

HO-1 减轻大鼠颈动脉球囊损伤后的内膜增生

杨根欢 姚荣彦 汪 岩 廖鹏志 贾玉龙

摘 要 **目的** 探讨血红素加氧酶-1(HO-1)能否减轻大鼠颈动脉球囊损伤后的内膜增生。**方法** 20只雄性SD大鼠随机分为正常并注射生理盐水组、球囊损伤并注射生理盐水组、球囊损伤并注射氯化血红素组、球囊损伤并注射锌原卟啉组。建立大鼠颈动脉球囊损伤模型,14天后取各组大鼠的颈动脉。弹力蛋白染色并计算各组大鼠颈动脉的内膜面积与中膜面积的比值(i/m)。Western blot法检测各组大鼠颈动脉内HO-1、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达情况。**结果** 球囊损伤能够明显诱导大鼠颈动脉i/m值的增加($P < 0.01$)。球囊损伤并注射氯化血红素组的颈动脉i/m值明显低于球囊损伤并注射生理盐水组($P < 0.01$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组的颈动脉i/m值明显高于球囊损伤并注射生理盐水组($P < 0.01$)。球囊损伤并注射生理盐水组颈动脉的NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达明显高于正常并注射生理盐水组。球囊损伤并注射氯化血红素组NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达明显低于球囊损伤并注射生理盐水组($P < 0.05$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达明显高于球囊损伤并注射生理盐水组($P < 0.01$)。**结论** 球囊损伤能够诱导大鼠颈动脉的炎症反应及内膜增生,HO-1能够减轻大鼠颈动脉球囊损伤后的内膜增生。

关键词 血红素加氧酶-1 球囊损伤 炎症反应 内膜增生

中图分类号 R364

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.025

Heme Oxygenase-1 can Inhibit the Intima Hyperplasia in Rat Carotid Arteries after Balloon Injury. Yang Genhuan, Yao Rongyan, Wang Yan, et al. Department of Vascular Surgery, Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of heme oxygenase-1 (HO-1) on intima hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury. **Methods** Twenty male sprague-dawley rats were randomized into groups of normal with saline injected, balloon injured with saline injected, balloon injured with hemin injected, and balloon injured with Zincprotoporphyrin injected. An established balloon-induced carotid artery injury was performed. And carotid arteries were harvested from the four groups 14 days later. The ratio of intima to media (i/m) and expression of NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were measured. **Results** The hemin or Zincprotoporphyrin could induce or inhibit the expression of HO-1 in rat carotid arteries. The balloon injury could significantly induced the increasing of i/m and the expression of NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Hemin could minimize this effect caused by balloon injury, while Zincprotoporphyrin could aggravate this effect. **Conclusion** HO-1 could inhibit the intima hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury through alleviating the inflammation.

Key words Heme oxygenase-1; Balloon injury; Inflammation; Intima hyperplasia

动脉硬化闭塞症是目前中老年人群中的常见病及多发病,主要表现为动脉管腔的狭窄甚至闭塞。其主要治疗方法是血管腔内成型术,包括球囊扩张和支架置入^[1]。但是血管腔内成型术后血管的再次狭窄或闭塞却始终制约着其长期疗效^[2]。HO-1是血红素在体内代谢的限速酶,具有重要的抗炎及抗氧化作用^[3,4]。已有研究表明HO-1对血管内皮有重要的保护作用^[5]。本研究阐明了HO-1能够抑制血管的

炎症反应,能够减轻大鼠颈动脉球囊损伤后的内膜增生。

材料与方法

1. 材料与试剂:SPF级SD大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),氯化血红素(Hemin;美国Sigma-Aldrich公司),锌原卟啉-9(ZnPP;美国Sigma-Aldrich公司),2F动脉取栓球囊(美国Edwards Lifesciences公司),弹力蛋白染色试剂盒褪黑素(美国Sigma-Aldrich公司),HO-1抗体(美国BD公司)、NF- κ B抗体(美国Cell Signaling Technology公司),IL-1 β 抗体(美国Boster Biological Technology公司),IL-6抗体(美国Boster Biological Technology公司),TNF- α 抗体(美国Boster Biological Technolo-

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院血管外科(杨根欢、汪岩、廖鹏志、贾玉龙);100084 北京,清华大学医学院基础医学系(姚荣彦)

通讯作者:贾玉龙,电子信箱:drjia@sina.com

gy 公司)。

2. 动物实验及大鼠颈动脉球囊损伤模型的制备: 将 20 只平均体重 350g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常并注射生理盐水组、球囊损伤并注射生理盐水组、球囊损伤并注射氯化血红素组、球囊损伤并注射锌原卟啉组, 每组 5 只。腹腔注射 2% 的戊巴比妥麻醉后, 肌肉注射青霉素 40 万单位, 皮下注射肝素 100U/kg。仰卧位并固定, 于颈部行正中切口, 解剖出颈总动脉及颈内外动脉并套带, 结扎颈外动脉的远端及其分支。分别阻断颈总动脉及颈内动脉, 显微剪刀剪开颈外动脉前壁约 2mm, 通过切口插入 2F 的取栓球囊, 至进入颈总动脉约 2cm。将球囊内注入 0.05ml 生理盐水, 待球囊充盈后, 将其拉至颈总动脉远端, 如此反复操作 3 次, 最后结扎颈外动脉的近端并缝合切口。按照实验设计方案各组分别腹腔注射氯化血红素 (HO-1 诱导剂; 50mg/kg)、锌原卟啉 (HO-1 抑制剂; 15mg/kg) 及同体积的生理盐水, 隔日 1 次^[6]。14 天后解剖并取出各组大鼠的颈动脉。用生理盐水冲洗干净后, 部分保存于液氮中, 部分保存于 4% 的多聚甲醛中, 留待后续实验用。

3. 弹力蛋白染色: 将颈动脉在 4% 的多聚甲醛中固定 72h 后, 按照常规方法行石蜡包埋并切片。将切片脱蜡并水化, 然后置于弹力蛋白染色工作液中 10min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 10min。再将切片置于三氯化铁工作液中分化 1~2min, 自来水冲洗, 显微镜下观察, 弹力蛋白被染至黑色。再将切片置于 95% 乙醇中脱碘 1min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 2min。然后置于 Van Gieson 溶液中染色 3~5min 后用 95% 的乙醇冲洗。常规进行脱水、透明及封片。将弹力蛋白染色切片置于光学显微镜下拍照 ($\times 100$)。用 Image-Pro Plus 6.0 软件 (美国 Media Cybernetics 公司) 测量其内膜面积和中膜面积, 内膜面积与中膜面积的比值 (i/m) 代表血管内膜的增生程度, 用于统计学分析。

4. Western blot 法检测: 将液氮中保存的大鼠颈动脉标本置于研钵中, 加入 600 μ l SDS 组织裂解液并研磨成匀浆, 提取组织蛋白后并测定蛋白浓度。将 20 μ g 总蛋白上样, 120V 恒压电泳约 90min, 320mA 恒流转膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 60min, 4 $^{\circ}$ C 一抗孵过夜 (HO-1 1:2000; NF- κ B 1:2000; IL-1 β 1:500; IL-6 1:500; TNF- α 1:500), 洗膜后室温下二抗 (浓度 1:5000~1:10000) 孵育 60min, 然后辣根过氧化物酶化学发光法检测目的蛋白。Western blot 法检测结

果用 Alpha EaseFC System 软件 (美国 Alpha Innotech 公司) 进行分析, 计算出目的蛋白与相应内参的灰度值比值, 用于统计分析。

5. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数间的比较采用 *t* 检验, 多样本均数间的比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠颈动脉 i/m 值情况: 球囊损伤并注射生理盐水组颈动脉的 i/m 值显著高于正常并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射氯化血红素组颈动脉 i/m 值显著低于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组颈动脉 i/m 值显著高于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$, 图 1)。

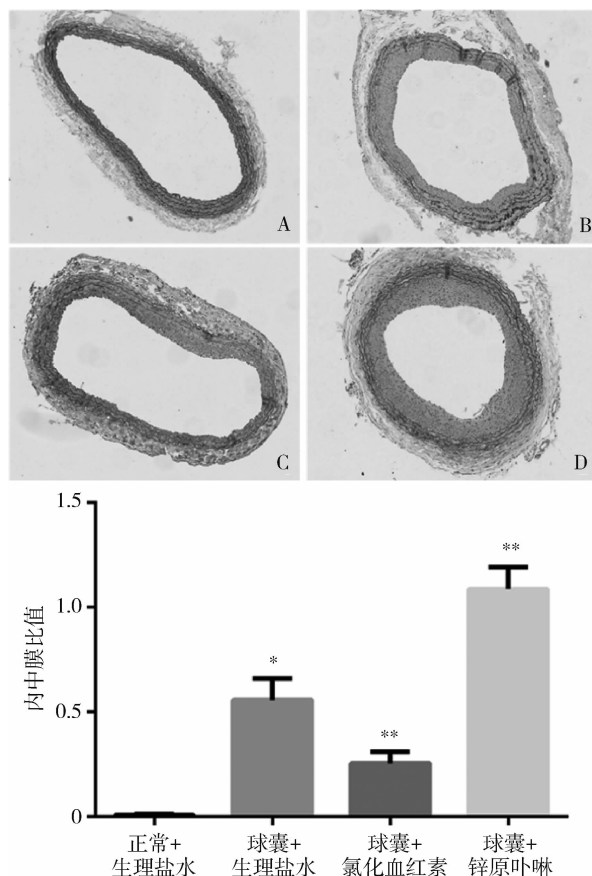


图 1 不同处理组大鼠颈动脉的弹力蛋白染色和内中膜比值
A. 正常 + 生理盐水组; B. 球囊 + 生理盐水组; C. 球囊 + 氯化血红素组; D. 球囊 + 锌原卟啉组; 与正常 + 生理盐水组比较, * $P < 0.01$; 与球囊 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.01$

2. 各组大鼠颈动脉内 HO-1 的表达情况: 球囊损伤并注射生理盐水组颈动脉 HO-1 的表达高于正

常并注射生理盐水组 ($P < 0.05$)。球囊损伤并注射氯化血红素组颈动脉 HO-1 表达显著高于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组颈动脉 HO-1 的表达显著低于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$, 图 2)。

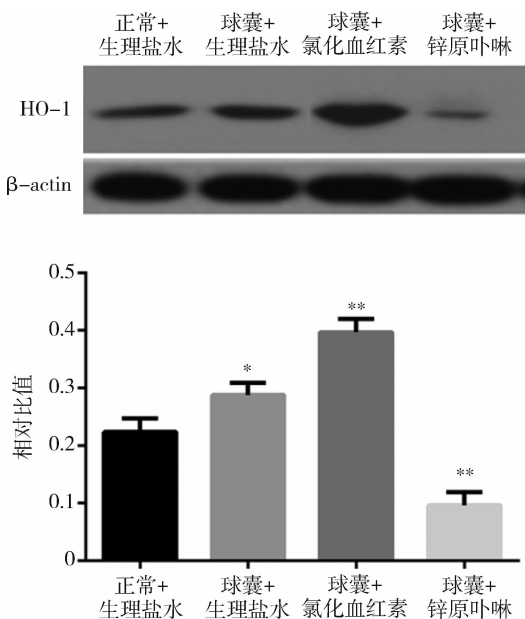


图 2 不同处理组大鼠颈动脉 HO-1 表达情况

与正常 + 生理盐水组比较, * $P < 0.05$; 与球囊 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.01$

3. 各组大鼠颈动脉内 NF- κ B 的表达情况: 球囊损伤并注射生理盐水组颈动脉的 NF- κ B 表达显著高于正常并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射氯化血红素组颈动脉的 NF- κ B 表达显著低于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.05$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组颈动脉的 NF- κ B 表达显著高于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$, 图 3)。

4. 各组大鼠颈动脉内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达情况: 球囊损伤并注射生理盐水组颈动脉的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达显著高于正常并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射氯化血红素组颈动脉的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达显著低于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$)。球囊损伤并注射锌原卟啉组颈动脉的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达显著高于球囊损伤并注射生理盐水组 ($P < 0.01$, 图 4)。

讨 论

血管腔内成型术治疗动脉硬化闭塞症的同时又对血管内皮造成了“二次损伤”。这种“二次损伤”便

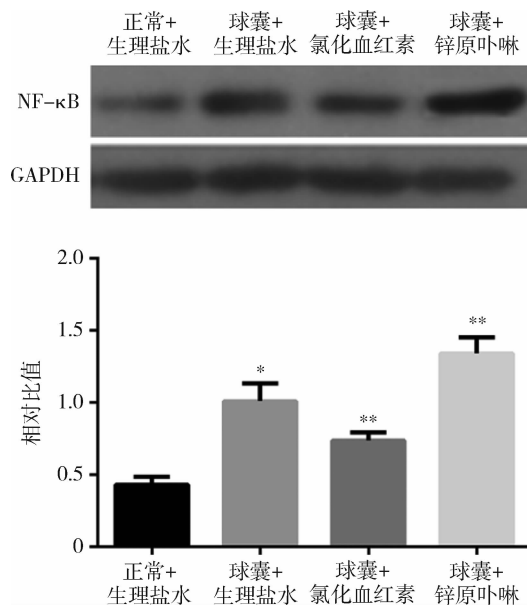


图 3 不同处理组大鼠颈动脉 NF- κ B 表达情况

与正常 + 生理盐水组比较, * $P < 0.01$; 与球囊 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.05$

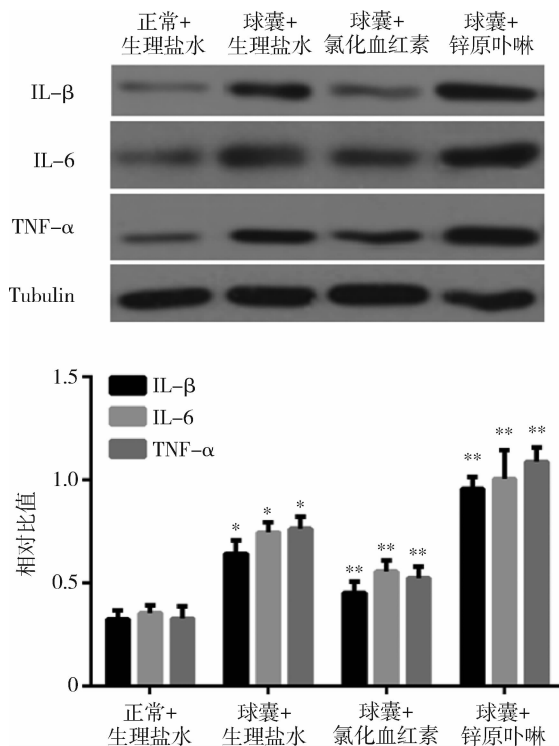


图 4 不同处理组大鼠颈动脉 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达情况

与正常 + 生理盐水组比较, * $P < 0.01$; 与球囊 + 生理盐水组比较, ** $P < 0.01$

可诱导血管内皮的增生, 导致血管腔内成型术后管腔的再次狭窄^[7]。本研究中的应用球囊损伤大鼠的颈动

脉便模拟了血管腔内成型术治疗动脉硬化闭塞症的过程。目前研究证实多种因素参与了血管内皮的增生,主要包括炎症细胞的浸润、平滑肌细胞的增值和迁移、血小板的黏附等^[8]。而研究证实炎症损伤是血管内皮增生过程中的核心环节^[9,10]。HO-1 是血红素在体内代谢的限速酶,也是内源性的细胞保护酶^[11]。HO-1 属于诱导型的血红素氧化酶,细胞在氧化应激、内毒素、缺氧、重金属等刺激下其表达会增高^[12]。已有研究表明 HO-1 具有重要的抗炎、抗氧化、抗凋亡等生物学功能^[13]。它在很多血管相关性疾病中发挥着重要的保护作用,如动脉粥样硬化、高血压等^[14]。氯化血红素是 HO-1 的诱导剂,目前临床上主要用于治疗卟啉病及贫血等,无明显毒性不良反应^[15]。

本研究中球囊损伤明显导致了大鼠颈动脉的内膜增生,注射氯化血红素后内膜增生明显减轻,而应用锌原卟啉后则加重了内膜增生。同时氯化血红素成功诱导了 HO-1 的合成,锌原卟啉明显抑制了 HO-1 的合成。这表明 HO-1 能够显著减轻球囊损伤诱导的大鼠颈动脉内膜增生。进一步的炎症因子 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的检测,表明 HO-1 是通过抑制炎症反应而减轻球囊损伤诱导的大鼠颈动脉内膜增生。NF- κ B 是一重要的炎症介质,它的表达增多能够激发一系列的炎症反应并诱导包括 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在内的大量炎症因子的表达,这与本研究结果一致^[16,17]。另外本研究观察到球囊损伤能够诱导正常颈动脉中 HO-1 的表达,这可能是由于球囊对颈动脉的损伤能够引起颈动脉内 HO-1 代偿性的表达增高以修复此损伤。同时本研究尚表明,氯化血红素在预防血管腔内成形术后管腔的再狭窄上可能具有潜在的应用价值。

参考文献

- Liang GZ, Zhang FX. Novel devices and specialized techniques in recanalization of peripheral artery chronic total occlusions (CTOs) - A literature review[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 165(3): 423-429
- Yang GH, Li YC, Wang ZQ, *et al*. Protective effect of melatonin on cigarette smoke-induced restenosis in rat carotid arteries after balloon injury[J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(4): 451-458
- Yang GH, Wu W, Li YC, *et al*. Anti-oxidant effect of heme oxygenase-1 on cigarette smoke-induced vascular injury[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2481-2486
- Ryter SW, Choi AM. Targeting heme oxygenase-1 and carbon mon-

- oxide for therapeutic modulation of inflammation[J]. *Transl Res*, 2016, 167(1): 7-34
- Li T, Tian H, Zhao Y, *et al*. Heme oxygenase-1 inhibits progression and destabilization of vulnerable plaques in a rabbit model of atherosclerosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(13): 143-152
- Ni L, Wang ZQ, Yang GH, *et al*. Heme oxygenase-1 alleviates cigarette smoke-induced restenosis after vascular angioplasty by attenuating inflammation in rat model[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 245(12): 99-105
- Elmore JB, Mehanna E, Parikh SA, *et al*. Restenosis of the coronary arteries: past, present, future directions[J]. *Interv Cardiol Clin*, 2016, 5(3): 281-293
- Kushima H, Mori Y. The role of endothelial nitric oxide in the anti-restenotic effects of liraglutide in a mouse model of restenosis[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2017, 16(1): 122-139
- Wang F, Li C, Ding FH, *et al*. Increased serum TREM-1 level is associated with in-stent restenosis, and activation of TREM-1 promotes inflammation, proliferation and migration in vascular smooth muscle cells[J]. *Atherosclerosis*, 2017, 267(4): 10-18
- Wu BJ, Li Y, Ong KL, *et al*. Reduction of in-stent restenosis by cholesteryl ester transfer protein inhibition[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(12): 2333-2341
- Rochette L, Zeller M, Cottin Y, *et al*. Redox functions of heme oxygenase-1 and biliverdin reductase in diabetes[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(2): 74-85
- Dolinay T, Choi A, Ryter SW. Heme oxygenase-1/CO as protective mediators in cigarette smoke-induced lung cell injury and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(6): 769-776
- Kozakowska, M, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 - more than the cytoprotection[J]. *Postepy Biochem*, 2015, 61(2): 147-158
- Otterbein LE, Foresti R, Motterlini R. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the heart: the balancing act between danger signaling and pro-survival[J]. *Circ Res*, 2016, 118(12): 1940-1959
- Neubauer JA, Sunderram J. Heme oxygenase-1 and chronic hypoxia[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 184(2): 178-185
- Zabalgoitia M, Colston JT, Reddy SV, *et al*. Carbon monoxide donors or heme oxygenase-1 (HO-1) overexpression blocks interleukin-18-mediated NF- κ B-PTEIN-dependent human cardiac endothelial cell death[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(3): 284-298
- Grassia G, Maddaluno M, Musilli C, *et al*. The I κ B kinase inhibitor nuclear factor- κ B essential modulator-binding domain peptide for inhibition of injury-induced neointimal formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2458-2466

(收稿日期:2018-02-10)

(修回日期:2018-03-04)