

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000392

SDF-1/CXCR 4 在槲皮素抗 ApoE-/- 小鼠
动脉粥样硬化形成过程中的作用查克岚¹, 李家富¹, 曾 瑜²

(1. 四川省泸州医学院附属医院心血管内科, 泸州 646000; 2. 重庆市第七人民医院心内科, 重庆 400039)

【摘要】目的:探讨槲皮素对 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化形成及基质细胞衍生因子-1(stromal derived factor-1, SDF-1)及其特异性受体 CXCR 4 表达的影响, 为槲皮素抗动脉粥样硬化提供实验依据。**方法:**40 只 6 周龄的 ApoE-/- 小鼠随机分为: 正常对照组、模型对照组和实验组(槲皮素低、中、高剂量组), 于给药后第 10、20 周取材, HE 染色观察动脉粥样硬化病变情况; ELISA 法、免疫组织化学技术及 real-time PCR 检测 SDF-1 和 CXCR 4 的蛋白和基因表达情况。**结果:**(1)HE 染色发现正常对照组无粥样斑块形成; 实验组与模型对照组相比动脉粥样斑块病变明显减轻。(2)免疫组化结果显示相同时间点比较, 正常对照组: SDF-1 主要表达于内皮细胞和平滑肌细胞, CXCR 4 主要表达于内皮细胞, 但细胞着色浅, 表达量少; 模型对照组: 平滑肌细胞以及泡沫细胞呈深棕黄色, 显示 SDF-1 和 CXCR 4 有大量表达; 槲皮素组: 高中低剂量的 3 个实验组与模型对照组比较, 细胞着色较浅, 表达量均有减少($P=0.010$); 与正常对照组比较, 低剂量组、中剂量组有统计学差异($P=0.000$)。不同时间点比较, SDF-1 在模型对照组的表达量随时间延长而增加($P=0.000$)。(3)ELISA 检测血清中 SDF-1 和 CXCR 4 水平, real-time PCR 检测 SDF-1 和 CXCR 4 的 mRNA 基因表达结果: 在相同时间点比较, SDF-1 及 CXCR 4 在模型对照组中表达最高(与其余各组比较 $P=0.000$), 正常对照组表达最低, 槲皮素组介于两者之间, 且随着药物剂量的增加 SDF-1 和 CXCR 4 表达量进行性下降, 尤其是 CXCR 4 在高剂量组与正常对照组比较无统计学差异($P>0.05$); 不同时间点相同组比较, 模型对照组的 SDF-1 和 CXCR 4 均随时间延长而增加($P=0.00$), 槲皮素组和正常对照组无明显的时间依赖性。**结论:**(1)SDF-1/CXCR 4 可能促进血管平滑肌细胞增殖以及迁移至内膜, 从而使内膜增厚和泡沫细胞形成, 导致粥样斑块形成。(2)槲皮素可能通过抑制 SDF-1 与 CXCR 4 的表达从而抑制 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化形成。

【关键词】槲皮素; 动脉粥样硬化; 基质细胞衍生因子-1; 基质细胞衍生因子受体**【中图分类号】**R543**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-17Role of SDF-1/CXCR 4 in the process of quercetin against atherosclerosis
in ApoE-/- miceZha Kelan¹, Li Jiafu¹, Zeng Yu²

(1. Department of Cardiovascular Medicine, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College;

2. Department of Cardiovascular Medicine, The 7th People's Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To explore quercetin on ApoE^{-/-} mice atherosclerosis formation and expression of stromal derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4, and to provide experimental basis for anti-atherosclerosis of the quercetin. **Methods:** Forty 6-week-old ApoE^{-/-} mice were divided randomly into four groups; normal control, model group and experimental group (with low-dose, mid-dose and high-dose quercetin) and were randomly are sacrificed at the time of the 10 th week and 20 th week after the administration of the drugs respectively. SDF-1 and CXCR 4 protein and gene expressions were measured by ELISA, immunohistochemical technique and real-time PCR. **Results:** (1) HE staining demonstrated no plaque formation in normal group and lighter plaque formation in model group than in high-fat diet group. (2) According to immunohistochemical results at the same time points; in normal group, SDF-1 was mainly existed in endothelial cells and smooth muscle cells and CXCR4 mainly existed in endothelial cells; the expression was few and the staining was light; in model group, there were abundant expression of SDF-1 and CXCR4 in smooth muscle cells and foam

作者介绍: 查克岚, Email: zhakelan@foxmail.com,

研究方向: 高血压、冠心病的基础与临床。

通信作者: 李家富, Email: lijf198@126.com。**基金项目:** 四川省科技计划资助项目(编号: 2012hh0011)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000392.html>cells, appearing in deep brown-yellow color; in experiment group, expressions of SDF-1 and CXCR4 were decreased in all three subgroups than in model group ($P=0.010$). Statistical differences were found between low-dose and mid-dose groups and normal group ($P=0.000$). According to immunohistochemi-

cal results at the different time points, expression of SDF-1 in model group increased in time-dependent manner ($P=0.000$). (3) ELISA results of SDF-1 and CXCR4 level in serum and real-time PCR results of SDF-1 and CXCR4 mRNA expression at the same time points; expression of SDF-1 and CXCR4 was the highest in model group (compared with other groups, $P=0.000$) and was the lowest in normal group. The expression of SDF-1 and CXCR4 progressively decreased with the increase of the dose of quercetin, especially there was no statistical difference in CXCR4 between high-dose group normal group ($P>0.05$). At different time points, SDF-1 and CXCR4 in model group increased in time-dependent manner ($P=0.00$). But no apparent time dependence occurred in experiment group and normal group. **Conclusion:** SDF-1/CXCR 4 may promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration to the intima, so as to thicken the intima, form foam cell and lead to plaque formation. Quercetin may inhibit the expression of SDF-1 and CXCR4 and ApoE -/- mice atherosclerosis formation, which may be one of the mechanisms of its anti- atherosclerosis.

【Key words】quercetin; atherosclerosis; stromal derived factor-1; CXCR 4

动脉粥样硬化是导致心脑血管事件发生的主要病理学变化, 主要累及体循环系统的弹力型动脉和弹力肌型动脉, 其确切的发病机制仍未明确, 研究发现主要与内皮细胞损伤与修复、平滑肌细胞增殖与凋亡、脂质浸润、氧化应激反应、炎症免疫反应以及细胞外基质增生等有关。而基质细胞衍生因子-1 (stromal derived factor-1, SDF-1) 属于 CXC 趋化因子家族, 可与其特异性受体 4 (CXCR 4) 结合, 在动脉粥样硬化过程中可能参与平滑肌细胞的增殖、新生血管形成以及抑制细胞凋亡^[1-4]。槲皮素属于黄酮类化合物, 研究表明其具有抗氧化、降血压、抑制血小板聚集和细胞外基质溶解等多种生物学效应, 存在着广泛的心血管保护作用^[5-6]。本研究通过建立槲皮素抗动脉粥样硬化小鼠模型, 从分子水平上探讨 SDF-1/CXCR 4 在槲皮素抗动脉粥样硬化过程中的作用, 以阐明槲皮素抗动脉粥样硬化的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和设备

槲皮素, 购自Sigma公司, 批号1001182803。TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ II (大连宝生物公司), 兔抗人 SDF-1、CXCR 4 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), SDF-1、CXCR 4 酶联免疫检测试剂盒(RD 公司进口分装), Rever Tra Ace 逆转录试剂盒(成都博瑞克生物技术有限公司), REALTIMEEnvision (丹麦 DaKo 公司), Tannon2500 凝胶图像扫描系统(美国 BIO-RAD 公司), ND-1000 核酸蛋白检测仪(美国 Nanodrop 公司), Mastercycler gradient PCR 仪(Eppendorf), StepOne Plus Real-time PCR System (ABI), 倒置相差显微镜(德国 LEICA 公司), DENLEY DRAGON Wellscan MK 3 (芬兰 Thermo 公司)。

1.2 动物分组和给药

40 只 6 周龄的 ApoE-/- 雄性小鼠, SPF 级, 购于北京大

学动物实验中心, 动物使用许可证号: SCXR(京)2009-0004。另同时选取相同背景的 6 周龄正常 C57BL/6J 雄性小鼠 10 只。每只单笼喂养, 自由饮水, 室内通风良好, 自然光线照明, 室温维持于 26℃~28℃, 湿度相对维持于 70% 左右。

所有小鼠正常喂养 1 周后进行分组, 10 只 C57BL/6J 小鼠为正常对照组(普通饲料), 40 只 ApoE-/- 小鼠随机分为 4 组, 分别为模型对照组(高脂饲料)、槲皮素低剂量组[高脂饲料+槲皮素 50 mg/(kg·d)], 槲皮素中剂量组[高脂饲料+槲皮素 100 mg/(kg·d)], 槲皮素高剂量组[高脂饲料+槲皮素 150 mg/(kg·d)], 每组均为 10 只小鼠($n=10$)。高脂饲料配制方法: 胆固醇 0.5%、蛋黄粉 10%、猪油 10%、普通小鼠饲料 59.5%、蔗糖 20%。根据小鼠体质量算出每只小鼠所需槲皮素剂量, 然后将槲皮素制作成直径为 2 cm 条状药丸, 每天清晨给药。

1.3 实验动物的取材和制备

于分组喂养后第 10、20 周以 1% 戊巴比妥 0.5~1.0 ml 经腹腔麻醉处死小鼠, 每次每组随机处死 5 只小鼠。经眼眶取血约 2 ml, 离心 15 min, 取上层血清 200 μ l, -20℃ 冰箱内保存。取主动脉弓至髂总动脉分叉的整条动脉, 生理盐水冲洗, 于主动脉弓下缘水平切取长 1 cm 主动脉血管, 立即置于 10% 福尔马林溶液中固定, 梯度酒精逐步脱水, 常规石蜡包埋、切片, 切片厚度为 4~5 μ m。剩余标本放入去 RNA 酶的 EP 管中, 置于液氮中备用。

1.4 HE 染色

切片脱蜡, 苏木素染色、冲洗, 1% 盐酸的乙醇中分化, 流水冲洗, 切片于 1% 氨水溶液中, 至细胞核变蓝, 水洗, 伊红染色, 置 1% 伊红溶液中 3 min, 洗去多余伊红, 无水乙醇中脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下观察和采集图像。

1.5 免疫组化

采用免疫组化(Envision 二步法)法, 按说明书操作。结果判断, 光镜下胞浆呈特异性棕黄色颗粒为阳性表达细胞。采用 IPP6.0 图像分析仪行图像分析, 随机选择 3 个高倍镜视野, 测定阳性反应细胞的平均吸光度(absorbance, A)值。

1.6 ELISA 法

按说明书操作, 所有 A 值都应减除空白值后再行计算,

以标准品 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.2、0 $\mu\text{g/ml}$ 为横坐标, A 值为纵坐标, 在坐标纸上作图, 画出标准曲线, 根据样品 A 值在该曲线图上查出相应 SDF-1 和 CXCR 4 的含量。

1.7 Real-time PCR

以 TRIZOL 提取组织总 RNA, 检测总 RNA 纯度及浓度。根据 NCBI 上查询的 Mus SDF-1 和 CXCR 4 基因序列, 设计特异性引物, 由上海生物工程有限公司合成, CXCR 4 引物序列上游为 5'-GAAGTGGGTTCTGGAGACT-3', 下游为 5'-TGT-GATGACAAAGAGGAGGT-3'; SDF-1 引物序列上游为 5'-GTCAGCCTGAGCTACCGA-3', 下游为 5'-GAAGGGCACA-GTTTGGAG-3'; 以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照, 序列上游为 5'-AGGGTGTGATGGTGGGAAT-3', 下游为 5'-CTCGG-TGAGCAGCACAGG-3'。

制作标准曲线。将 cDNA 进行 10 倍梯度稀释, 在 StepOne Plus real-time PCR 仪上进行定量 PCR 反应, 构建标准曲线, 比较基因的扩增效率, 并进行溶解曲线分析。反应体系: 10 μl SYBR Premix Ex TaqTM II (2 $\times$), 0.8 μl SDF-1/CXCR 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.8 μl SDF-1/CXCR 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.4 μl ROX 染料 (50 $\times$)、6 μl dH₂O、2 μl cDNA。

按以下程序进行扩增反应: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 1 次; PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 34 s 共循环 40 次; 融解曲线 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 共循环 1 次。

测定样品中目的基因 Ct 值。将逆转录得到的 cDNA 样品各取 2 μl , 按照同上反应体系和反应条件进行 PCR 扩增,

分别测定各样品目的基因的 Ct 值。

结果分析。反应结束后, 得到扩增曲线和融解曲线, 根据样本 PCR 反应 Ct 值, 通过 StepOne 软件分析, 按 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 相同时间点不同组别之间采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 法, 同一组别不同时间点之间的比较采用配对样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 各组 HE 染色光镜观察结果

见图 1、2。

10 周结果: 正常对照组、槲皮素高剂量组和槲皮素中剂量组均可见动脉壁层次清晰, 内膜光滑, 中膜层弹性纤维和平滑肌细胞排列整齐 (图 1A~C); 槲皮素低剂量组动脉壁结构完整, 但内皮细胞缺失, 内皮下层可见泡沫细胞 (图 1D); 模型对照组内膜增厚, 可见大量胶原纤维和平滑肌细胞、泡沫细胞, 内弹力膜肿胀, 内皮细胞缺失, 中膜层弹性纤维和平滑肌细胞排列紊乱, 纤维斑块形成 (图 1E)。

20 周结果: 正常对照组动脉壁结构正常 (图 2A); 槲皮素高剂量组和中剂量组内皮细胞缺失, 中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列稍紊乱, 偶见平滑肌细胞迁移至内膜, 少量泡沫细胞

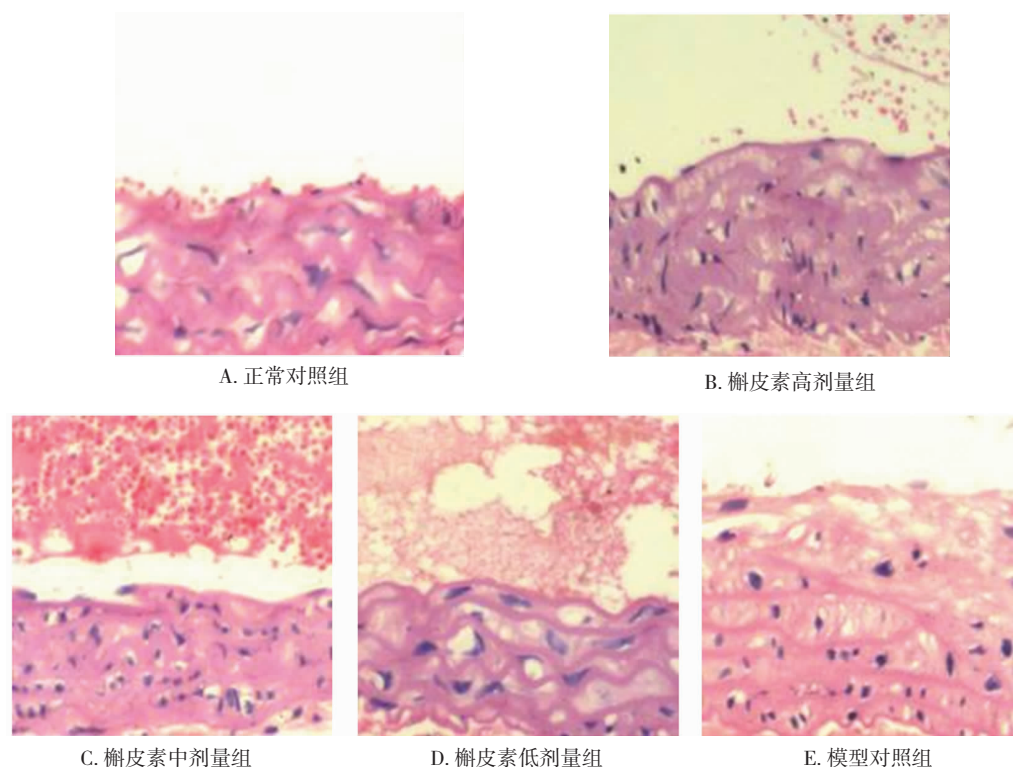


图 1 10 周时各组小鼠主动脉的 HE 染色结果 (HE, 400 $\times$)

Fig.1 HE staining of aorta in each group at the 10th week (HE, 400 $\times$)

胞,但无粥样斑块形成(图 2B、C);低剂量组动脉壁上粥样斑块形成,斑块内可见大量泡沫细胞、内皮细胞、平滑肌细胞以及细胞外基质(图 2D);模型对照组可见内弹力膜断裂,粥样斑块形成,与槲皮素低剂量组比较斑块面积更大,主要由细胞外基质和坏死物组成,平滑肌细胞分散埋藏于细胞外基质,斑块内新生血管形成,中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列紊乱(图 2E)。

2.2 免疫组化法检测 SDF-1 与 CXCR4 的蛋白表达

见图 3~6。

相同时间比较,SDF-1 在正常对照组的内皮细胞和平滑肌细胞上少量表达(图 3A、4A),CXCR4 主要在内皮细胞上表达(图 5A、6A),且着色较浅;SDF-1 和 CXCR4 在模型对照组(图 3C、4C、5C、6C)的平滑肌细胞和粥样斑块内的泡沫细胞上表达呈强阳性,颜色呈深棕黄色。槲皮素 3 组随剂量

增高而表达量下降,3 组与模型对照组比较均有统计学差异($P=0.000$),SDF-1 和 CXCR4 在高剂量组与正常对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。此外,随着时间的延长,模型对照组 SDF-1 与 CXCR4 的表达量均明显增加($P=0.000$),正常对照组与槲皮素高、中、低 3 组在时间上的变化不明显($P>0.05$)。(表 1)。

2.3 ELISA 法检测血清中 SDF-1 与 CXCR4 的表达水平

在相同时间时,正常对照组血清中 SDF-1 和 CXCR4 的表达水平最低,模型对照组最高。槲皮素 3 组的表达水平介于正常对照组和模型对照组之间,且给药剂量与 SDF-1 和 CXCR4 在血清中的表达量呈负相关;槲皮素高、中、低组与模型对照组比较均有统计学差异($P=0.000$)。20 周时,模型对照组 SDF-1 和 CXCR4 的表达量较 10 周明显增高($P=0.000$),其余各组在时间上无统计学差异($P>0.05$)。(见表 2)。

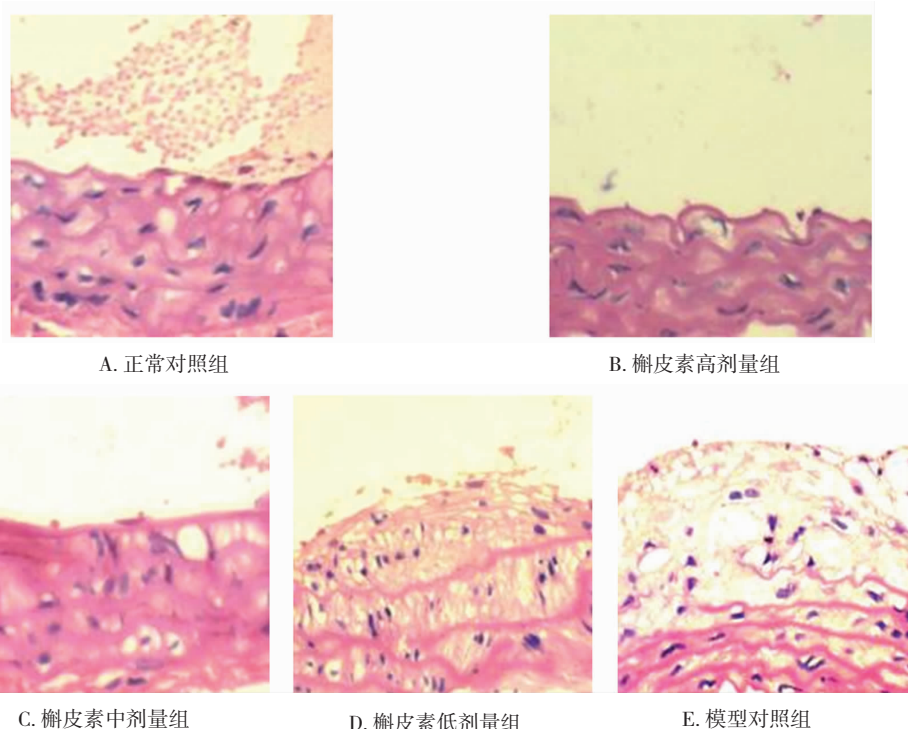


图 2 20 周时各组小鼠主动脉的 HE 染色结果 (HE, 400×)

Fig.1 HE staining of aorta in each group at the 20 th week (HE, 400×)

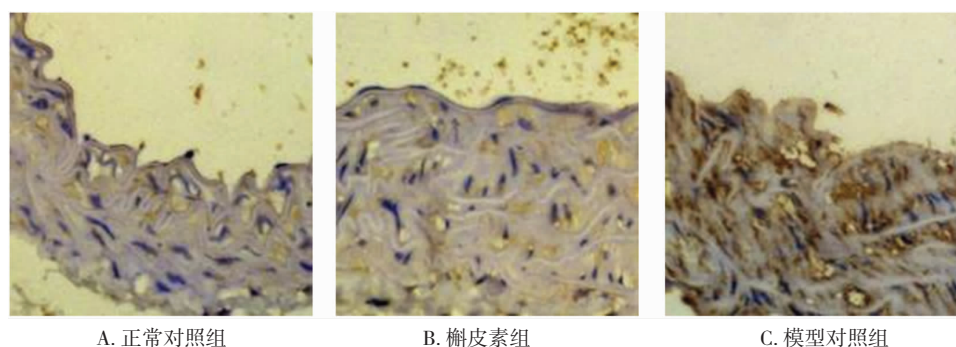


图 3 10 周时 SDF-1 在主动脉壁的表达 (400×)

Fig.3 SDF-1 expression in the aortic wall at the 10 th week (400×)

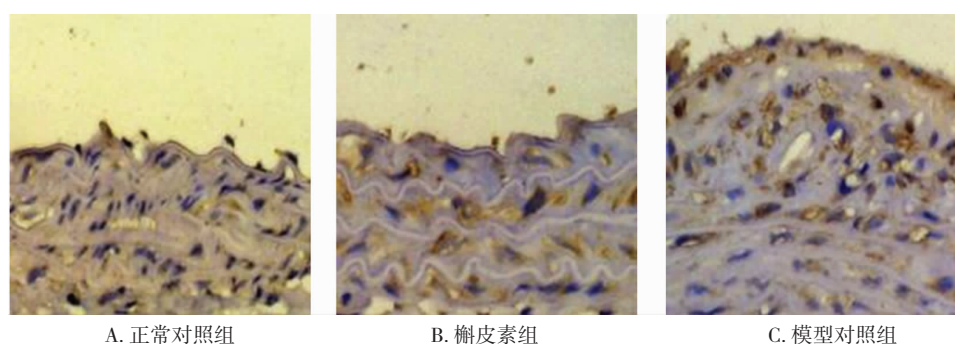


图 4 20 周时 SDF-1 在主动脉壁的表达 (400 ×)

Fig.4 SDF-1 expression in the aortic wall at the 20 th week (400 ×)

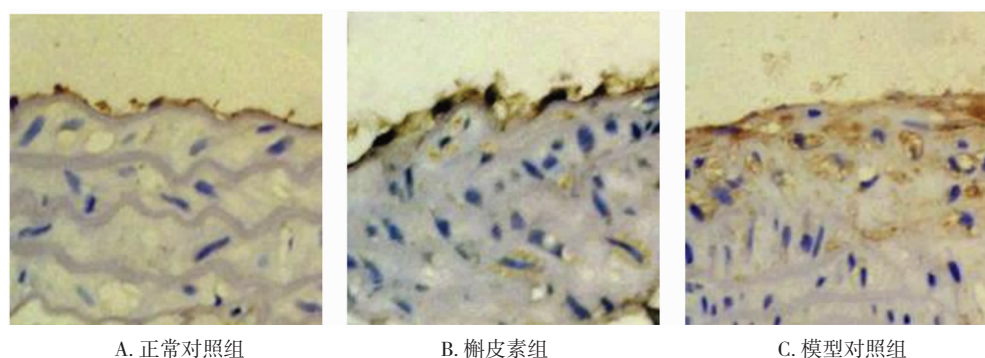


图 5 10 周时 CXCR4 在主动脉壁的表达 (400 ×)

Fig.5 CXCR4 expression in the aortic wall at the 10 th week (400 ×)

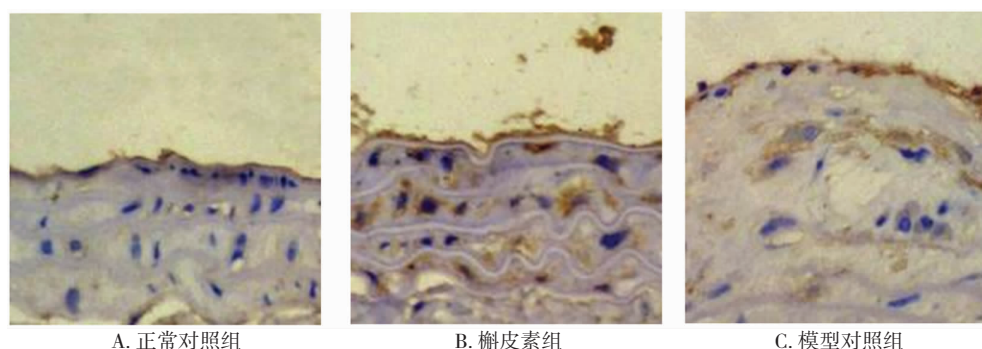


图 6 20 周时 CXCR4 在主动脉壁的表达 (400 ×)

Fig.6 CXCR4 expression in the aortic wall at the 20 th week (400 ×)

表 1 各组小鼠主动脉中 SDF-1 与 CXCR4 平均光密度值比较 ($A, \bar{x} \pm s, n=3$)Tab.1 Mean optical density of SDF-1 and CXCR4 in mice aorta in each group ($A, \bar{x} \pm s, n=3$)

分组	SDF-1		CXCR4	
	10 周	20 周	10 周	20 周
正常对照组	0.171 ± 0.006^{bcd}	0.179 ± 0.014^{bcd}	0.124 ± 0.015^{bcd}	0.129 ± 0.010^{bcd}
槲皮素高剂量组	0.186 ± 0.011^{bc}	0.188 ± 0.009^{bcd}	0.140 ± 0.009^{bc}	0.141 ± 0.014^{bc}
槲皮素中剂量组	0.200 ± 0.017^{ab}	0.208 ± 0.011^{ab}	0.157 ± 0.009^{ab}	0.156 ± 0.010^{ab}
槲皮素低剂量组	0.210 ± 0.004^{ab}	0.214 ± 0.010^{ab}	0.172 ± 0.008^{ab}	0.172 ± 0.010^{ab}
模型对照组	0.244 ± 0.010^{acd}	0.272 ± 0.005^{acd}	0.192 ± 0.011^{acd}	0.212 ± 0.008^{acd}
F 值	23.164	38.359	18.103	26.966
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 同一时间点上与正常组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较 $P < 0.05$; c, 与低剂量组比较 $P < 0.05$; d, 与中剂量组比较 $P < 0.05$; e, 相同组 20 周与 10 周比较 $P < 0.05$

表 2 各组小鼠血清中 SDF-1、CXCR4 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab.2 Expression of SDF-1 and CXCR4 in serum of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	SDF-1		CXCR4	
	10 周	20 周	10 周	20 周
正常对照组	52.19 ± 12.30 ^{bed}	64.70 ± 7.13 ^{bed}	56.30 ± 6.88 ^{bed}	61.94 ± 6.32 ^{bed}
槲皮素高剂量组	121.02 ± 13.78 ^{bed}	124.16 ± 12.95 ^{bed}	72.25 ± 5.50 ^{bc}	78.87 ± 7.75 ^{bc}
槲皮素中剂量组	151.02 ± 16.24 ^{abc}	164.93 ± 9.86 ^{abc}	80.64 ± 9.77 ^{abc}	85.72 ± 8.15 ^{abc}
槲皮素低剂量组	190.83 ± 2.14 ^{abd}	195.84 ± 18.56 ^{abd}	107.28 ± 11.07 ^{abd}	112.03 ± 11.12 ^{abd}
模型对照组	223.91 ± 14.6 ^{acd}	267.46 ± 2.98 ^{acde}	183.78 ± 11.60 ^{acd}	224.86 ± 12.21 ^{acde}
F 值	79.721	130.537	88.318	145.512
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,同一时间点上与正常组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与低剂量组比较, $P<0.05$;d,与中剂量组比较, $P<0.05$;e,相同组 20 周与 10 周比较, $P<0.05$

表 3 各组小鼠主动脉 SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 相对表达量 ($n=3, \bar{x} \pm s$)
Tab.3 mRNA expression of SDF-1 and CXCR4 in mice aorta in each group ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	SDF-1		CXCR4	
	10 周	20 周	10 周	20 周
正常对照组	1.11 ± 0.11 ^{bed}	1.04 ± 0.06 ^{bed}	1.01 ± 0.01 ^{bed}	1.14 ± 0.09 ^{bed}
槲皮素高剂量组	1.82 ± 0.15 ^{bed}	1.84 ± 0.27 ^{bed}	1.02 ± 0.01 ^{bed}	1.22 ± 0.10 ^{bed}
槲皮素中剂量组	3.48 ± 0.21 ^{abc}	3.49 ± 0.23 ^{abc}	1.42 ± 0.06 ^{abc}	1.89 ± 0.34 ^{abc}
槲皮素低剂量组	3.87 ± 0.23 ^{abd}	4.05 ± 0.17 ^{abd}	2.57 ± 0.07 ^{abd}	2.98 ± 0.25 ^{abd}
模型对照组	5.83 ± 0.32 ^{acd}	7.63 ± 0.28 ^{acde}	5.40 ± 0.19 ^{acd}	7.65 ± 0.19 ^{acde}
F 值	221.634	325.055	1 186.195	484.344
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,同一时间点上与正常组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$;c,与低剂量组比较, $P<0.05$;d,与中剂量组比较, $P<0.05$;e,相同组 20 周与 10 周比较, $P<0.05$

2.4 Real-time PCR 检测 SDF-1 和 CXCR 4 的 mRNA 基因表达

2.4.1 提取的小鼠血管组织总 RNA 检测 凝胶成像系统下观察电泳结果,可见 28S 和 5S 3 条带,条带清晰,且 28S 的亮度约为 18S 亮度的 2 倍左右,表明 RNA 无降解现象;核酸蛋白检测仪上测量 RNA 的纯度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.9\sim 2.0$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}=1.9\sim 2.1$,浓度为 600~800 ng/ μl 左右,表明提取的 RNA 纯度较高。

2.4.2 PCR 扩增结果 目的基因 SDF-1 和 CXCR 4 分别与内参 β -actin 的扩增效率基本相同,故采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对样品进行检测;溶解曲线分析显示,各样品的溶解曲线均为单一吸收峰,无非特异性产物及引物二聚体生成,表明引物特异性良好;核酸扩增曲线呈 S 形动力学曲线,结果可准确反映样品初始浓度;由各组样本 SDF-1 和 CXCR 4 的 mRNA 相对表达结果可见,在相同时间点,SDF-1 和 CXCR 4 在各组中的表达量均明显不同,其中模型对照组表达最高,正常对照组最低,而在槲皮素不同剂量组,总体呈现随剂量的增高,SDF-1 和 CXCR 4 的表达出现下降趋势。在不同时间点,SDF-1 和 CXCR 4 的表达除模型对照组外,其余各组在 20 周的表达量与 10 周相比均无统计学差异($P>0.05$),见表 3。

3 讨 论

动脉粥样硬化是一种血管慢性增殖性炎症过程,趋化因子在动脉粥样硬化的炎症和愈合过程中发挥着至关重要的作用。近年来研究发现 SDF-1 及其特异性受体 CXCR 4 在动脉粥样硬化病变过程中,由缺血部位的内皮细胞、平滑肌细胞、血小板等表达,主要促使平滑肌细胞迁移至内膜,同时抑制平滑肌细胞凋亡,进而引起内膜增生,管腔狭窄,最终导致血管重构,促进了动脉粥样硬化的发展^[1-4]。此外高浓度的 SDF-1 还具有促进血小板聚集及血栓形成的作用^[7]。而槲皮素属于黄酮类化合物,广泛存在于自然界,研究显示槲皮素的摄入可以降低冠心病的患病风险^[5-6,8],主要通过抗氧化活性、抑制炎症反应、降低血清胆固醇和甘油三酯以及抗血小板作用进而抑制动脉粥样硬化病变^[9-12],但是槲皮素对趋化因子 SDF-1 及 CXCR4 的作用目前仍无相关文献报道。

本实验通过用高脂饲料喂养 ApoE^{-/-}小鼠,观察动脉壁和血清中 SDF-1 和 CXCR4 表达水平的改变,探讨 SDF-1/CXCR4 在 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化形成过程中的作用机制。real-time PCR 结果显示,当时间恒定时,模型对照组 SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 表达量明显高于正常对照组,且随着时间延长 SDF-1 和 CXCR4 在模型对照组的表达均增高,而正常对照组无明显变化。免疫组化结果提示 SDF-1 和 CXCR4 在模型对照组的平滑肌细胞和斑块内的泡沫细胞上大量表达并呈深棕黄色,内皮细胞表达量相对较少,而在正常动脉壁的内皮细胞和平滑肌细胞上仅少量表达且呈浅黄色。此外通过 ELISA 检测血清中 SDF-1 和 CXCR4 的水平,模型对照组同样明显高于正常对照组。因此推测在动脉粥样硬化形成过程中,SDF-1 及其特异性受体 CXCR4 结合后,可能主要参与平滑肌细胞迁移至内膜,引起平滑肌细胞增殖,并促进了内膜增厚和泡沫细胞形成,导致粥样斑块形成。

在给予槲皮素动物实验组的 ApoE^{-/-}小鼠,病理学切片显示其动脉病变轻于模型对照组,尤其是 20 周时的槲皮素高剂量组,仅可见其内皮细胞缺失,中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列稍紊乱,在 20 周时的槲皮素低剂量组尽管可见粥样斑块形成,但斑块面积及病变程度均较同时时间点的模型对照组轻。real-time PCR 检测各组 SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 表达量显示槲皮素高、中、低 3 组较相同时间的模型对照组表达量低,尤其是槲皮素高剂量组。免疫组化结果还提示槲皮素组的 SDF-1 和 CXCR4 主要表达于平滑肌细胞,其平均 A 值也低于模型对照组。此外,SDF-1 和 CXCR4 在血清中表达水平比较,槲皮素 3 组亦低于模型对照组。以上结果显示槲皮素能明显地抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的形成,尤其是在高剂量 150 mg/(kg·d),血管组织能保持较正常的结构,效果最显著。

综上所述,槲皮素具有抗动脉粥样硬化的作用,其机制可能是通过抑制 SDF-1 与 CXCR4 基因的

表达从而抑制动脉粥样硬化的发生。

参 考 文 献

- [1] Schober A,Zernecke A,Liehn EA,et al.Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets[J].Circ Res,2004,95(11):1125-1133.
- [2] 赵 巍,郑 杨,沈波涛.基质细胞衍生因子-1 及其受体对大鼠主动脉血管平滑肌细胞增殖与凋亡的影响[J].中华老年心脑血管病杂志,2008(1):43-46.
- [3] 刘黎黎.脂多糖对小鼠骨髓源性平滑肌祖细胞表达 CXCR 4 的影响[D].武汉:华中科技大学,2009.
- [4] Takahashi M.Role of the SDF-1/CXCR 4 system in myocardial infarction[J].Circ J,2010,74(3):418-423.
- [5] 陈 辉,刘应才.槲皮素的心血管保护作用[J].国际心血管病杂志,2007(1):57-60.
- [6] Hertog MG,Feskens EJ,Hollman PC,et al.Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease:the Zutphen Elderly Study[J].Lancet,1993,342(8878):1007-1011.
- [7] Abi-Younes S,Sauty A,Mach F,et al.The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques[J].Circ Res,2000,86(2):131-138.
- [8] Hertog MG,Kromhout D,Aravanis C,et al.Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study[J].Arch Intern Med,1995,155(4):381-386.
- [9] Loke WM,Proudfoot JM,Hodgson JM,et al.Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction [J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2010,30(4):749-757.
- [10] Juzwiak S,Wojcicki J,Mokrzycki K,et al.Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits[J].Pharmacol Rep,2005,57(5):604-609.
- [11] Song L,Xu M,Lopes-Virella MF,et al.Quercetin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells through extracellular signal-regulated kinase[J].Arch Biochem Biophys,2001,391(1):72-78.
- [12] 李家富,何 涛,黄维义,等.槲皮素、异鼠李素逆转体外 HDL 氧化修饰的实验研究(英文)[J].中国医学工程,2004(3):22-25.

(责任编辑:关蕴良)