

运动对 Apo E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块和 MMP9、Tenascin-C 的影响*

吴继全^{1,2} 程文立^{1,6} 陈莉¹ 黎娜¹ 韩呈武³ 孔晶⁴ 李鸿⁴ 潘琳⁴ 刘锦阳⁵ 刘艺文⁵

摘要

目的:探讨长期中等强度负荷耐力运动对载脂蛋白(Apo E)基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块的影响和对主动脉基质金属蛋白酶9(MMP9)、腱糖蛋白-C(tenascin-C)表达的调控作用。

方法:40只6周龄 Apo E 基因敲除小鼠随机分为运动干预组(20只)和对照组(20只)。运动干预组给予长期中等强度的负荷耐力跑台运动干预32周;一般对照组未予以特殊干预。实验结束后评估两组小鼠主动脉粥样硬化斑块面积和动脉粥样硬化斑块脂核面积的变化情况、采用偏振光的方法测定主动脉胶原含量的变化,采用免疫组化方法测定主动脉 MMP9、tenascin-C 的表达。

结果:长期中等强度负荷耐力运动组主动脉粥样硬化斑块面积、斑块脂核面积及埋藏纤维帽数目均显著下降[(70932±4669)μm² vs (57247±3982)μm², $P < 0.01$; (21279±2104)μm² vs (57247±3982)μm², $P < 0.01$; 1.03±0.42 vs 5.22±0.77, $P < 0.01$]、主动脉壁胶原含量显著增加(67.41%±7.88% vs 21.22%±8.63%, $P < 0.01$)、主动脉 MMP9 (47.02±8.55 vs 36.67±4.51, $P < 0.01$)、tenascin-C 的表达显著低于对照组(39.72±6.89 vs 28.86±2.90, $P < 0.01$)。

结论:长期中等负荷耐力运动可显著下调 Apo E 基因敲除小鼠主动脉 MMP9、tenascin-C 的表达并具有稳定主动脉粥样硬化斑块的作用。

关键词 耐力运动;载脂蛋白 E 缺陷小鼠;动脉粥样硬化;基质金属蛋白酶9;腱糖蛋白-C

中图分类号:R543.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2014)-08-0697-05

Regulatory effect of exercise on aortic artery vulnerable plaque and expressions of matrix metalloproteinase-9 and tenascin-C in apolipoprotein E-deficient mice/WU Jiquan, CHENG Wenli, CHEN Li, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(8): 697—701

Abstract

Objective: To investigate the effects of long-term medium load endurance exercise on aortic artery vulnerable plaque and expression changes of matrix metalloproteinase-9(MMP9) and tenascin-C in apolipoprotein E(APO E)-deficient mice.

Method: Forty 6-week-age Apo E deficient mice were randomly divided into the following two groups (n=20 each): the exercise group and the control group. The mice in the exercise group were kept on a long-term treadmill exercise for 32 weeks. At the end of the study, the changes of morphology and composition of atherosclerotic plaque on aortic artery were evaluated, the content of collagen was determined by morphological method, and the expressions of MMP9 and tenascin-C in aortic artery plaque were measured by immunohistochemical method.

Result: After treatment for 32 weeks, in exercise group the atherosclerotic plaque area, the size of lipid core,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.08.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173420)

1 中日友好医院心内科,北京,100029; 2 中日友好医院国际医疗部; 3 中日友好医院检验科; 4 中日友好医院临床医学研究所; 5 中山大学中山医学院; 6 通讯作者

作者简介:吴继全,男,副主任医师; 收稿日期:2013-09-02

the amount of discontinuous fibrous caps decreased significantly than that in control group $[(70932 \pm 4669) \mu\text{m}^2 \text{ vs } (57247 \pm 3982) \mu\text{m}^2, P < 0.01; (21279 \pm 2104) \mu\text{m}^2 \text{ vs } (57247 \pm 3982) \mu\text{m}^2, P < 0.01; (1.03 \pm 0.42) \text{ vs } (5.22 \pm 0.77), P < 0.01]$, the content of atherosclerotic plaque collagen on aortic artery increased significantly than that in control group $(67.41\% \pm 7.88\% \text{ vs } 21.22\% \pm 8.63\%, P < 0.01)$, and the expressions of MMP9 and tenascin-C in the exercise group also decreased significantly in the aortic atherosclerotic plaque than that in the control group $(47.02 \pm 8.55 \text{ vs } 36.67 \pm 4.51, P < 0.01; 39.72 \pm 6.89 \text{ vs } 28.86 \pm 2.90, P < 0.01)$.

Conclusion: Long-term medium load endurance exercise can inhibit the expressions of MMP9 and tenascin-C, and also can stabilize the aortic atherosclerotic vulnerable plaque of Apo E-deficient mice.

Author's address Department of Cardiology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029

Key word endurance exercise; apolipoprotein E-deficient mouse; atherosclerosis; matrix metalloproteinase 9; tenascin-C

急性心血管病事件以其高发生率和致死率在疾病中名列前茅,而易损斑块的破裂及继发血栓形成是导致急性心血管病事件的主要原因,稳定易损斑块将有助于减少急性心血管事件的发生,因此,如何稳定易损斑块是目前研究的热点问题。近年有文献报道,适度的运动训练有利于心脏康复,并可减缓动脉粥样硬化的进展^[1]和一定程度的稳定易损斑块的作用。Baldassarre等^[1]研究发现,长期运动有益于稳定动脉粥样硬化斑块,但其稳定易损斑块的作用机制尚不明确。多项研究证实动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程^[2],炎症在动脉粥样硬化的进展中起重要作用,在斑块的稳定性方面也起着决定性的作用,动脉粥样硬化斑块中的上皮细胞、单核、巨噬细胞、平滑肌细胞和泡沫细胞均可分泌炎症因子及基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、腱糖蛋白-C(tenascin-C)等^[3-4],后者在促使动脉粥样硬化斑块向不稳定性发展中起积极作用,近来研究表明,适度的运动训练具有减缓动脉粥样硬化进展及稳定动脉粥样硬化斑块的作用,但是其稳定斑块作用是否与抑制斑块内MMP9、tenascin-C表达有关尚不明确。为此,我们对中等强度长期运动是否可以通过抑制斑块内的MMP9、tenascin-C表达进而对稳定易损斑块进行了探索,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

DSPT202型小动物跑台(杭州立泰);Hitachi 7600生化自动分析仪(日本),抗鼠MMP9(Abcam公司,英国)、抗鼠tenascin-C单克隆抗体(Abcam公

司,英国)。主要仪器:解剖显微镜(Nikon 90i, Nikon公司,日本);偏振光显微镜(Olympus B, Olympus公司,日本),荧光分光光度计(Spectra-Max M2, MDC公司,美国)。Image Pro-plus 6.0图像分析软件购自美国Media Cybernetics公司。

1.2 实验动物

6周龄载脂蛋白E(apolipoprotein E, Apo E)基因敲除小鼠(品系C57/6J,北京大学试验动物中心自美国Jackson实验室引进并培育)40只,均为雄性,体重19—21g,饲以普通饲料(中国医学科学研究所提供,60Coy灭菌照射处理),饲养条件为清洁级2级,自由饮水进食。进食保证通风条件良好,室温22—24℃,相对湿度50%,光照时间12h/d。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与处理:将40只Apo E基因敲除小鼠环境适应性喂养2周后随机分成2组:运动组(A组, $n=20$)和自由运动的对照组(B组)。每天清晨测量体重。运动方案^[6]:先进行2周适应性跑台运动,跑台坡度0°,每周运动5d,运动强度和运动时间每天递增,第1周运动时间逐渐由15min达到45min,每小节运动为3—5min,每次运动中间休息2min,每天运动1—2次,运动速度由8m/min到12m/min。第2周运动时间逐渐增至60min,每小节运动为5min,每天运动2—3次,每次运动中间休息2min,运动逐渐增至速度15m/min,并且该运动方式最后直至实验结束,共持续32周,见表1。

1.3.2 检测项目及方法:采用酶法测定血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)。

斑块面积的定量:每组20只ApoE基因敲除小

表1 小鼠的运动配方表

运动情况	适应期 (第1周)	适应期 (第2周)	运动期 (32周)
跑台坡度(°)	0	0	0
每小节运动时间(min)	3—5	5	5
每天运动时间(min)	15—45	60	60
运动间休息时间(min)	2	2	2
运动速度(m/min)	8—12	15	15
每天运动次数(次)	1—2	2—3	2—3
每周运动天数(d)	5	5	5

鼠均进行斑块面积的定量分析。将带有主动脉根部的心脏离断后,固定于10%福尔马林中。常规石蜡包埋、切片。自主动脉根部近端1mm开始以5 μ m的厚度连续横切,尖端以上200 μ m的至600 μ m的主动脉根部组织,每50 μ m的留取1张切片,将其置于多聚赖氨酸涂层的载玻片上,每只小鼠留取8张切片。这8张切片的斑块面积平均值代表每只小鼠的主动脉根部斑块面积值。将这些切片以HE染色后,测量平均斑块面积和斑块面积。

脂核的估算:由于组织经过乙醇和二甲苯的处理后,95%—99%的斑块脂质发生溶解,上述HE染色后的切片在光学显微镜下可观察到斑块脂质发生溶解后留下的透明区域。这些透明区域可以被定量并代表斑块的脂核面积。

埋藏的破裂纤维帽:HE染色后的切片在光学显微镜下可观察到斑块内不连续的纤维帽组织。

胶原的评估:选取上述切片相邻的切片以0.1%苦味酸天狼猩红染液(Sigma,美国)染色60min,以评估I型和III型胶原。随后在偏振光显微镜(Olympus B, Olympus公司,日本)下摄影,对主动脉根部斑块的胶原含量进行定量分析。

免疫组化:将主动脉根部斑块MMP9、tenascin-C的表达进行定量分析。在室温下分别与抗鼠MMP-9多克隆抗体(1:400稀释),抗鼠tenascin-C(1:300稀释)单克隆抗体孵育,然后使用相应的二抗在室温条件下与一抗结合。标本使用尼康90i生物显微镜成像系统采集图像,结果由一名不了解实验方案的人员使用Image Pro-Plus 6.0图像分析软件(美国Macro Media公司生产)进行资料分析。

1.4 统计学分析

采用盲终点的方法对结果进行评定,组间比较采用方差分析及 t 检验的方法,全部数据以均数 $\pm$ 标准

差表示。数据使用SPSS 17.0版处理。

2 结果

2.1 血脂水平

运动组血脂水平较对照组有显著降低,见表2。

2.2 斑块面积脂核面积的定量评估

实验结束时,所有实验小鼠的主动脉根部都有典型的斑块形成,两组的代表性横断面切片见图1。实验结束后对每组20只小鼠,每只8个切片的测定结果显示:与对照组比较运动组的斑块面积减少了35.57%($P < 0.01$),与对照组比较运动组的脂核面积减少了62.83%($P < 0.01$),见表3。

2.3 埋藏的破裂纤维帽的比较

实验结束后对每组20只小鼠,每只8个切片的测定结果显示:与对照组比较运动组斑块中埋藏的破裂纤维帽数目显著减少(5.22 ± 0.77 vs 1.03 ± 0.42 , $P < 0.01$),见表3,图1。

2.4 胶原含量的变化

实验结束后对每组20只小鼠,每只8个切片的测定结果显示:与对照组比较运动组斑块的胶原含量显著增多($67.41\% \pm 7.88\%$ vs $21.22\% \pm 8.63\%$, $P < 0.01$),见表3,图2。

2.5 免疫组化结果

实验结束后对每组20只小鼠,每只8个切片的测定结果显示:与对照组比较,运动组斑块中MMP9、tenascin-C的表达均显著低于对照组(47.02 ± 8.55 vs 36.67 ± 4.51 , $P < 0.01$; 39.72 ± 6.89 vs 28.86 ± 2.90 , $P < 0.01$),见表4,图3—4。

表2 两组间Apo E基因敲除小鼠血脂比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	动物数	胆固醇	甘油三酯
运动组	20	11.89 ± 3.08^{①}	1.33 ± 0.71^{①}
对照组	20	16.01 ± 4.11	3.32 ± 1.02

①与对照组比较 $P < 0.01$

表3 两组间Apo E基因敲除小鼠主动脉斑块的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	运动组(n=20)	对照组(n=20)
脂核面积(μm^2)	21279 ± 2104^{②}	57247 ± 3982
斑块面积(μm^2)	70932 ± 4669^{②}	110092 ± 10202
脂核面积/斑块面积	0.30 ± 0.17^{①}	0.52 ± 0.15
胶原含量(%)	67.41 ± 7.88^{②}	21.22 ± 8.63
埋藏纤维帽的平均数	1.03 ± 0.42^{②}	5.22 ± 0.77

与对照组比较:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$

表4 运动组与对照组治疗后MMP9、tenascin-C
阳性区域百分比情况 (x±s)

变量	对照组(n=20)	治疗组(n=20)
MMP9	47.02±8.55	36.67±4.51 ^①
tenascin-C	39.72±6.89	28.86±2.93 ^①

①与对照组比较P<0.01

图1 主动脉斑块的比较 (HE染色,×200)

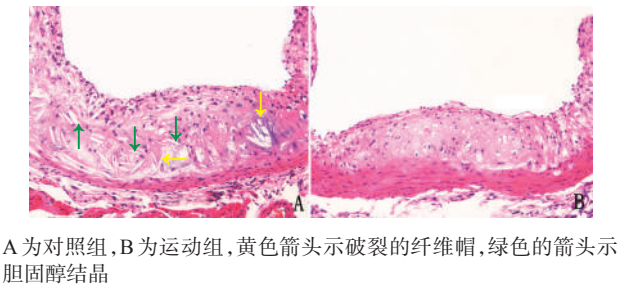


图2 主动脉斑块的胶原比较 (天狼猩红染色,×400)

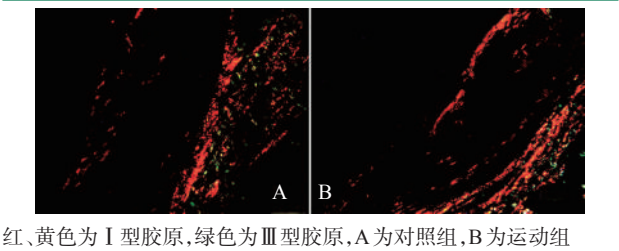


图3 主动脉斑块的MMP9表达 (×200)

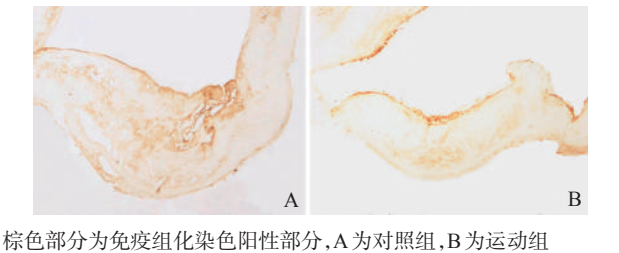
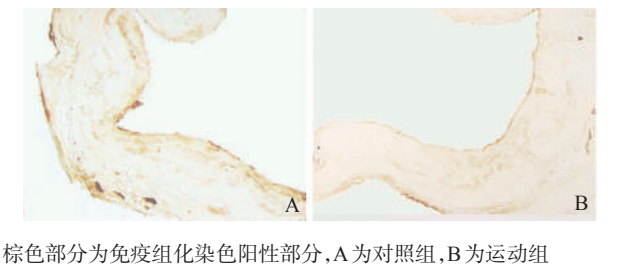


图4 主动脉斑块的tenascin-C表达 (×200)



3 讨论

3.1 长期中等负荷耐力运动对Apo E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化易损斑块的稳定作用

易损斑块的破裂及继发血栓形成是导致心血管病事件的主要原因,稳定易损斑块将有利于减少心血管病事件的发生,Apo E基因敲除小鼠的动脉粥样硬化斑块与人的动脉粥样硬化斑块极为相似^[6]。其斑块的形成和组成与人的动脉粥样硬化斑块相一致,因此,Apo E基因敲除小鼠是研究易损斑块的理想动物模型,并且也被广泛应用于易损斑块的研究,本研究也选用了Apo E基因敲除小鼠作为易损斑块的动物模型进行了相应研究。

负荷运动在动脉粥样硬化的进程中起积极的防御作用,国内外多项研究^[7-9]表明,运动可以减缓动脉粥样硬化的进展并具有一定程度稳定斑块的作用。Nounou等^[7]研究发现,为期6周的运动治疗可以明显减轻大鼠的动脉粥样硬化进展及减轻心肌梗死后的动脉粥样硬化性缺血损伤。Lee S^[8]经对糖尿病小鼠进行为期9周的运动训练后发现可以减缓动脉粥样硬化的进展。吴继全等^[9]研究发现运动负荷可以显著延缓Apo E基因敲除小鼠冠状动脉粥样硬化的进展。而Shimada K等^[10]进行了为期8周负荷运动发现对Apo E基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块具有一定的稳定作用,Kadoglou^[11]的研究也表明6周的负荷运动对Apo E基因敲除小鼠主动脉斑块具有稳定作用。但是,中长期负荷运动是否对动脉粥样硬化易损斑块具有稳定作用尚未见报道,本研究进行了为期32周的中长期负荷运动,结果发现对Apo E基因敲除小鼠主动脉易损斑块具有很好的稳定作用。

3.2 长期中等负荷耐力运动对Apo E基因敲除小鼠主动脉MMP9、tenascin-C的调控作用

多项研究表明动脉粥样硬化是慢性炎症性病变,动脉壁上的平滑肌细胞、内皮细胞以及动脉壁上的淋巴细胞、巨噬细胞以及泡沫细胞等均可产生炎症因子如:趋化因子、黏附因子、组织因子以及CD40、MMP9等^[12-17],而炎症因子又会刺激动脉壁的炎症细胞加速动脉粥样硬化的进展,其中MMP9对斑块的稳定性影响较大,它可促使斑块中基质成分的溶解,使斑块中的纤维帽变薄,促使斑块向不稳

定状态转变。我们既往的研究也证实 MMP9 在斑块的稳定性中起重要作用^[18],近来研究表明 tenascin-C 与 MMP9 之间关系密切,并相互影响,在斑块的稳定性中影响较大。

Tenascin-C 是血管外基质糖蛋白,在血管壁的损伤时出现表达并参与了斑块的形成与破裂,是导致心血管病事件的主要原因之一^[19]。在组织损伤时特异而短暂表达,并可通过调节炎症与纤维化进程调节组织的修复^[4,20]。近期研究表明,tenascin-C 在心脏和血管的损伤中发挥重要作用。Wallner^[21]首先发现人动脉粥样硬化斑块中具有 tenascin-C 的表达,其表达随斑块的进展而增加,其在富含脂质的斑块中表达显著增高,主要分布在脂质核的周围,在破裂斑块的破裂处 tenascin-C 也强烈表达。tenascin-C 与冠状动脉的易损斑块也是密切相关的,在斑块的近血栓处、炎症浸润处及斑块内出血的部位 tenascin-C 的表达也显著增高。

近期的研究表明 tenascin-C 与 MMPs 之间具有相互作用,MMPs 可促使 tenascin-C 的表达,而 tenascin-C 的表达也受 MMPs 的影响,当使用抑制剂阻断 MMPs 的表达后,tenascin-C 的表达也显著下降,两者之间相互影响,在斑块的稳定性中起重要作用。

本研究结果显示负荷运动治疗后显著降低了 tenascin-C 和 MMP9 的表达,并使斑块内的胶原含量显著增加,从而说明 tenascin-C 与 MMP9 可能是负荷运动影响斑块稳定性的重要作用位点与通路,中长期的负荷运动可能通过抑制 tenascin-C 与 MMP9 的表达起到稳定斑块的作用。

参考文献

- [1] Baldassarre D, Veglia F, Hamsten A, et al. Progression of carotid intima-media thickness as predictor of vascular events: results from the IMPROVE study[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(9):2273—2279.
- [2] Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, et al. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 230(1):92—99.
- [3] Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7):14008—14023.
- [4] Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling: from development to inflammation and repair[J]. *Circ J*, 2012, 76(11):2513—2520.
- [5] Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, et al. Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice[J]. *J Vasc Res*, 2011, 48(4):347—356.
- [6] Bot I, de Vries H, Korporaal SJ, et al. Adenosine A-B receptor agonism inhibits neointimal lesion development after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9):2197—2205.
- [7] Nounou HA, Deif MM, Shalaby MA. Effect of flaxseed supplementation and exercise training on lipid profile, oxidative stress and inflammation in rats with myocardial ischemia[J]. *Lipids Health Dis*, 2012, (11):129.
- [8] Lee S, Park Y, Zhang C. Exercise training prevents coronary endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice[J]. *Am J Biomed Sci*, 2011, 3(4):241—252.
- [9] 吴继全,程文立,陈莉,等.运动对 Apo E 基因敲除小鼠冠状动脉超氧化物阴离子和 NF- κ B 的调控作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2013,28(8):694—698.
- [10] Shimada K, Mikami Y, Murayama T, et al. Atherosclerotic plaques induced by marble-burying behavior are stabilized by exercise training in experimental atherosclerosis[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 151(3):284—289.
- [11] Kadoglou NP, Moustardas P, Kapelouzou A, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis[J]. *Eur J Histochem*, 2013, 57(1):e3.
- [12] Kong L, Luo C, Li X, et al. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits[J]. *Lipids Health Dis*, 2013, (12):115.
- [13] Cipriani S, Francisci D, Mencarelli A, et al. Efficacy of the CCR5 antagonist maraviroc in reducing early, ritonavir-induced atherogenesis and advanced plaque progression in mice[J]. *Circulation*, 2013, 127(21):2114—2124.
- [14] Spirig R, Schaub A, Kropf A, et al. Reconstituted high-density lipoprotein modulates activation of human leukocytes [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e71235.
- [15] Dabek J, Glogowska-Ligus J, Szadorska B. Transcription activity of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinase genes and their tissue inhibitor (TIMP-2) in acute coronary syndrome patients[J]. *J Postgrad Med*, 2013, 59(2):115—120.
- [16] Mathapati S, Arumugam SB, Verma RS, et al. High cholesterol diet increases MMP9 and CD40 immunopositivity in early atherosclerotic plaque in rabbits[J]. *Acta Histochem*, 2010, 112(6):618—623.
- [17] Tao M, Yu P, Nguyen BT, et al. Locally applied leptin induces regional aortic wall degeneration preceding aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2):311—320.
- [18] Chen L, Cheng WL, Wang Y, et al. Alprostadil liposome microsphere preparation stabilizes vascular plaques and inhibits intra-plaque inflammation[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(24):4380—4385.
- [19] Wang L, Shah PK, Wang W, et al. Tenascin-C deficiency in apo E^{-/-} mouse increases eotaxin levels: implications for atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2):267—274.
- [20] Wang L, Wang W, Shah PK, et al. Deletion of tenascin-C gene exacerbates atherosclerosis and induces intraplaque hemorrhage in Apo-E-deficient mice[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(5):398—413.
- [21] Wallner K, Shah PK, Sharifi BG. Balloon catheterization induces arterial expression of new Tenascin-C isoform[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161(1):75—83.