

哌唑嗪对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块内 MMP-1 和 TIMP-1 表达的影响*

陈玲, 于杨, 陈曼华[△]

(武汉市中心医院心内科, 武汉 430014)

[摘要] **目的** 观察哌唑嗪对 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化斑块中基质金属蛋白酶-1(MMP-1)及基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)表达的影响,探讨哌唑嗪的抗动脉粥样硬化作用及其机制。**方法** 将 24 只 8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠随机分为正常饮食组、高脂饮食组、哌唑嗪组,各 8 只,正常饮食组给予普通饲料喂养,高脂饮食组与哌唑嗪组均给予高脂饮食;于实验第 2 周开始,哌唑嗪组在高脂饮食基础上每日灌胃盐酸哌唑嗪(1 mg/kg),正常饮食组与高脂饮食组每日灌胃等体积生理盐水。12 周后,腹主动脉取血检测各组血脂水平,另取主动脉标本采用免疫组织化学法测定 MMP-1 与 TIMP-1 表达水平,并进行比较分析。**结果** 与高脂饮食组比较,哌唑嗪组血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平均降低,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);高脂饮食组小鼠主动脉内膜粥样斑块面积和内膜厚度均较正常饮食组明显增加,而哌唑嗪组明显抑制斑块形成和内膜增生;与正常饮食组比较,高脂饮食组、哌唑嗪组 MMP-1 蛋白表达水平升高,TIMP-1 蛋白表达水平降低,且哌唑嗪组 MMP-1 蛋白表达水平低于高脂饮食组,TIMP-1 蛋白表达水平高于高脂饮食组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 哌唑嗪能够降低 TC、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,具有一定的抗动脉粥样硬化作用,且其机制可能还与降低斑块内 MMP-1 表达水平,增加 TIMP-1 表达水平有关。

[关键词] 哌唑嗪;动脉粥样硬化;基质金属蛋白酶-1;基质金属蛋白酶组织抑制剂-1

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)19-2606-04

Effect of prazosin on MMP-1 and TIMP-1 expression in atherosclerosis plaque of ApoE^{-/-} mice model^{*}

Chen Ling, Yu Yang, Chen Manhua[△]

(Department of Cardiology, Wuhan Municipal Central Hospital, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of prazosin on matrix metalloproteinase-1(MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) expression in atherosclerosis plaque of ApoE knock-out(ApoE^{-/-}) mice model and to explore its anti-atherosclerotic effect and mechanism. **Methods** Twenty-four 8-week-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into the normal diet group, high-fat diet group and prazosin group, 8 cases in each group. The normal diet group was fed by common fodder, while the high fat group and prazosin group were fed by high fat diet; on the basis of the high fat diet, the prazosin group was started to conduct gavage of prazosin hydrochloride 1 mg/kg every day, while the normal diet group and the high fat diet group were daily gaged by the same volume of normal saline. The abdominal aortic venous blood after 12 weeks in each group was collected for detecting the blood lipid levels. The aorta arterial blood sample was collected for detecting MMP-1 and TIMP-1 expression levels by immunohistochemistry. **Results** Compared with the high fat diet group, the levels of serum TG, TC and LDL-C in the prazosin group were significantly decreased, and the HDL-C level was increased, the differences were statistically significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the area of aorta arterial atherosclerotic plaque and intima thickness were significantly increased, while prazosin could significantly inhibit the plaque formation and intima hyperplasia; compared with the normal diet group, the expression level of MMP-1 protein in the high fat diet group and prazosin group was significantly increased, while the TIMP-1 protein expression level was decreased, moreover the MMP-1 protein expression level in the prazosin group was lower than that in the high fat diet group, while the TIMP-1 protein expression level was higher than that in the high fat diet group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Prazosin can decrease the level of TC and LDL-C, increase the HDL-C level and has certain anti-atherosclerotic effect, its mechanism may be related with the decrease of the MMP-1 level and the increase of the TIMP-1 level in plaque.

[Key words] prazosin; atherosclerosis; matrix metalloproteinase-1; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1

哌唑嗪为选择性突触后 α_1 受体阻滞剂,能扩张周围血管,使周围血管阻力降低,起降压作用,亦能扩张动脉和静脉,降低心脏的前负荷与后负荷,还可用于治疗心力衰竭,多项临床观察提示 α_1 受体阻滞剂可能还具有改善脂质代谢、抗动脉粥样硬化的作用^[1-2]。笔者前期研究发现, α_1 受体阻滞剂能降低血清总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)水平,并有抗动脉粥样硬化

的作用^[3-4]。本研究通过观察选择性的 α_1 受体阻滞剂哌唑嗪对 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化斑块内基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1)表达的影响,探讨哌唑嗪抗动脉粥样硬化作用的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠(C57B/6J 背景)24 只购自北京华阜康公司,饲养于华中科技大学同济医学院动物中心无特定病原体(SPF)级环境。

1.2 仪器与试剂 普通饲料和高脂饲料均由华中科技大学实验动物中心加工制作。高脂饲料配方:82.3%基础饲料、2.0%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5.0%白糖、10.0%猪油,普通饲料配方为小鼠生长繁殖期标准配方。盐酸哌啶嗪片购自上海信谊药厂有限公司,MMP-1 和 TIMP-1 多克隆抗体购自武汉博士德公司;全自动生化分析仪购自日本 Olympus 公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(P0202)购自碧云天生物公司,Olympus BX51 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方 法

1.3.1 分组与模型的建立 24 只小鼠随机分为 3 组(各 8 只):正常饮食组、高脂饮食组、哌啶嗪组。正常饮食组给予不含胆固醇的繁殖饲料(普通饲料)喂养,高脂饮食组与哌啶嗪组均给予高脂饮食。其中哌啶嗪组在适应性喂养 1 周后,于实验第 2 周开始在高脂饮食基础上每日定时以盐酸哌啶嗪 1 mg/kg 灌胃(将盐酸哌啶嗪片溶解于 10 mL 生理盐水中),正常饮食组与高脂饮食组每日灌胃等体积生理盐水,共 12 周。

1.3.2 处理方法 所有小鼠于 12 周后禁食不禁水 1 夜,腹腔注射戊巴比妥(1 mg/kg)处死。取小鼠全血,静止后取血清。小鼠麻醉后处死,分离主动脉瓣至髂肾动脉分支动脉组织,在相同部位取一段长约 1 cm 的主动脉,由 4% 多聚甲醛[含 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)]固定。

1.3.3 检测指标及方法 各组 TG、TC、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)应用生化分析仪进行检测,所有操作步骤按仪器说明书进行。常规脱水,用石蜡包埋,每份标本连续切片 5 μm(40 张),每 5 张取 1 张,共取 8 张切片,经苏木素-伊红(HE)染色后在光镜下观察主动脉的形态学变化,用 Image G 多功能图像分析软件分析主动脉斑块面积/血管内膜表面积比值。染色检测斑块内 MMP-1 和 TIMP-1 的表达。免疫组织化学:脱蜡、水化组织切片,3% 过氧化氢(H₂O₂)去离子水孵育 5 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。滴加一抗(1:100),37℃ 孵育 2 h,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。滴加二抗羊抗兔 IgG,室温或 37℃ 孵育 20 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min,应用 DAB 溶液显色。蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明封片。每组随机选取 5 张免疫组织化学切片,光镜下观察细胞上呈现棕色着色者判为阳性细胞,每张切片选择阳性目标最多的区域,采取 3 个视野,采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行吸

光度分析。采用蛋白质印迹法(Western blotting)测定小鼠主动脉组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白水平,操作步骤参照核蛋白提取试剂盒说明书及文献[4],从各组主动脉组织中取适量冷冻的血管组织剪碎、匀浆,提取核蛋白测定,用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 哌啶嗪对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平的影响 饲养 12 周后,3 组血清 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与正常饮食组比较,高脂饮食组血清 TC、TG 及 LDL-C 水平增高,HDL-C 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与高脂饮食组比较,哌啶嗪组血清 TC、TG 及 LDL-C 水平均降低,HDL-C 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 1。

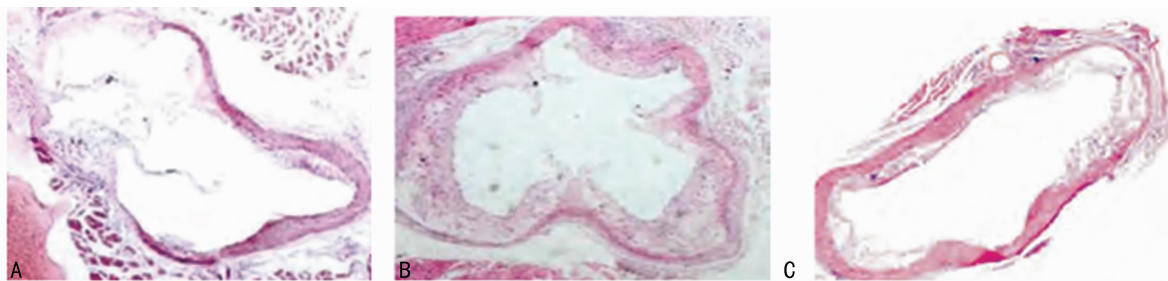
表 1 3 组 ApoE^{-/-} 小鼠各项血脂指标水平比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
正常饮食组	5.29±0.92	1.85±0.51	3.53±0.68	0.96±0.32
高脂饮食组	18.64±2.13*	2.42±0.72*	15.25±0.65*	0.72±0.12#
哌啶嗪组	12.78±1.56 [△]	1.98±0.63 [▲]	9.82±1.02 [△]	0.91±0.23 [▲]

*: $P < 0.01$, #: $P < 0.05$,与正常饮食组比较;[△]: $P < 0.01$,[▲]: $P < 0.05$,与高脂饮食组比较。

2.2 3 组小鼠主动脉形态学改变 光学显微镜下观察,正常饮食组可见少量粥样硬化斑块;高脂饮食组内膜出现明显增厚,可见大量粥样硬化斑块;哌啶嗪组可见内膜厚度较高脂饲料组明显变薄,粥样硬化斑块较高脂饲料组明显减少。见图 1。

2.3 3 组主动脉斑块面积/血管内膜表面积比值比较 ApoE^{-/-} 小鼠均见动脉粥样斑块形成,管腔呈不同程度的狭窄。与正常饮食组(0.162±0.023)比较,高脂饮食组小鼠主动脉斑块面积/血管内膜表面积比值(0.653±0.046)增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);而与高脂饮食组比较,哌啶嗪组小鼠主动脉斑块面积/血管内膜表面积比值(0.332±0.035)减小,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



A: 正常饮食组;B: 高脂饮食组;C: 哌啶嗪组。

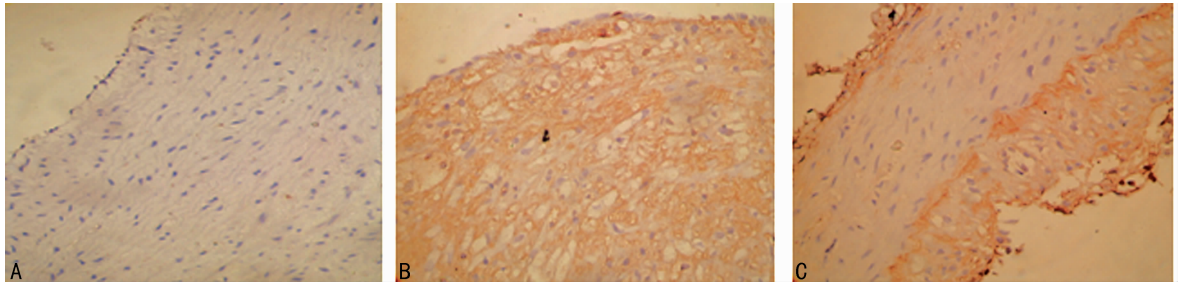
图 1 3 组小鼠主动脉内膜 HE 染色(×40)

2.4 3 组斑块内 MMP-1 及 TIMP-1 表达水平比较 实验结束后各组小鼠血管壁免疫组织化学染色显示,呈棕黄色颗粒,

MMP-1、TIMP-1 均为阳性。与正常饮食组比较,高脂饮食组和哌啶嗪组 MMP-1 在小鼠斑块及血管内、中、外膜细胞染色

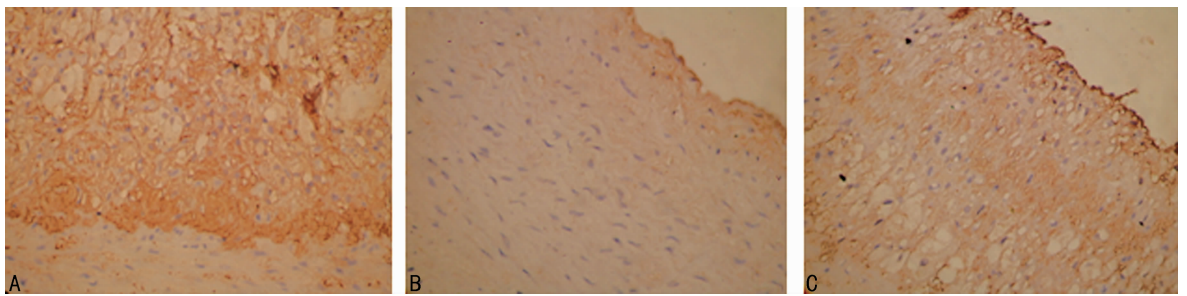
阳性表达增加,哌唑嗪组与高脂饮食组比较,MMP-1 阳性表达减少;与正常饮食组比较,TIMP-1 在高脂饮食组和哌唑嗪组表达减少,哌唑嗪组与高脂饮食组比较,TIMP-1 阳性表达增加。见图 2、3。与正常饮食组比较,高脂饮食组小鼠斑块内

MMP-1 平均吸光度值上升,斑块内 TIMP-1 平均吸光度值下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与高脂饮食组比较,哌唑嗪组斑块内 MMP-1 平均吸光度值下降,斑块内 TIMP-1 平均吸光度值上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。



A: 正常饮食组; B: 高脂饮食组; C: 哌唑嗪组。

图 2 3 组小鼠斑块及周围血管壁 MMP-1 的表达(光学显微镜, $\times 400$)



A: 正常饮食组; B: 高脂饮食组; C: 哌唑嗪组。

图 3 3 组小鼠斑块及周围血管壁 TIMP-1 的表达(光学显微镜, $\times 400$)

表 2 3 组小鼠斑块内 MMP-1 及 TIMP-1 的吸光度值比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MPP-1	TIMP-1
正常饮食组	0.002 8 \pm 0.000 3	0.086 2 \pm 0.005 3
高脂饮食组	0.088 7 \pm 0.006 2*	0.010 3 \pm 0.001 6*
哌唑嗪组	0.038 5 \pm 0.003 4#	0.043 2 \pm 0.003 8#

*: $P < 0.01$, 与正常饮食组比较; #: $P < 0.05$, 与高脂饮食组比较。

表 3 3 组小鼠主动脉组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MPP-1/ β -actin	TIMP-1/ β -actin
正常饮食组	0.29 \pm 0.05	0.92 \pm 0.18
高脂饮食组	0.87 \pm 0.16*	0.32 \pm 0.06*
哌唑嗪组	0.58 \pm 0.09#	0.69 \pm 0.08#

*: $P < 0.01$, 与正常饮食组比较; #: $P < 0.05$, 与高脂饮食组比较。

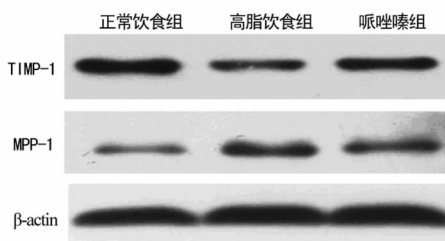


图 4 3 组小鼠主动脉组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白电泳图

2.5 3 组小鼠主动脉组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达水平比较 Western blotting 检测结果显示:与正常饮食组比较,高

脂饮食组小鼠主动脉组织 MMP-1 蛋白表达水平上升,TIMP-1 蛋白表达水平下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与高脂饮食组比较,哌唑嗪组主动脉组织 MMP-1 蛋白表达水平下降,TIMP-1 蛋白表达水平上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 4。

3 讨论

多因素综合作用造成动脉粥样硬化的发生,有研究表明,炎症反应与动脉粥样硬化的关系比目前已知的其他任何因素更为密切^[5]。ApoE^{-/-}小鼠缺乏清除极低密度脂蛋白和乳糜微粒受体的配体,血液循环中脂类物质容易累积,机体氧化和抗氧化平衡被破坏,易于诱导全身低程度炎症反应,所以是目前研究动脉粥样硬化的主要基因工程动物^[6]。本实验通过给予 ApoE^{-/-}小鼠高脂饮食,加剧诱导炎症反应,成功地诱导局部大面积动脉粥样硬化斑块的形成。结果表明,哌唑嗪能够降低 TC、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,并通过 HE 染色观察到高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块的面积在使用哌唑嗪后明显减少。

动脉粥样硬化是由多种炎症介质介导的一种慢性炎症反应,其进展过程中始终伴随着细胞外基质(extracellularmatrix, ECM)的重构,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增生与迁移,分泌大量的 ECM^[7]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组同源的酶活性依赖钙离子(Ca²⁺)和锌离子(Zn²⁺)的中性蛋白酶,主要由巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞分泌,这些酶原状态的 MMPs 可被细胞因子如白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素(IFN)、血小板源性生长因子刺激激活。活化的 MMPs 能特异性地与 ECM 各成分相结合,降解胞外基质,促进斑块破裂^[8]。MMP-1 在动脉粥样硬化斑块内主要裂解纤维帽中的

I、II 和 III 型胶原纤维。有研究表明,动脉粥样硬化的形成及发展过程也是 ECM 重建的过程,在动脉粥样硬化形成的不同阶段和不同部位,ECM 的合成与降解速度是不同的,当动脉粥样硬化斑块内的炎症反应增强,ECM 的降解速度大于合成速度时,斑块表面的纤维帽变薄,对机械外力的抵抗作用减弱,最终会导致斑块破裂^[9]。基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMP)能够平衡这一作用,不但能够抑制 MMPs 活性,而且参与组织结构的建立与维持,决定平滑肌细胞周围的基质蛋白裂解程度^[10]。TIMP-1 在生理状态下主要由平滑肌细胞表达,在体内通过结合 MMP-1 形成非共价的复合物,阻断 MMP-1 与底物的结合,从而限制 MMP-1 降解胶原的作用^[11]。本实验主动脉 MMP-1、TIMP-1 免疫组织化学染色显示,相较于正常饮食组,高脂饮食组、哌啶嗪组的 MMP-1 蛋白表达水平升高, TIMP-1 蛋白表达水平降低,且哌啶嗪组 MMP-1 蛋白表达水平明显低于高脂饮食组, TIMP-1 蛋白表达水平明显高于高脂饮食组,提示哌啶嗪能降低斑块内 MMP-1 蛋白水平的表达,增加 TIMP-1 蛋白水平的表达,从而延缓动脉粥样斑块的发展,提高斑块的稳定性,这可能也是哌啶嗪抗动脉粥样硬化的机制之一。

降脂药物在临床已经被广泛运用于动脉粥样硬化的预防治疗,效果确切,但临床上患者常合并多种疾病,如何应用单一用药实现多功效及个体化用药的问题尚需进一步探讨。选择性的 $\alpha 1$ 受体阻滞剂哌啶嗪是临床常见降压药,本研究通过探讨哌啶嗪降压外的调脂和抗动脉粥样硬化作用,挖掘这种老药的新用途,为临床高血压合并高脂血症及动脉粥样硬化的患者,在用药选择方面提供新的思路,也为临床防治动脉粥样硬化提供一种新的选择。

参考文献

- [1] Bur A, Woisetschlager C, Herkner H, et al. Effects of terazosine and atenolol on serum lipids in essential hypertension[J]. *Z Kardiol*, 2002, 91(9): 685-692.
- [2] 胡发明. 哌啶嗪对非胰岛素依赖型糖尿病伴高血压患者血压, 血糖和血脂代谢的影响[J]. *世界临床药物*, 1992,

13(2):118-119.

- [3] 陈玲, 陈曼华, 裘琳, 等. 特拉唑嗪的调脂和抗动脉粥样硬化作用及对热休克蛋白 70 表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(5): 378-382.
- [4] 陈玲, 陈曼华, 汪亚芸, 等. 特拉唑嗪对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(4): 713-715.
- [5] Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. C-reactive protein and myocardial infarction[J]. *J Clin Epidemiol*, 2002, 55(5): 445-451.
- [6] Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis[J]. *Science*, 1996, 272(5262): 685-688.
- [7] Cui L, Feng L, Zhang ZH, et al. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF- κ B pathway activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 294-303.
- [8] Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, et al. Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 70-79.
- [9] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis; the good, the bad, and the ugly[J]. *Circ Res*, 2002, 90(3): 251-262.
- [10] Tun X, Yasukawa K, Yamada K. Involvement of nitric oxide with activation of Toll-like receptor 4 signaling in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014(74): 108-117.
- [11] 余丹青, 陈纪言, 李光, 等. 基质金属蛋白酶与冠状动脉斑块稳定性相关研究[J]. *中国循环杂志*, 2003, 18(2): 105-107.

(收稿日期: 2016-01-12 修回日期: 2016-03-15)

(上接第 2598 页)

于大学生心理韧性与主观幸福感干预措施的研究,可立足于心理韧性与主观幸福感影响因素,综合考虑文化、人格、兴趣、价值观等个体特征,从认知、行为和意志等多维度多层次设计干预方案。

参考文献

- [1] 尹秋云. 积极心理学视野下心理健康教育课程的错位与开发[J]. *黑龙江高教研究*, 2010, 29(12): 166-168.
- [2] 席居哲, 左志宏, 桑标. 心理韧性儿童的社会能力自我感知[J]. *心理学报*, 2011, 43(9): 1026-1037.
- [3] 张进, 马月婷. 主观幸福感概念、测量及其与工作效能变量的关系[J]. *中国软科学*, 2007, 22(5): 60-68.
- [4] 曹科岩. 大学生心理弹性与心理健康的关系[J]. *教育评论*, 2013, 29(3): 78-80.
- [5] 杨欣, 张文. 心理韧性的心理健康教育价值[J]. *教育科学研究*, 2010, 21(8): 65-67.
- [6] 叶星. 高职大学生主观幸福感影响因素及提升策略[J]. *学校党建与思想教育(普教版)*, 2015, 33(10): 79-81.

- [7] 胡月琴, 甘怡群. 青少年心理韧性量表的编制和效度验证[J]. *心理学报*, 2008, 40(8): 902-912.
- [8] 丁新华, 王极盛. 青少年主观幸福感研究述评[J]. *心理科学进展*, 2004, 12(1): 59-66.
- [9] 毛振明, 王长权. 学校心理拓展训练[M]. 北京: 北京体育大学出版社, 2004: 41-115.
- [10] 方双虎, 徐英武. 大学生心理健康教育与拓展训练[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2012: 87-154.
- [11] 吴晓光. 成都市高校体育教学中融入拓展训练的意义及可行性分析[J]. *科技展望*, 2014, 12(8): 9.
- [12] Rutter M. Implications of resilience concepts for scientific understanding[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006(1094): 1-12.
- [13] 张婷, 李惠萍, 王德斌. 心理韧性 10 年文献回顾及其对心理护理的启示[J]. *护理学报*, 2014, 21(3): 73-75.
- [14] Olsson CA, Bonda L, Burns JM, et al. Adolescent resilience: a concept analysis[J]. *J Adolesc*, 2003, 26(1): 1-11.

(收稿日期: 2016-01-11 修回日期: 2016-03-21)