

褪黑素减轻大鼠颈动脉球囊损伤后炎性细胞浸润

杨根欢 汪 岩 廖鹏志 贾玉龙

摘 要 **目的** 探讨褪黑素对大鼠的颈动脉球囊损伤后炎性细胞浸润的影响。**方法** 随机将 20 只雄性 SD 大鼠分为正常对照组、正常并注射褪黑素组、球囊损伤组、球囊损伤并注射褪黑素组。将各组大鼠的颈动脉行球囊损伤,14 天后取出实验大鼠的颈动脉。免疫组织化学染色检测实验大鼠颈动脉内的 CD45 表达情况。Western blot 法检测实验大鼠颈动脉内的 NF- κ B、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达情况。**结果** 球囊损伤能明显诱导实验大鼠颈动脉壁内的炎性细胞浸润。球囊损伤并注射褪黑素组大鼠的炎性细胞浸润程度显著低于球囊损伤组大鼠($P < 0.01$)。球囊损伤组大鼠的 NF- κ B、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达显著高于正常对照组大鼠($P < 0.01$)。球囊损伤并注射褪黑素组大鼠的 NF- κ B、MCP-1、VCAM-1、ICAM-1 的表达显著低于球囊损伤组大鼠($P < 0.05$)。**结论** 球囊损伤能明显诱导实验大鼠颈动脉的炎性细胞浸润和炎性因子的表达,褪黑素能够减轻此炎性细胞浸润。

关键词 褪黑素 球囊损伤 炎性细胞 炎性反应

中图分类号 R364

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.035

Melatonin Could Inhibit the Infiltration of Inflammatory Cells in Rat Carotid Arteries after Balloon Injury. Yang Genhuan, Wang Yan, Liao Pengzhi, et al. Department of Vascular Surgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of melatonin on infiltration of inflammatory cells in rat carotid artery after the balloon injury. **Methods** Twenty male sprague-dawley rats were randomized into control group, normal with melatonin injected group, balloon injured group and balloon injured with melatonin injected group. An established balloon-induced carotid artery injury was performed. The carotid artery was harvested after 14 days. Immunohistochemistry staining was used to evaluate the expression of CD45. And Western blot was performed to detected the expression of NF- κ B, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1. **Results** The balloon injury could significantly induced the infiltration of inflammatory cells and the expression of NF- κ B, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1 in rat carotid artery. Melatonin could minimize this effect caused by balloon injury. **Conclusion** Melatonin could inhibit the infiltration of inflammatory cells and the expression of inflammatory mediators in rat carotid arteries after balloon injury.

Key words Melatonin; Balloon injury; Inflammatory cell; Inflammation

随着经济的进步和人群膳食结构的改变,动脉粥样硬化的发生呈现出年轻化的趋势。因而血管相关性疾病的发生率越来越高,尤其是心脑血管疾病已成为重要的致死、致残的原因之一。动脉粥样硬化最基本的病理变化便是炎性细胞浸润^[1]。褪黑素在体内分布广泛,相对分子质量较小,可以自由通过细胞膜性结构^[2]。已有研究表明,褪黑素具有强大的抗炎和抗氧化功能^[3]。本研究表明,褪黑素能够抑制炎性细胞浸润过程中相关炎性因子的表达,进而减轻球囊损伤诱导的实验大鼠颈动脉内炎性细胞的浸润。

材料与方法

1. 材料与试剂:SPF 级雄性 SD 大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),褪黑素(美国 Sigma 公

司),免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),NF- κ B 抗体(美国 CST 公司),MCP-1 抗体(美国 Santa Cruz 公司);ICAM-1 抗体和 VCAM-1 抗体(中国博士德生物工程有限公司)。

2. 球囊损伤模型的制备及动物实验:20 只 SPF 级的雄性 SD 大鼠,平均体质量为 350g。随机将实验大鼠分为正常对照组、正常并注射褪黑素组、球囊损伤组、球囊损伤并注射褪黑素组,每组 5 只。将实验大鼠麻醉后行颈部正中切口,解剖出颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉并套线备用,将颈外动脉的远端及其分支结扎。将颈总动脉和颈内动脉阻断,将颈外动脉用显微剪刀剪开,将 2F 的取栓球囊插入颈总动脉内约 2cm。将 0.05ml 的 0.9% NaCl 注射液注入取栓球囊内,充盈后拖至颈总动脉的远端,如此反复 3 次,随后行颈外动脉的断端结扎,逐层缝合颈部切口。按照预定实验设计定时对各组实验大鼠分别行腹腔内注

作者单位:100070 首都医科大学附属北京天坛医院血管外科

通讯作者:贾玉龙,电子邮箱:drjia@sina.com

射褪黑素(5mg/kg)及同体积的0.9% NaCl注射液,每日1次^[4]。14天后取出各组实验大鼠的球囊损伤段颈动脉。0.9% NaCl注射液将颈动脉冲洗干净,将颈动脉一分为二,分别保存于4%的多聚甲醛和液氮中,用于后续实验。

3. 免疫组织化学染色:常规方法对石蜡切片进行脱蜡及水化,柠檬酸盐抗原修复液浸泡后行高压、高温修复抗原,室温下用3%过氧化氢溶液孵育10min以灭活内源性的过氧化物酶,然后室温下用5%的山羊血清封闭30min。一抗4℃下孵育过夜(CD45 1:50),二抗室温下孵育60min。DAB法染色,阳性表达为棕黄色。终止染色后用苏木精复染5min,0.1%盐酸乙醇分化3~5s,自来水冲洗返蓝2min,然后常规进行脱水、透明、封片。将免疫组织化学的切片置于光学显微镜下拍照(×400),用Image-Pro Plus 6.0软件对CD45阳性区域的平均吸光度值进行分析,将相应数值用于统计分析。

4. Western blot法检测:将大鼠的颈动脉标本加入600μl SDS组织裂解液,置于研钵中,研磨成组织匀浆,常规方法提取组织蛋白并测定蛋白浓度。将总量为20μg的蛋白上样,120V的恒压下电泳约

90min,320mA的恒流下进行转膜,室温下用5%脱脂牛奶封闭1h,4℃下一抗孵育12h(NF-κB 1:2000, MCP-1 1:2000, ICAM-1 1:500, VCAM-1 1:500),TBST洗膜3次,在室温下二抗(浓度1:5000)孵育1h,之后应用辣根过氧化物酶化学发光法检测目标蛋白。用Alpha EaseFC system软件(美国Alpha Innotech公司)对Western blot法检测结果进行分析,分别测量目标蛋白和相应内参的灰度值,将其比值用于统计学分析。

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

结 果

1. 各组实验大鼠的颈动脉壁内炎性细胞的浸润情况:球囊损伤组实验大鼠的颈动脉壁内炎性细胞的浸润程度显著高于正常对照组实验大鼠($P < 0.01$)。球囊损伤并注射褪黑素组实验大鼠的颈动脉壁内炎性细胞的浸润程度显著低于球囊损伤组实验大鼠($P < 0.01$,图1)。

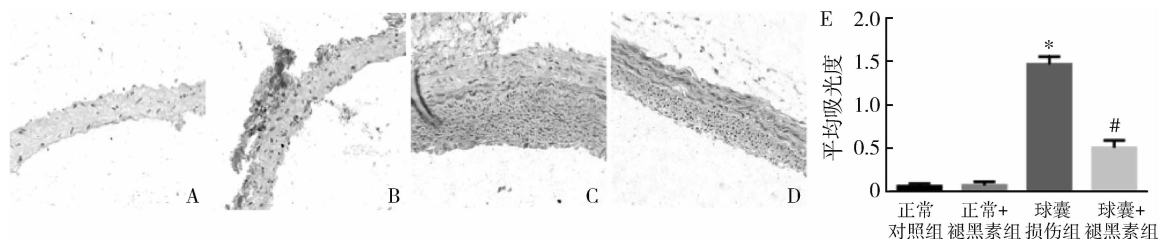


图1 各组实验大鼠的颈动脉壁内炎性细胞浸润情况(CD45免疫组化染色,×400)

A. 正常对照组;B. 正常+褪黑素组;C. 球囊损伤组;D. 球囊+褪黑素组;E. 与正常对照组或正常+褪黑素组比较,* $P < 0.01$;与球囊损伤组比较,# $P < 0.01$

2. 各组实验大鼠的颈动脉内NF-κB的表达情况:球囊损伤组实验大鼠的颈动脉内NF-κB的表达显著高于正常对照组实验大鼠($P < 0.01$)。球囊损伤并注射褪黑素组实验大鼠的颈动脉内NF-κB的表达显著低于球囊损伤组实验大鼠($P < 0.01$,图2)。

3. 各组实验大鼠的颈动脉内MCP-1、VCAM-1和ICAM-1的表达情况:球囊损伤组实验大鼠的颈动脉内MCP-1、VCAM-1和ICAM-1的表达显著高于正常对照组实验大鼠($P < 0.01$)。球囊损伤并注射褪黑素组实验大鼠的颈动脉内MCP-1、VCAM-1和ICAM-1的表达显著低于球囊损伤组实验大鼠($P < 0.05$,图3)。

讨 论

随着人类的疾病谱的改变,社会对血管疾病的认识和重视程度也越来越高。而炎症作为一重要的病理生理过程参与了很多常见血管病的发生,甚至在某些血管病中可以作为最主要的病理改变,如动脉粥样硬化、多发性大动脉炎和白塞病等^[5,6]。褪黑素作为体内重要的内分泌物质,能够被体内很多器官合成。褪黑素具有调节人体的生物节律、调节肠道的功能、抑制肿瘤的生长、抗炎性损伤和抗氧化损伤等重要生理功能^[7,8]。目前国内外普遍将褪黑素应用于调节人体睡眠及肠道生理功能方面,效果显著且无明显的毒性不良反应。已有研究表明,在很多血管疾病中褪

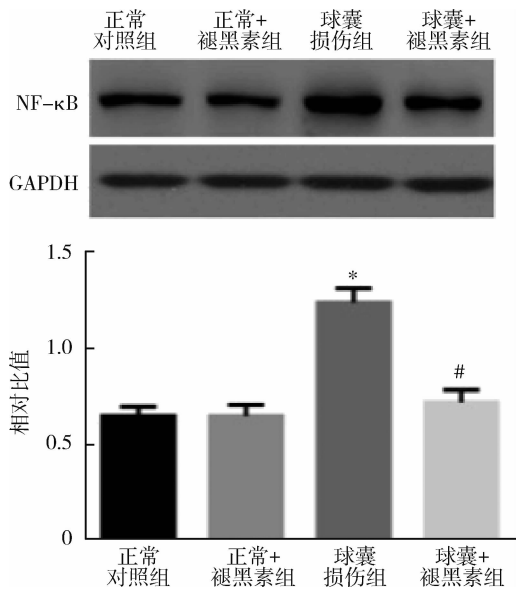


图 2 各组实验大鼠的颈动脉内 NF-κB 的表达
与正常对照组或正常 + 褪黑素组比较, * $P < 0.01$;
与球囊损伤组比较, # $P < 0.01$

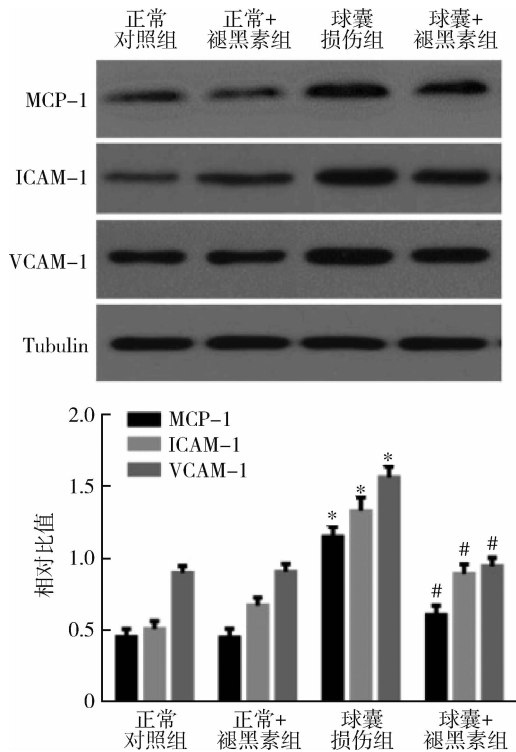


图 3 各组实验大鼠的颈动脉内 MCP-1、
ICAM-1、VCAM-1 的表达
与正常对照组或正常 + 褪黑素组比较, * $P < 0.01$;
与球囊损伤组比较, # $P < 0.05$

等^[4,9]。炎症的本质是炎性细胞的浸润,即血管壁内炎性细胞的浸润程度能够反映其炎性损伤的程度^[10]。CD45 是组织内炎性细胞的重要标志物之一,因此本研究通过检测实验大鼠颈动脉内的 CD45 阳性细胞数目来反映其炎性细胞的浸润程度及炎性损伤的程度^[11]。大鼠颈动脉球囊损伤可引起动脉内膜的增生和动脉壁的炎性反应,因此本研究用此经典动物模型研究褪黑素对动脉壁内炎性细胞浸润的影响。结果表明,球囊损伤能明显诱导实验大鼠颈动脉壁内的炎性细胞的浸润,而褪黑素可以抑制此炎性细胞的浸润。同时本研究尚对褪黑素抑制实验大鼠颈动脉壁内炎性细胞浸润的机制进行了探讨。

MCP-1 是组织内炎性细胞的重要趋化因子之一,VCAM-1 和 ICAM-1 是组织细胞间重要的黏附因子^[12-14]。因此 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 均能够参与炎性细胞向血管壁的黏附和浸润。而 NF-κB 作为重要的炎性因子则能够诱导 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达^[15,16]。结合本研究结果可以推断,褪黑素能够通过抑制 NF-κB、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达进而减轻球囊损伤诱导的实验大鼠颈动脉壁内的炎性细胞浸润。有研究表明,将大鼠的松果体切除后,发现其主动脉内 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达显著升高,这与本研究的结果类似^[17]。同时本研究也显示,褪黑素在治疗炎症相关的血管病方面具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- 1 Hedin U, Matic LP. Recent advances in therapeutic targeting of inflammation in atherosclerosis[J]. J Vasc Surg, 2019, 69(3): 944 - 951
- 2 Shukla M, Chinchalongporn V, Govitropong P, et al. The role of melatonin in targeting cell signaling pathways in neurodegeneration[J]. Ann N Y Acad Sci, 2019, 1443(1): 75 - 96
- 3 Hu ZP, Fang XL, Fang N, et al. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF-κB system in high-fat-fed rabbits[J]. J Pineal Res, 2013, 55(4): 388 - 398
- 4 Rodella LF, Filippini F, Bonomini F, et al. Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy[J]. J Pineal Res, 2010, 48(2): 126 - 132
- 5 Back M, Yurdagul A, Tabas I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389 - 406
- 6 Mahajan N, Dhawan V, Mahmood S, et al. Extracellular matrix remodeling in Takayasu's arteritis: role of matrix metalloproteinases and

黑素具有重要的血管保护作用,如尼古丁诱导的血管病、低氧所致的血管损害以及高血压相关的血管损伤

- adventitial inflammation[J]. Arch Med Res, 2012, 43(5): 406 - 410
- 7 Galley HF, Lowes DA, Allen L, *et al.* Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis[J]. J Pineal Res, 2014, 56(4): 427 - 438
 - 8 Marra A, McGrane TJ, Henson CP, *et al.* Melatonin in critical care[J]. Crit Care Clin, 2019, 35(2): 329 - 340
 - 9 Hung MW, Kravtsov GM, Lau CF, *et al.* Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia[J]. J Pineal Res, 2013, 55(3): 247 - 256
 - 10 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
 - 11 Rheinlander A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine[J]. Immunol Lett, 2018, 196(10): 22 - 32
 - 12 Lin J, Kakkar V, Lu X. Impact of MCP - 1 in atherosclerosis[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(28): 4580 - 4588
 - 13 Kong DH, Kim YK, Kim MR, *et al.* Emerging roles of vascular cell adhesion molecule - 1 (VCAM - 1) in immunological disorders and cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1057 - 1073
 - 14 Reinisch W, Hung K, Hassan - Zahraee M, *et al.* Targeting endothelial ligands: ICAM - 1/alicaforson, MAdCAM - 1[J]. J Crohns Colitis, 2018, 12(suppl_2): 669 - 677
 - 15 Liang B, Wang X, Zhang N, *et al.* Angiotensin - (1 - 7) attenuates angiotensin II - induced ICAM - 1, VCAM - 1, and MCP - 1 expression via the MAS receptor through suppression of P38 and NF - κ B pathways in HUVECs[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(6): 2472 - 2482
 - 16 Lin YT, Chen LK, Jian DY, *et al.* Visfatin promotes monocyte adhesion by upregulating ICAM - 1 and VCAM - 1 expression in endothelial cells via activation of p38 - PI₃K - Akt signaling and subsequent ROS production and IKK/NF - κ B activation[J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 52(6): 1398 - 1411
 - 17 Wang Y, Liu X, Wang W, *et al.* The expression of inflammatory cytokines on the aorta endothelia are up - regulated in pinealectomized rats[J]. Inflammation, 2013, 36(6): 1363 - 1373

(收稿日期:2019 - 07 - 07)

(修回日期:2019 - 09 - 21)

磷酸甘油酸变位酶 1 (PGAM1) 在胃癌组织中的表达及其临床意义

宋宜朋 高 超

摘 要 **目的** 分析磷酸甘油酸变位酶 1 (phosphoglycerate mutase 1, PGAM1) 在胃癌组织及癌旁正常组织中的表达程度, 探讨 PGAM1 的表达与胃癌临床病理特征的关系。**方法** 选取 2019 年 2 ~ 5 月于徐州医科大学附属医院胃肠外科接受胃癌手术治疗的 55 例患者, 采用免疫组化法检测 55 例患者胃癌组织及癌旁正常组织中 PGAM1 的表达水平, 分析其水平与临床病理特征的关系。**结果** 55 例患者胃癌组织中的 PGAM1 高表达率 (34/55, 61.8%) 显著高于癌旁正常组织 (18/55, 32.7%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); PGAM1 蛋白表达水平与患者的临床分期 (TNM)、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); 与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、肿瘤直径、脉管侵犯及浸润深度无关 ($P > 0.05$)。**结论** PGAM1 在胃癌组织中呈高度表达, 并且与胃癌的临床病理特征相关。

关键词 胃肿瘤 PGAM1 临床病例参数 免疫组化

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.036

Expression and Clinical Significance of Phosphoglycerate Mutase 1 (PGAM1) in Gastric Cancer. Song Yipeng, Gao Chao. Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China

Abstract Objective To analyze the expression levels of Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1) in human gastric cancer and normal gastric tissues, and to explore the correlation between PGAM1 expression and the clinicopathological characteristics of gastric cancer. **Methods** A total of 55 patients who received gastric cancer surgery from February 2019 to May 2019 in the gastrointestinal surgery department of affiliated hospital of xuzhou medical university were selected. The expression level of PGAM1 in gastric cancer tissues and adjacent normal tissues of 55 patients was detected by immunohistochemistry, and the relationship between its level and clinicopathological

作者单位: 221000 徐州医科大学 (宋宜朋); 221000 徐州医科大学附属医院肿瘤科 (高超)

通讯作者: 高超, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: gaochaoly@sina.com