

· 基础研究 ·

重组水蛭素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠
动脉粥样硬化斑块的影响及机制

田晋帆 葛长江 吕树铮 苑 飞 赵 康

摘要 **目的** 探讨重组水蛭素对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化斑块的影响及机制。**方法** 高脂饲养 7~8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠 24 只,按体重、窝别进行随机配对分组,分为药物组及模型组,每组 12 只,以 12 只高脂饲养的 7~8 周龄 C57BL/6J 小鼠为正常对照组。药物组于 10 周龄起隔日给予重组水蛭素 0.25 mg/kg 腹腔注射,连续注射 5 周;模型组给予等量生理盐水注射;正常对照组不进行任何处理,均给予高脂饮食饲养 20 周龄时处死。检测血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C、高敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、E-选择素(E-selectin)、白细胞介素-6(IL-6)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)水平;HE 染色及形态计量学测定主动脉根部斑块面积/管腔面积及细胞外脂质面积/斑块面积;Western blot 测定主动脉钙库操纵性钙通道信号分子,包括基质交感分子 1(STIM1)、Orai1 蛋白、瞬时受体电位通道 1(TRPC1)变化。**结果** 20 周龄时模型组小鼠主动脉血管壁脂质斑块形成。与正常对照组比较,模型组小鼠 TC、TG、LDL-C 明显升高($P < 0.01$),血清炎症因子 hs-CRP、IL-6、E-selectin、MMP-2 水平亦明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);小鼠主动脉 STIM1、Orai1 及 TRPC1 蛋白表达增多($P < 0.01$);与模型组比较,药物组小鼠斑块面积/管腔面积及细胞外脂质面积/斑块面积明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);血清 TC、LDL-C、hs-CRP、E-selectin、IL-6、MMP-2 水平亦降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);主动脉根部 STIM1、TRPC1、Orai1 蛋白表达下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 水蛭素能改善 ApoE^{-/-}小鼠的血脂、内皮功能,下调 STIM1、Orai1、TRPC1 的表达,并通过影响上述环节进而延缓动脉粥样硬化的发生与发展。

关键词 重组水蛭素;载脂蛋白 E 基因敲除小鼠;动脉粥样硬化斑块;炎症因子;钙库操纵性钙通道

Effect and Mechanism of Recombinant Hirudin on Atherosclerotic Plaques in Apolipoprotein E Knockout (ApoE^{-/-}) Mice TIAN Jin-fan, GE Chang-Jiang, LU Shu-zheng, YUAN Fei, and ZHAO Kang Department of Cardiology, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung, and Blood Vessel Diseases, Beijing (100029), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of hirudin on atherosclerotic plaques in apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** Totally 24 ApoE^{-/-} mice, 7-8 weeks old were fed with high fat diets. They were randomly divided into the recombinant hirudin treatment group (drug group) and the model group according to body weight and different dens, 12 in each group. Twelve C57BL/6J mice, 7-8 weeks old fed with high fat diet were recruited as the normal control group. Recombinant hirudin (0.25 mg/kg) was intraperitoneally injected to mice in the drug group from the 10th week old once every other day for five successive weeks. Equal volume of normal saline was injected to mice in the model group. Mice in the normal control group received no treatment. All mice were sacrificed after fed with high fat diet until they were 20 weeks old. Serum levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP), E-selectin, interleukin-6 (IL-6), and stromal metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected. The plaque/lumen area and extracellular lipid composition/plaque area were analyzed by HE staining and morphometry. Changes of signaling molecules in store-operated

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(No.7152047);北京中医药科技项目(No. JJ2014-22);“十一五”国家科技支撑计划(No. 2006BAI01A02);首都医学科技发展基金资助项目(No. SF-2009-I-09);首都医科大学附属北京安贞医院院长科技发展基金(No. 2013F01)

作者单位:首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所心内科(北京 100029)

通讯作者:葛长江, Tel:010-64456473, E-mail: cjcge1116@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.02.0198

calcium channels, including stromal interacting molecule 1 (STIM1), Orai1 protein, and transient receptor potential channel 1 (TRPC1) were determined by Western blot. Results Lipid plaque formed in the aorta vessel wall of 20-week old mice in the model group. Compared with the normal control group, serum levels of TC, TG and LDL increased ($P < 0.01$), hs-CRP, E-selectin, IL-6, and MMP-2 obviously increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the model group; expression levels of STIM1, TRPC1, and Orai1 significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the plaque/lumen area and the extracellular lipid composition/plaque area significantly decreased in the drug group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); serum levels of TC and LDL, hs-CRP, E-selectin, IL-6, and MMP-2 obviously decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); expression levels of STIM1, TRPC1, and Orai1 were significantly down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion Hirudin could significantly improve lipids and endothelial functions of ApoE^{-/-} mice, down-regulate expression levels of STIM1, Orai1, and TRPC1, and thus delaying the occurrence and development of atherosclerosis.

KEYWORDS hirudin; apolipoprotein E knockout mice; atherosclerotic plaque; inflammatory factor; store-operated calcium channel

随着人们生活水平的提高,冠状动脉粥样硬化所致急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)已成为威胁人类健康的头号杀手。脂质代谢紊乱、氧化应激、内皮功能失调、血管平滑肌细胞增殖与迁移、血栓形成等多因素、多环节参与动脉粥样硬化的发生与发展。近年研究发现,凝血酶不仅参与“凝血瀑布”的血栓形成过程,而且其激活血小板的作用已日益受到关注^[1]。血小板氧化应激表现为血小板脂质过氧化产物丙二醛(MDA)及血小板聚集功能增强等,促进氧化低密度脂蛋白生成,并刺激巨噬细胞转变为泡沫细胞^[2]。此外,凝血酶本身和(或)激活的血小板促进平滑肌细胞的增殖和迁移及炎症细胞的趋化^[3]。因此在防治动脉粥样硬化中抑制凝血酶至关重要。水蛭素来源于医用水蛭唾液腺,为 65 个氨基酸组成的多肽,目前可以利用基因重组技术大量生产,是高效特异性直接凝血酶抑制剂^[4]。临床研究报道,颈动脉粥样硬化患者经水蛭素口服剂型治疗后,颈动脉内膜-中膜厚度及斑块总积分均较治疗前下降^[5]。本研究探讨经重组水蛭素治疗后载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-})小鼠血脂、炎症因子的变化及重组水蛭素对主动脉根部钙库操纵性钙通道(store-operated calcium channels)信号分子,包括基质交感分子 1(stromal interacting molecule 1, STIM1)、Orai1 蛋白、瞬时受体电位通道 1(transient receptor potential canonical 1, TRPC1)及血管病理变化的影响。

材料与方法

1 动物 7~8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠(品系 C57BL/6J,北京大学医学部实验动物科学部自美国 Jackson

实验室引进),质量合格证号[SCXK(京)2011-0012];野生型 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利实验动物技术有限公司,质量合格证[SC(京)2012-0001],均为雄性,体重 19~21 g,饲养条件 2 级,室温保持在 22~24℃,相对湿度 50%,光照时间 7:00—19:00。

2 试剂及仪器 重组水蛭素白色冻干品购自大连保税区联合博泰生物技术有限公司(批号:0020130911-2)。兔抗鼠 STIM1 抗体(Cat No. ab62031, UK)、兔抗鼠 TRPC1 抗体(Cat No. ab75322, UK)、兔抗鼠 Orai1 抗体(Cat No. ab83751, UK)均购自 Abcom 公司。辣根过氧标记的山羊抗兔 IgG(H+L)抗体(Cat No. 111-035-003)购自美国 Jackson 公司。TC 检测试剂盒(批号:20131021)、TG 检测试剂盒(批号:20131120)、HDL 检测试剂盒(批号:20130916)、LDL 检测试剂盒(批号:20130804)均购自英科新创(厦门)科技有限公司。高敏 C-反应蛋白(high-sensitive C-reactive protein, hs-CRP)检测试剂盒(批号:20131204)、E-选择素(E-selectin)检测试剂盒(批号:20131124)、基质金属蛋白酶-2(metalloproteinase-2, MMP-2)检测试剂盒(批号:20140121)均购自 R&d systems 公司。IL-6 检测试剂盒(批号:20140224)购自 eBioscience 公司。AU400 全自动生化仪(日本奥林巴斯株式会社);MP400 电子天平(上海第二天平仪器厂);Fresco 低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司);Mini-Protein 2 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);MiniP-4 电泳槽(北京凯元信瑞仪器有限公司);Mini Trans Blot Cell 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);RM2235 轮转式切片机(德国 LEICA 公司);Olympus BX51 光学显微镜(日本)。

3 动物分组及给药 参照文献[6]方法,高脂饲养 7~8 周 ApoE^{-/-}小鼠建立动脉粥样硬化斑块模型。24 只 7~8 周龄 ApoE^{-/-}小鼠按体重、窝别随机进行随机配对,每对 12 只(第 1 次腹腔注射时,随机抽取 1 只给予重组水蛭素,该只作为药物组,另只作为模型组),12 只野生型 C57BL/6J 小鼠为正常对照组。参考文献[7],于 10 周龄起(脂质条纹期),药物组隔日给予重组水蛭素溶于生理盐水腹腔注射,0.25 mg/kg,连续注射 5 周;模型组给予等量生理盐水腹腔注射;正常对照组不进行任何处理。3 组均给予高脂饲料(基础饲料 78.85%,脂肪 21%,胆固醇 0.15%)。饲养至 20 周龄时处死,处死前 1 日晚禁食、禁水。

4 标本采集 每组取 6 只小鼠麻醉后,心尖部以肝素生理盐水灌洗,无菌条件下取心脏和主动脉,10% 甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋,小鼠心底部横断面连续切片,每张切片厚 5 μm。参考文献[8],每只小鼠的主动脉根部取 4 个相同的切面,分别为(1)升主动脉最近端横截面,切面形态呈圆形;(2)主动脉瓣附着部位,并有冠状动脉开口;(3)主动脉瓣起始横截面;(4)主动脉瓣完全出现并汇合在一起。每组另外 6 只小鼠同样方法取主动脉根部制备蛋白裂解液,进行 Western blot 检测。每只小鼠采血后,离心取上清液。10 只进行血清检测(血脂检测 5 只,炎症因子 5 只)。

5 检测指标

5.1 血清指标测定 取材前禁食、禁水 12 h, ApoE^{-/-}小鼠麻醉后,经眼眶静脉丛采血,3 000 r/min, 10 min 离心分离血清,测定血脂及炎症因子。TC、TG 采用氧化酶法测定,HDL-C、LDL-C 采用直接法测定;血清 hs-CRP、IL-6、E-selectin、MMP-2 均采用 ELISA 法。

5.2 病理形态指标测定 HE 染色及形态计量学测定斑块面积、血管管腔面积,计算矫正的斑块面积(斑块面积/血管管腔面积),计算机图像分析仪分析细

胞外脂质面积/斑块面积。

5.3 Western blot 法检测主动脉根部 STIM1、Orai1 及 TRPC1 蛋白表达 BCA 法测定蛋白浓度;调整蛋白浓度,煮沸 3~5 min 使蛋白变性;SDS-PAGE 电泳,转膜;转膜完毕后,立即把蛋白膜放置到 1×TBST 中,漂洗 1~2 min,以洗去膜上的转膜液;加入 Western 封闭液(5%脱脂奶粉,溶于 1×TBST 中),在摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 min;TBST 稀释一抗(1:1 000),4℃孵育过夜;加入 1×TBST,在摇床上缓慢摇动洗涤 5~10 min,共洗涤 3 次;TBST 稀释二抗(1:3 000),室温孵育 60 min;TBST 洗膜 3 次,每次 5~10 min;ECL 化学发光,显影,定影。用 Quantity One 软件对凝胶图像进行光密度分析,以目的条带与内参照条带信号强度的比值代表组织中目的蛋白的表达水平。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠血脂与体重水平比较(表 1) 与正常对照组比较,高脂饲养的 ApoE^{-/-}小鼠 TC、TG、LDL-C 明显升高($P < 0.01$),HDL-C 水平则差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较,药物组 ApoE^{-/-}小鼠血清 TC、LDL-C 明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),两组 TG 及 HDL-C 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组小鼠体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组小鼠炎症因子水平比较(表 2) 与正常对照组比较,模型组血清炎症因子 hs-CRP、IL-6、E-selectin、MMP-2 水平均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,药物组血清中上述炎症因子水平均明显降低(均 $P < 0.01$)。

表 1 各组体重与血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	TG(mmo/L)	TC(mmo/L)	LDL-C(mmo/L)	HDL-C(mmo/L)
正常对照	5	31.20 ± 1.41	1.41 ± 0.27	4.55 ± 0.36	1.87 ± 0.45	1.42 ± 0.45
模型	5	31.46 ± 0.76	2.55 ± 0.41*	9.87 ± 0.92*	4.08 ± 0.89*	1.02 ± 0.11
药物	5	31.05 ± 1.37	1.88 ± 0.50	6.07 ± 0.67 ^{△△}	2.54 ± 0.20 [△]	1.15 ± 0.25

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 2 各组血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hs-CRP(μg/mL)	IL-6(pg/mL)	E-selectin(ng/mL)	MMP-2(ng/mL)
正常对照	5	0.106 ± 0.014	30.080 ± 4.585	48.666 ± 2.807	145.491 ± 24.670
模型	5	0.286 ± 0.033**	37.621 ± 2.999*	63.344 ± 1.793**	256.400 ± 31.150**
药物	5	0.185 ± 0.050 [△]	32.135 ± 1.646 [△]	55.530 ± 1.763 [△]	191.219 ± 12.645 [△]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

3 各组小鼠主动脉病理学改变(图 1,表 3) 正常对照组小鼠未见斑块形成;高脂饲喂 ApoE^{-/-}小鼠至 20 周龄时见小鼠主动脉血管壁脂质斑块形成。与模型组 ApoE^{-/-}小鼠比较,药物组主动脉矫正斑块面积(斑块面积/管腔面积),细胞外脂质面积/斑块面积明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

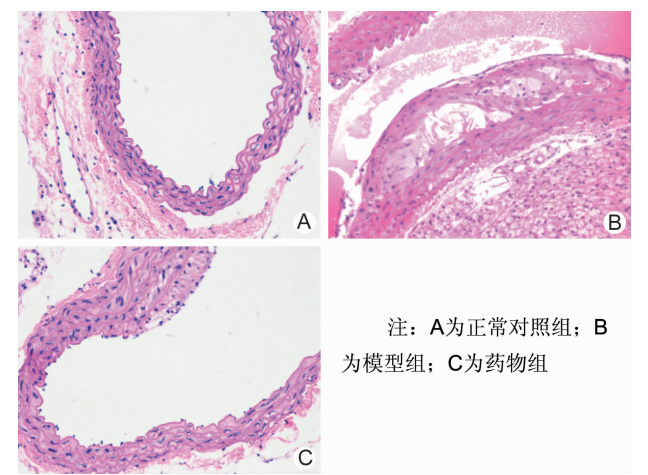


图 1 各组小鼠主动脉病理变化 (HE, ×200)

表 3 各组斑块面积/管腔面积、细胞外脂质面积/斑块面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	斑块面积/ 管腔面积	细胞外脂质面积/ 斑块面积
正常对照	6	—	—
模型	6	1.103 ± 0.019	0.162 ± 0.013
药物	6	0.076 ± 0.008 *	0.134 ± 0.007 **

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4 各组小鼠主动脉 STIM1、Orai1 及 TRPC1 蛋白表达比较(图 2,表 4) 与正常对照组比较,模型组主动脉 STIM1、Orai1 及 TRPC1 表达增多($P < 0.01$);与模型组比较,药物组小鼠上述蛋白表达明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

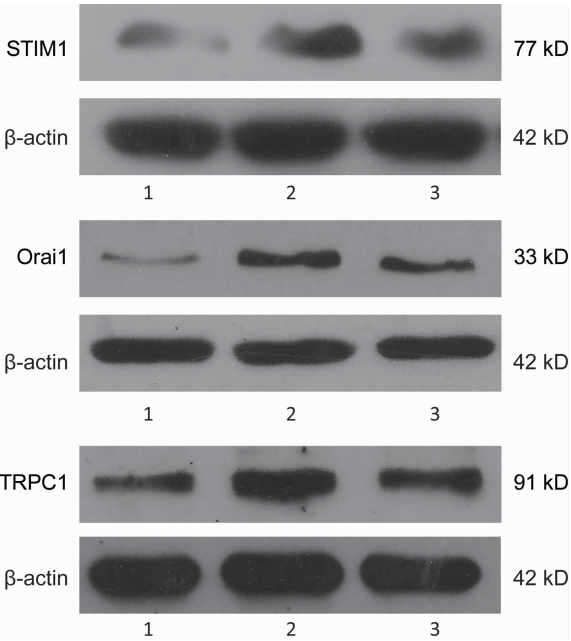
表 4 各组 STIM1、Orai1、TRPC1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	STIM1	Orai1	TRPC1
正常对照	6	0.321 6 ± 0.095 0	0.269 4 ± 0.060 0	0.474 3 ± 0.066 0
模型	6	0.600 3 ± 0.084 8 *	0.489 4 ± 0.037 0 *	0.688 6 ± 0.077 0 *
药物	6	0.462 6 ± 0.072 0 △	0.387 7 ± 0.052 1 △△	0.577 4 ± 0.051 2 △

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

讨 论

ApoE 基因缺陷小鼠由美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗来那大学病理遗传实验室应用基因同源重组的靶基因技术于 1992 年培育成功^[9,10],其动



注:1 为正常对照组;2 为模型组;3 为药物组

图 2 各组小鼠主动脉 STIM1、Orai1、TRPC1 蛋白表达电泳图

脉粥样硬化斑块好发部位与人类相同,且同样经历从脂质条纹到有纤维帽覆盖的成熟斑块的各个阶段,因此,ApoE^{-/-}小鼠是目前研究动脉粥样硬化较为理想的动物模型。

动脉粥样硬化的发生发展涉及脂质入侵、血小板活化、血栓形成、炎症反应、氧化应激、内膜损伤、血管平滑肌细胞激活、选择性基质代谢及血管重建等多种机制^[11]。血脂异常是导致动脉粥样硬化的主要危险因素之一,脂质是 AS 斑块的重要组成部分,血清 LDL-C 的降低使进入斑块内的胆固醇下降,从而减轻氧化低密度脂蛋白的浸润。

血脂中 LDL 被氧化后参与形成泡沫细胞,还可损伤内皮,促进单核细胞及中性粒细胞黏附,促进平滑肌细胞增生及血小板黏附聚集,加剧炎症反应^[12]。已知炎症反应参与动脉粥样硬化的每一个时期,从发生到发展,最终导致动脉粥样硬化斑块破裂及血栓的形成^[13]。CRP 是对急性感染或炎症反应所产生的一种主要的急性反应期蛋白由肝脏合成,在正常人血清中含量极微,而急性炎症反应阶段可迅速增加 1 000 多倍,IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)可调节其合成^[14]。多项研究证实,hs-CRP 是发生心肌梗死、卒中、血管性死亡等及其预后的独立预测因子^[15-17]。因此,hs-CRP 水平高低可反映斑块的易损程度,如能降低 hs-CRP 的表达,可起到延缓动脉粥样硬化及稳定粥样斑块的作用。

血管内皮受损是动脉粥样硬化及其斑块形成中重要的环节,当血管受损后,局部发生炎症反应,使得多种致炎因子如 IL-6、E-selectin 等分泌增多。E-selectin 只在活化的内皮细胞表达,是内皮细胞受损的标志,IL-6 在动脉粥样硬化斑块肩区表达,刺激基质金属蛋白(MMP)参与动脉粥样硬化发生发展过程中的基质重建过程^[18]。凝血酶除将纤维蛋白原变为纤维蛋白参与凝血过程外,还通过激活凝血酶受体引发直接或间接凝血酶介导的分子和细胞间相互作用。伴随凝血过程的瀑布式反应,凝血酶使内皮通透性增强,引发一系列血管损伤反应^[19]。

血管平滑肌细胞的增殖和凋亡是动脉粥样硬化的重要特征,是动脉粥样硬化斑块形成的重要机制之一,而细胞内钙稳态在其中起着重要作用,轻度升高的钙离子促进细胞增殖,而持续增高的细胞内钙离子促进细胞凋亡。STIM1 是一种主要定位于内质网上的 I 型跨膜蛋白,被认为是胞内钙库 Ca^{2+} 的“传感器”,通过影响钙离子内流调节细胞功能,它能感受钙库中钙离子浓度下降,然后易位到胞膜,将信息传给位于胞膜的 TRPC1 及 Orai1 通道,介导 TRPC1 及 Orai1 通道开放,胞外钙离子内流以补充胞内 Ca^{2+} ,它们是钙库操纵性钙通道蛋白的主要组成分子。Aubart FC 等^[20]也发现,利用 siRNA 技术下调 STIM1,细胞增殖受抑制,敲除 STIM1 基因可以阻止冠状动脉血管平滑肌细胞增殖。郭瑞威等^[21]采用 RNA 干扰技术沉默原代培养血管平滑肌细胞 STIM1 分子后,³H-TdR 掺入量和细胞明显减少,表明平滑肌细胞增殖明显受到抑制。况春燕等^[22]研究发现,RNA 干扰沉默 STIM1 抑制内皮祖细胞的增殖和迁移及钙库操纵性钙内流,人源 STIM1 的再表达逆转了 STIM1 剔除对内皮祖细胞的影响。Ingueneau C 等^[23]通过 RNA 干扰沉默 TRPC1,降低了钙离子的内流,并且减弱了氧化修饰 LDL 对血管平滑肌细胞的毒性。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)可以时间依赖性地诱导 Orai1 表达,从 12 h 开始具有显著差异,干扰 Orai1 可以使巨噬细胞结合、摄取 Dil 标记的 LDL 的能力明显降低^[24]。由此推知,钙库操纵性钙通道蛋白 STIM1、Orai1、TRPC1 与动脉粥样硬化的发生、发展密切相关,是治疗动脉粥样硬化的重要靶点。

凝血酶具有生长激素样作用,促进血管平滑肌细胞增殖反应,且这种作用主要是通过 Ca^{2+} 和 PKC 信号通路实现的^[2],因而贯穿于动脉粥样硬化发生发展的全过程。水蛭素是目前最强的直接凝血酶抑制剂,它不仅可以与游离的凝血酶结合,而且可以同结合于

血栓的凝血酶结合^[4]。本研究结果表明,经重组水蛭素治疗后主动脉 STIM1、Orai1、TRPC1 表达显著下降,这与体外所证实的其对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用相一致^[25]。另外本研究表明水蛭素可以通过下调钙离子信号蛋白 STIM1、Orai1、TRPC1 的表达,从而抑制血管平滑肌增殖、迁移。

本课题组前期研究结果表明,直接凝血酶抑制剂水蛭素的口服剂型可以降低 PCI 术后升高的小血小板聚集率及 hs-CRP 浓度,并改善 ACS 患者的远期预后。本研究旨在应用重组水蛭素,以动脉粥样硬化斑块病理学形态、炎症因子及影响血管重塑的钙离子信号蛋白为研究对象,进一步探讨其改善动脉粥样硬化的机制^[26]。本研究结果可见重组水蛭素治疗组 ApoE^{-/-}小鼠斑块面积与管腔面积的比例、斑块中细胞外脂质成分的比例均较模型组显著下降。进一步的血清学检测表明,重组水蛭素虽然没有完全改变此基因敲除小鼠的基础血脂水平,但明显降低 ApoE^{-/-}小鼠血清中 TC、LDL。此外,重组水蛭素对动脉粥样硬化发生发展过程中的炎症因子如 hs-CRP、IL-6、MMP 及 E-selectin 均具有显著的改善作用。证实重组水蛭素在动脉粥样硬化斑块形成过程中发挥调脂、抗炎、改善内皮功能等重要功效。由此可见,水蛭素通过对动脉粥样硬化形成过程中多因素、多环节的调节作用,进而延缓其病理进程。

本研究也存在其局限性,如未对动脉粥样斑块进行动态的干预及观察。后续的研究笔者将进一步设立不同周龄的 ApoE^{-/-}小鼠,以不同浓度的重组水蛭素干预,进一步探索其对动脉粥样硬化斑块的影响,及该作用是否为浓度依赖性。此外,以基础实验为依据,进一步探索水蛭素及其衍生物在治疗冠心病患者的临床疗效,将有助于发挥中医药在防治冠心病急性冠脉综合的特色。

参 考 文 献

- [1] Leger AJ, Jacques SL, Badar J, et al. Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis [J]. Circulation, 2006, 113(9): 1244-1254.
- [2] 赵晓民, 秦树存. 血小板氧化应激和动脉粥样硬化[J]. 生理科学进展, 2011, 42(1): 33-38.
- [3] 王旻, 王园园, 徐东刚. 凝血酶及其蛋白激酶受体在动脉粥样硬化中的作用[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(2): 91-93.
- [4] 张和韩, 王丽萍. 水蛭素的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(1): 76-78.
- [5] 段博, 段学忠, 王翔燕, 等. 脉血康胶囊对颈动脉粥样硬

- 化及血清高敏 C 反应蛋白的影响[J]. 环球中医药, 2012, 5(11): 859-861.
- [6] 周明学, 徐浩, 陈可冀, 等. 几种活血解毒中药有效部位对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉粥样斑块稳定性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(11): 2097-2102.
- [7] 戴淑芳, 邹向阳, 李华, 等. 重组水蛭素对角叉菜胶致小鼠尾部血栓的抗凝效应分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(25): 6081-6082.
- [8] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection[J]. *Nature*, 1997, 386(6622): 292-296.
- [9] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells[J]. *Cell*, 1992, 71(2): 343-353.
- [10] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E[J]. *Science*, 1992, 258(5081): 468-471.
- [11] Schwartz EA, Reaven PD. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(5): 858-866.
- [12] 陈富荣, 章怡祎, 张娜, 等. 低密度脂蛋白胆固醇与动脉粥样硬化相关性的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(10): 1294-1297.
- [13] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2045-2051.
- [14] Puglisi MJ, Fernandez ML. Modulation of C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , and adiponectin by diet, exercise, and weight loss[J]. *J Nutr*, 2008, 138(12): 2293-2296.
- [15] Schillinger M, Exner M, Amighi J, et al. Joint effects of C-reactive protein and glycated hemoglobin in predicting future cardiovascular events of patients with advanced atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2003, 108(19): 2323-2328.
- [16] Ablij HC, Meinders AE. Atherosclerosis and inflammation: the role of C-reactive protein[J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2003, 147(1): 15-20.
- [17] Futterman LG, Lemberg L. High-sensitivity C-reactive protein is the most effective prognostic measurement of acute coronary events[J]. *Am J Crit Care*, 2002, 11(5): 482-486.
- [18] 张小梅, 翟桂兰. 炎症因子与动脉粥样硬化的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2008, 29(1): 91-93.
- [19] 吴大正, 樊懿, 韩志芬, 等. 水蛭素对凝血酶造成的血管内皮细胞单层通透性增高的抑制作用[J]. 上海中医药杂志, 2002, 48(8): 43-45.
- [20] Aubart FC, Sassi Y, Coulombe A, et al. RNA interference targeting STIM1 suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(3): 455-462.
- [21] 郭瑞威, 黄岚, 宋明宝, 等. 基质相互作用分子 1 基因敲除抑制血管平滑肌细胞增殖[J]. 中华高血压杂志, 2008, 16(11): 1009-1012.
- [22] 况春燕, 黄岚. RNA 干扰沉默 STIM1 抑制内皮祖细胞的增殖和迁移[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(10): 1998.
- [23] Ingueneau C, Huynh UD, Marcheix B, et al. TRPC1 is regulated by caveolin-1 and is involved in oxidized LDL-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 1620-1631.
- [24] 曾德意, 梁思佳, 苏映雪, 等. Orail 参与巨噬细胞泡沫化及其机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(11): 2018.
- [25] 王敏, 崔连群, 张承俊, 等. 水蛭素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(7): 609-612.
- [26] 葛长江, 吕树铮, 柳弘, 等. 脉血康胶囊对经皮冠状动脉介入治疗急性冠脉综合征患者血小板聚集率及其长期预后的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 910-913.

(收稿:2014-4-16 修回:2014-10-23)