ± 0.0975	0.9833 ± 0.1122	0.9731 ± 0.0732
β-catenin	1.000 ± 0.1402	0.7843 ± 0.0471 **	0.8482 ± 0.0942 **	0.9539 ± 0.0894 △△
VEGF	1.0000 ± 0.0425	0.4304 ± 0.0354 **	0.6072 ± 0.0457 **△△	0.7407 ± 0.0710 **△△

注: 与 A 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ 。

患者中有 78.6% 颈动脉超声检查有颈动脉斑块, 而无血瘀证的只有 57.4% 有颈动脉斑块, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 经统计分析认为颈动脉粥样硬化和血瘀证成正相关性^[8]。故而本课题采用活血化瘀中药方干预颈动脉粥样硬化。

内皮细胞是构成血管壁的生物屏障, 在 AS 病变的发生上有重大意义^[9]。而一般认为颈动脉粥样硬化较冠状动脉粥样硬化要早, 与动脉硬化大约同时进行, 它是脑血管病重要的危险因素之一^[10]。颈动脉粥样硬化的治疗方法有颈内动脉切

除术(CEA)、颈动脉血管成形支架置入术(CAS)、经皮腔内动脉成形术(PTA)等^[11]。这些治疗方法均有可能损伤血管内皮,引起内皮细胞功能紊乱。本研究采用的动物模型是先高脂喂养以造成血脂升高,后借助球囊损伤血管以模拟颈动脉粥样硬化血管内皮损伤进而导致功能紊乱。Wnt/ β -catenin 信号通路在正常细胞中无激活,在生物进化中极为保守,其异常表达与人类疾病关系密切^[12-13]。目前研究表明血管发生与 Wnt/ β -catenin 信号通路有着密切的联系,该信号通路可能成为未来血管内皮细胞相关疾病治疗的新靶点^[14-15]。Wnt/ β -catenin 信号通路可以分为经典型和非经典型途径。经典 Wnt 蛋白(含 Wnt1、Wnt3A 和 Wnt8 等)与膜受体卷曲蛋白(Frizzled)结合,从而抑制 Gsk-3 β 与 Axin 的表达,降低 β -catenin 的磷酸化^[16]。 β -catenin 是一种多功能蛋白,可以作为血管内皮和 N-钙粘素和肌动蛋白细胞骨架之间的支架,在存在 Wnt 配体时,可使其稳定并转位到细胞核以促进转录,激活靶基因 VEGF 等转录,控制血管稳定性^[17-19]。

本实验结果表明,球囊损伤大鼠血管 wnt 配体(wnt1)、wnt 受体(Fzd1)、Axin 及 β -catenin mRNA 表达水平均较正常血管下降;经活血化瘀中药方干预后,模型大鼠损伤血管上述基因表达水平均有不同程度升高,特别是高剂量组,与模型组比较有显著促进作用($P < 0.05 \sim 0.01$),表明其具有一定的剂量依赖性。Gsk-3 β 蛋白是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键分子,起负性调控作用,其可调节 β -catenin 进入细胞核的量,防止细胞功能出现异常^[20]。本研究结果显示在 Gsk-3 β 基因表达水平方面各组差异无统计学意义,提示该模型 Gsk-3 β 基因未出现表达异常。VEGF 与血管内皮特异性受体结合后,可促进血管内皮细胞进行有丝分裂,导致内皮细胞增生,形成新生血管^[21]。在本研究中发现,活血化瘀中药方能促进 VEGF 基因的表达,提示其具有修复损伤血管的作用,这可能与促进上述 wnt/ β -catenin 信号通路中关键信号分子的表达有关。

参考文献

[1] Tomczyk M, Nowak W, Jazwa A. Endothelium in physiology and pathogenesis of diseases [J]. Postepy biochem 2013, 59(4): 357-364.
 [2] 田海涛, 曹芳英, 朱智明, 等. 心血管疾病不容忽视的问题: 血管内皮细胞损伤 [J]. 转化医学杂志 2013, 2(3): 173-177.
 [3] 盛松, 徐凤芹. 活血化瘀中药抗动脉粥样硬化的作用机制研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志 2013, 11(5): 591-592.

[4] 王景尚, 黄焯. 活血化瘀中药干预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(12): 1501-1503.
 [5] David Anthony Tulis, M. S., Ph. D., F. A. H. A. Histological and morphometric analyses for rat carotid artery balloon injury studies [J]. Methods Mol Med 2007, 139: 31-66.
 [6] 曹田梅, 张李兴, 颜新. 化瘀法探源及国医大师颜德馨对活血化瘀理论的创新贡献 [J]. 深圳中西医结合杂志 2013, 23(5): 292-294.
 [7] 张磊, 颜新. 国医大师颜德馨治疗心系疾病气血精神层次用药分析 [J]. 长春中医药大学学报 2014, 30(4): 625-627.
 [8] 田金洲, 时晶, 倪敬年, 等. 脑梗塞患者颈动脉斑块与血瘀证的相关性研究 [J]. 中华中医药杂志 2007, 22(3): 149-152.
 [9] Antohe F. Endothelial cells and macrophages, partners in atherosclerotic plaque progression [J]. Arch Physiol Biochem 2006, 112(45): 245-253.
 [10] 缪惠宁, 王艳飞, 王雨水, 等. 冠心病患者冠状动脉粥样硬化程度与颈动脉粥样硬化的相关性研究 [J]. 中国心血管病研究杂志 2014, 12(10): 911-914.
 [11] 朱健, 陈吉祥, 郭大乔. 颅外段颈动脉狭窄的治疗策略 [J]. 中国微创外科杂志 2014, 14(11): 1005-1007.
 [12] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. Cell, 2012, 149(6): 1192-205.
 [13] Roderick J. Tan, Dong Zhou, Lili Zhou, et al. Wnt/ β -catenin signaling and kidney fibrosis [J]. Kidney international supplements, 2014, 4(1): 84-90.
 [14] 程华, 孙芳玲, 艾厚喜, 等. Wnt 信号通路与血管发生研究进展 [J]. 神经药理学报 2011, 1(6): 60-63.
 [15] Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, et al. The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ β -catenin signaling [J]. Dev Cell 2015, 32(1): 82-96.
 [16] Dawson K, Afkari M, Nattel S. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential [J]. J Physiol 2013, 591(6): 1409-1432.
 [17] Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, et al. The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ β -catenin signaling [J]. Dev Cell 2015, 32(1): 82-96.
 [18] Reis M, Liebner S. Wnt signaling in the vasculature [J]. Exp. Cell Res. 2013, 319(9): 1317-1323.
 [19] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis [J]. Circ. Res. 2010, 107(8): 943-952.
 [20] Maiese Kenneth, Li Faqi, Chong Zhaozhong, et al. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? [J]. Pharmacology and Therapeutics 2008, 118(2): 58-81.
 [21] Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, et al. VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis [J]. Dev Dyn 2004, 230(1): 23-33.

(2015-07-10 收稿 责任编辑: 王明)