

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.002.html>

ATRA 通过 ERK/MAPK 通路调控 AS 兔心脏 MLCK 的表达

王雪 余沛 王怡 周青 汪渊 朱华庆

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)通过信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(ERK/MAPK)通路调控动脉粥样硬化(AS)模型兔心脏中肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的表达。方法 普通新西兰大耳朵白兔随机分为正常组、模型组、ATRA组。正常组给予普通饲料喂养,模型组和ATRA组给予高脂饲料(普通饲料+1%胆固醇+5%猪油)喂养,并且ATRA组同时给予ATRA灌胃5 mg/(kg·d)。12周后,取动脉和心脏组织,油红染色分析动脉壁斑块形成情况;HE染色和Masson染色观察心肌组织形态学变化,免疫组织化学染色观察心脏中MLCK的表达;Western blot法检测各组MLCK蛋白和ERK蛋白磷酸化水平。体外培养H9c2心肌细胞,分为正常组、模型组、ATRA组、ERK/MAPK选择性抑制剂(PD)组。Western blot法检测各组MLCK蛋白的表达水平。结果 12周以后,AS兔模型建立成功。与正常组比较,模型组动脉壁形成大量粥样斑块;HE染色结果显示模型组心肌组织出现严重的紊乱情况;Masson染色结果显示模型组心肌组织发生明显胶原纤维堆积;免疫组化结果显示模型组心肌组织中MLCK表达量增多;而给予ATRA以后,心肌组织紊乱情况得到改善,胶原纤维堆积得到缓解,MLCK表达量和ERK磷酸化水平均有所降低。并且模型组细胞中MLCK蛋白表达升高,给予ATRA和PD98059后,MLCK表达降低。结论 ATRA可能通过ERK/MAPK通路降低模型兔心肌细胞MLCK的表达。

关键词 全反式维甲酸;动脉粥样硬化;心肌组织;肌球蛋白轻链激酶;丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号 R 541.4; R 972.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1494-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.002

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种由于脂质沉积于动脉管腔,阻碍血液的供应进而出现一系列症状的疾病,复杂性和慢性进行性是其最主要的特点,对人民健康危害甚大。肌球蛋白轻链激酶

(myosin light chain kinase, MLCK)是一种钙调素依赖酶,通过磷酸化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)增强血管内皮的收缩及张力,进而增强血管内皮的通透性,导致脂质更加易于透过血管内皮并且附着在血管内皮,逐渐形成粥样斑块,血管管腔变窄^[1]。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是维生素A的一种衍生物,研究^[2]显示ATRA可以改善内皮细胞凋亡、平滑肌细胞增殖、氧化应激、炎症浸润等多种作用。该研究通过喂养高脂饲料复制AS兔模型,提取心脏组织并且体外培养H9c2心肌细胞,研究ATRA是否通过细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路调控心脏中MLCK的表达,为进一步探究AS发病机制提供依据并且为临床治疗AS提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 普通雄性新西兰大白兔,体重(1.8±0.2) kg,购自山东青岛康大集团;普通饲料购自安徽医科大学实验动物中心;H9c2细胞购自中国科学院上海细胞库;DMEM高糖培养基干粉购自美国Gibco公司;棕榈酸及ERK/MAPK选择性抑制剂PD98059购自美国Sigma公司;ATRA购自安徽医科大学临床药理研究所;胆固醇购自中国医药(集团)上海化学试剂公司(AR级);ERK、p-ERK、MLCK、GAPDH抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;HE染色试剂盒和BCA定量试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司;Masson染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所;免疫组化试剂盒和二抗均购自北京中杉金桥公司。

1.2 主要仪器与设备 制冰机(AF100,意大利SCOTSMAN公司);酶标仪(Thermo MultiskanGO,美国Thermo-Fisher公司);石蜡切片机(YT-7C型,湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司);正置式生物显微镜(DM4000B,德国Leica公司);CO₂培养箱(MCO-20AIC,日本Panasonic公司);电泳仪(DYY-41型,北京六一仪器厂);转移电泳槽(DYY-III408);摇床(TS-1型,海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

2018-04-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570419)

作者单位:安徽医科大学分子生物学实验室,安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:王雪,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: aydzhq@126.com

1.3 方法

1.3.1 模型的建立 普通级雄性新西兰大白兔共 24 只,通过 10 d 的适应性喂养后,将其随机分为 3 组。正常组用普通饲料喂养;模型组用普通饲料、1% 胆固醇和 5% 猪油喂养; ATRA 组在用普通饲料、1% 胆固醇和 5% 猪油喂养的同时给予 ATRA 灌胃治疗 5 mg/(kg·d),12 周以后,所有动物全部处死。

1.3.2 H9c2 细胞的培养 复苏 H9c2 细胞,在 37 °C 和 5% CO₂ 条件下用细胞瓶培养,当细胞数量达到 80% 左右,模型组、ATRA 组及 PD 组给予棕榈酸 (10 μmol/L) 刺激 6 h 后 ATRA 组给予 ATRA (10 μmol/L); PD 组给予 PD98059 (40 μmol/L),12 h 后提取细胞蛋白进行 Western blot 分析。

1.3.3 标本的制备 3% 戊巴比妥将所有动物麻醉,腹部解剖,取出心脏,将用 PBS 漂洗好的心脏组织用 10% 福尔马林溶液固定,随后用石蜡进行包埋,切片后进行免疫组织化学染色、Masson 染色及 HE 染色;剩余心脏组织放入 -80 °C 备用。

1.3.4 油红染色 采用油红 O 粉配制油红 O 工作液,将动脉壁纵向切开后整体放入油红 O 工作液中浸泡 3 min,随后用 60% 乙醇调色,苏木精用于复染,复染完成后盐酸酒精分化,自来水冲洗,保存在甲醛溶液中。

1.3.5 HE 染色 采用石蜡切片机切片,厚度为 5 μm,切片脱蜡,梯度至水,苏木精染色,自来水冲洗,盐酸乙醇分化,伊红染色,自来水冲洗,脱水透明,中性树脂封片,镜下观察。

1.3.6 Masson 染色 采用石蜡切片机切片,厚度为 5 μm,切片脱蜡,梯度至水,核染液染 1 min,冲洗液冲洗,浆染液染 40 s,冲洗液冲洗,分色液分色 8 min,倾去勿洗,复染液复染 5 min,无水乙醇冲洗,中性树脂封片,镜下观察。

1.3.7 免疫组织化学法检测 MLCK 的表达 采用石蜡切片机切片,厚度为 5 μm,切片脱蜡至水;枸橼酸缓冲液煮沸至 95 °C,将切片放入枸橼酸缓冲液煮沸 15 min 进行抗原修复,冷却到室温,滴加 3% 过氧化氢去离子水孵育 10 min, TBS 冲洗 3 遍;滴加一抗,室温孵育 2 h 或者 4 °C 过夜, TBS 冲洗 3 遍;滴加聚合物辅助剂,室温孵育 10 min, TBS 冲洗 3 遍;滴加二抗,室温孵育 15 min, TBS 冲洗 3 遍,滴加 DAB 显色,自来水冲洗、苏木精复染、梯度脱水、中性树脂封片,镜下观察。

1.3.8 Western blot 法检测 称取 100 mg 心脏组织, PBS 洗去血渍,用滤纸将组织上残留的 PBS 吸

干后,放进研磨器,加入 1 ml 裂解液,于冰上充分研磨成匀浆,研磨完成后,将匀浆吸入 EP 管中, -80 °C、4 °C 中反复冻融 3 次后保存在 -80 °C 中。将经 12 h 处理好的细胞用 PBS 洗 3 遍,加入 200 μl 裂解液,冰上裂解 30 min,用细胞刮将细胞蛋白刮下,将蛋白液吸入 EP 管中。4 °C、14 000 r/min 离心 30 min,弃去组织沉淀及细胞沉淀,吸取上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度并用生理盐水配置成同体积同浓度蛋白液,加入蛋白上样缓冲液,混匀后煮沸变性,放于 -80 °C 保存。配制 SDS-PAGE 凝胶,各组等量上样电泳,电泳完成后转移入 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶 (TBST 溶) 室温封闭 2 h 后 TBST 摇床洗一遍, TBS 洗一遍,进行一抗 (GAPDH、ERK、p-ERK、MLCK) 4 °C 孵育,一抗孵育完成后 TBST 摇床洗 3 遍, TBS 洗一遍,于 37 °C 二抗孵育 2 h,二抗孵育结束后, TBST 摇床洗 3 遍, TBS 洗一遍,于暗室滴加 ECL 发光剂,观察荧光结果,并覆盖 X 胶片显影。胶片用扫描仪扫描后用 QuantityOne 软件分析各条带的灰度值,以 GAPDH 为参照,计算 ERK、p-ERK、MLCK 的相对灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件用于进行单因素方差分析,两两比较用 *q* 检验,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 油红染色结果 正常组动脉壁光滑并且无明显斑块,而模型组出现大量斑块,结果显示造模成功 (图 1)。

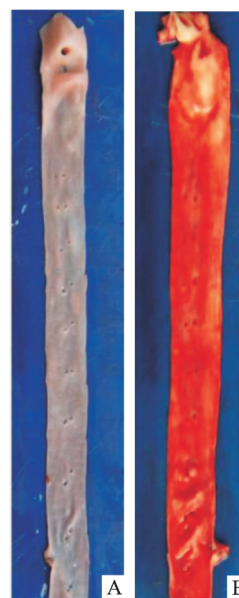


图 1 动脉油红染色结果
A: 正常组; B: 模型组

2.2 HE 染色结果 正常组心肌组织排列规则有序,给予高脂饲料后,心肌组织排列出现严重紊乱且细胞核排列杂乱无章;给予 ATRA 后,相比模型组,心肌组织排列较整齐(图 2)。

2.3 Masson 染色结果 正常组无明显胶原纤维堆积,模型组胶原纤维堆积程度升高,与模型组比较,ATRA 组心肌胶原纤维堆积明显减少(图 3)。

2.4 免疫组化结果 模型组 MLCK 表达量明显高于正常组,ATRA 组相对于模型组而言,MLCK 表达量有所降低(图 4)。

2.5 Western blot 结果 与正常组比较,给予高脂饲料 12 周以后,MAPK 通路相关蛋白 ERK 的磷酸化水平明显升高,给予 ATRA 以后,ERK 的磷酸化程度降低($F = 62.464$)(图 5)。与正常组比较,模型组 MLCK 表达增加,给予 ATRA 以后,MLCK 表达显著降低($F = 246.168$)(图 6)。与正常组比较,给予棕榈酸刺激后,MLCK 表达水平升高;与模型组比较,经 ATRA 给药及 PD98059 后,MLCK 表达水平显著降低($F = 134.130$)(图 7)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高和饮食的多样化,AS 引起的死亡已成为当今人口死亡的主要原因,并愈发趋向年轻化。目前 AS 最主要的治疗手段是靠他汀类和血管紧张素抑制剂类药物缓解^[3],但是 AS 发病机制的复杂性与多样性,他汀类和血管紧张素抑制剂尚不能起到有效的治疗,多数 AS 患者仍旧遭受疾病的折磨。近年来,相关领域研究热点多集中在动脉内皮,然而在相关的死亡调查中发现 70% 与心脏受损有关。心脏是人体中非常重要的一个器官,是人体中各个器官、组织的血流量的来源,其形态和功能的完整性对于机体进行正常的生命活动和维持正常的生理功能起着至关重要的作用。

AS 极易引发多种心血管疾病如心绞痛、心力衰竭等从而降低心脏的顺应性;心脏缺血,影响心脏收缩功能,导致机体各组织和器官无法正常工作,最终导致死亡^[4]。因此采取相应预防措施,减轻心脏受损很有必要。

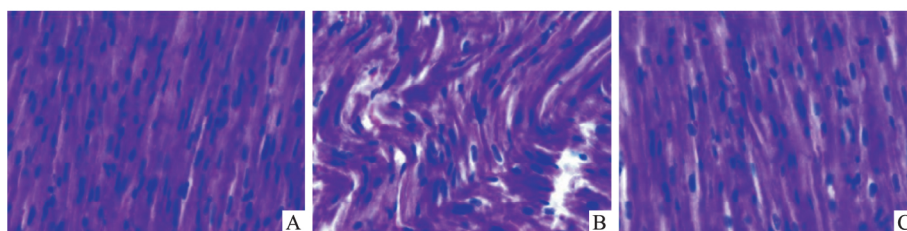


图 2 各组兔心肌形态变化 HE $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA 组

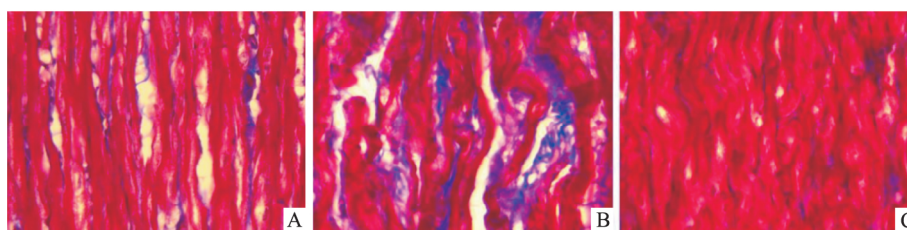


图 3 各组兔心肌胶原纤维的变化 Masson $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA 组

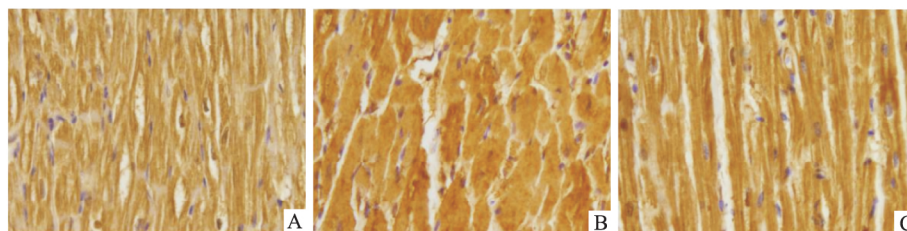


图 4 各组兔心肌的免疫组织化学染色 $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA 组

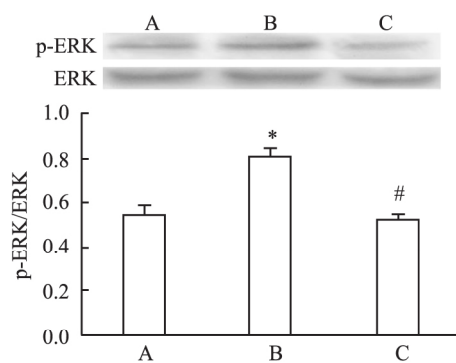


图5 ATRA对MAPK途径中ERK磷酸化的影响

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

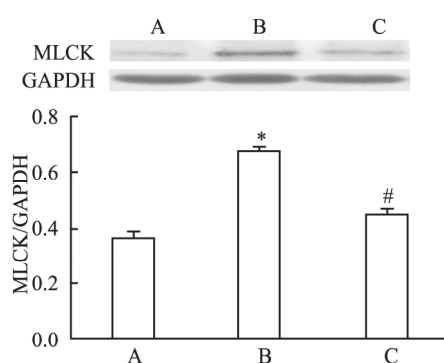


图6 ATRA对MLCK蛋白表达的影响

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

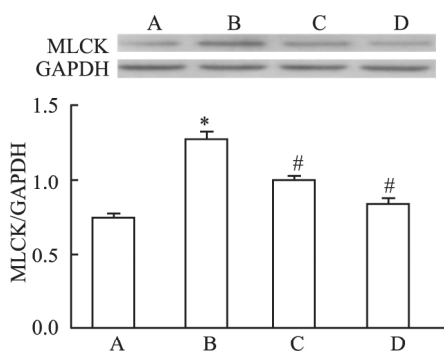


图7 PD98059对MLCK蛋白表达的影响

A: 正常组; B: 模型组; C: ATRA组; D: PD组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

MLCK是一种存在于哺乳动物中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与许多重要的生命活动,主要由MLCK1基因和MLCK2基因编码^[5],MLCK2因编码产物大多分布在横纹肌细胞而MLCK1基因编码产物在许多组织如骨骼肌、心肌中均表达^[6]。MLCK主要通过磷酸化平滑肌和非平滑肌的肌球蛋白进而调控肌球蛋白与肌球蛋白之间的细胞黏附、神经突起生长及内皮细胞和上皮障碍的形成等一系列骨架

活动,对肌肉收缩产生重要影响^[7-9]。研究^[10-12]显示高血脂、高血糖和高血压均会引起MLCK发生不同程度的表达,并且MLCK的不同程度表达对心脏的形态结构及功能产生不同的影响。本研究中免疫组化实验结果显示模型组MLCK蛋白的表达量明显高于正常组,给予ATRA后表达量明显下降。因此推测AS心肌损伤与MLCK的表达有关。

ATRA是维生素A在体内经两步代谢而来的产物,临床主要用于治疗急性早幼粒细胞白血病^[13],近年研究^[14]显示ATRA灌胃后能减轻内膜增厚和平滑肌细胞增生,在肥胖和AS及其并发症防治方面的作用被越来越多的相关专业关注。本研究HE染色和Masson染色结果显示模型组心肌纤维发生一定程度的紊乱与堆积,给予ATRA后,紊乱与堆积程度减轻,表明ATRA可以减轻AS兔心肌损伤情况。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一种将信号从细胞外传到细胞核的并引起一些列细胞生物学反应的重要信号调节酶。MAPK信号通路主要是由ERK、JNK、p38介导的三条级联反应,参与多种细胞反应及机体多种生理病理过程^[15]。研究^[16]表明MAPK信号通路受到多种刺激发生级联磷酸化被激活,促进细胞因子的生成导致炎症的发生。AS的发病原因复杂多样,目前没有确切的说法,但是炎症反应与氧化应激一直是导致AS发生的关键原因,因此,MAPK信号通路与AS的发生发展密切相连。Benson et al^[17]发现ATRA可以通过MAPK途径抑制血管平滑肌的增生从而有助于AS的防治。ERK主要参与生长因子介导的细胞增殖,而且ERK部分参与心肌细胞基因的表达,是一条经典的MAPK信号通路。所以推测ATRA是通过ERK/MAPK通路调控MLCK的表达。Western blot结果表明在给予高脂饲料喂养后,ERK磷酸化水平和MLCK的表达呈现一致性,均发生升高,给予ATRA治疗后,磷酸化程度和MLCK的表达水平同时都发生降低。并且,HE染色和Masson染色结果均显示给予ATRA治疗后,心肌损伤程度减轻,免疫组化结果显示ATRA组心肌中MLCK表达量减少。

综合本实验结果和相关文献,本研究显示ATRA能降低MLCK的表达可能是通过ERK/MAPK通路途径进行调控。至于是否通过其他途径进行调控需要进一步研究,而ATRA是否可以作为临床抗AS药物,明确其作用机制有待深入的探讨。

参考文献

- [1] 高峻岭. 全反式维甲酸对糖尿病大鼠动脉壁肌球蛋白轻链激酶表达的影响及其分子机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [2] 王育盛, 杨剑, 曾春雨. 全反式维甲酸对血管粥样硬化病变作用的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(3): 375-8.
- [3] Fox K M. European trial on reduction of cardiac events with perindopril in stable coronary artery disease investigators efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study) [J]. *Lancet*, 2003, 362: 782-8.
- [4] Bernard J. Chronic coronary artery disease [A]. In: Braunwald E ed. *Heart disease, a textbook of cardiovascular medicine* [M]. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997: 1289-365.
- [5] Eikemo H, Moltzau L R, Hussain R I, et al. CaMKII in addition to MLCK contributes to phosphorylation of regulatory light chain in cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(1): 219-25.
- [6] 刘丽文, 左蕾, 雷常慧, 等. 中国超声医学工程学会全国超声心动图学术会议[C]. 2014.
- [7] Chen C, Tao T, Wen C, et al. Myosin light chain kinase (MLCK) regulates cell migration in a myosin regulatory light chain phosphorylation-independent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(41): 28478-88.
- [8] Taverner A, Dondi R, Almansour K, et al. Enhanced paracellular transport of insulin can be achieved via transient induction of myosin light chain phosphorylation [J]. *J Control Release*, 2015, 210: 189-97.
- [9] Chen D, Xiong Y, Lin Y, et al. Capsaicin alleviates abnormal intestinal motility through regulation of enteric motor neurons and MLCK activity: Relevance to intestinal motility disorders [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(8): 1482-90.
- [10] Zhu H Q, Zhou Q, Jiang Z K, et al. Association of aorta intima permeability with myosin light chain kinase expression in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1-2): 209-15.
- [11] Zhu H Q, Zhang X L, Zuo L, et al. Expression of myosin light chain kinase in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2006, 7(11): 510-8.
- [12] Han Y J, Hu W Y, Chernaya O, et al. Increased myosin light chain kinase expression in hypertension: regulation by serum response factor *via* an insertion mutation in the promoter [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(9): 4039-50.
- [13] Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace V M. All trans retinoic acid and cancer [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(2): 241-9.
- [14] 张玉保, 董果雄, 张社华. 全反式维甲酸对兔颈动脉粥样硬化病灶中 NF- κ B、P-选择素及 VCAM-1 表达的影响 [J]. 复旦学报 (医学版), 2010, 37(5): 565-9.
- [15] 崔虎, 关立克. 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 在动脉粥样硬化中的意义 [J]. 吉林医学, 2013, 34(1): 132-4.
- [16] 徐凤, 肖韩艳, 周淑芬, 等. 柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 104-9.
- [17] Benson S, Padmanabhan S, Kurtz T W, et al. Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and the retinoid X receptor- α exert synergistic antiproliferative effects on human coronary artery smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000, 3(3): 159-64.

Regulation of all-*trans*-retinoic acid on expression of myosin light chain kinase in myocardial tissue through the pathway of ERK/MAPK in atherosclerosis model rabbit

Wang Xue, Yu Pei, Wang Yi, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the expression of myosin light chain kinase (MLCK) in myocardial tissue regulated by the all-*trans*-retinoic acid (ATRA) through the pathway of ERK/MAPK in atherosclerosis (AS) model rabbit. **Methods** The New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal group, model group and ATRA group. The normal group were fed with normal diets. The model group were fed on high-fat diets (normal diets + 1% cholesterol + 5% lard). The ATRA group was given ATRA [5 mg/(kg · d)] while feeding high-fat diets. After 12 weeks, the arterial and cardiac tissues were taken and the formation of arterial wall plaque was analyzed by oil red staining; Haematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to detect morphological changes of myocardial tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expression of MLCK in myocardial tissue. Western blot was used to observe the changes of MLCK and ERK phosphorylation in myocardial tissue.

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.003.html>

β -隐黄素对实验性牙周炎大鼠氧化应激的影响

崔晓宇¹, 王国芳¹, 李小红¹, 张朋¹, 李冬雪¹, 轩亚茹²

摘要 目的 探讨 β -隐黄素对实验性牙周炎大鼠氧化应激的影响及可能的作用机制。方法 选取 30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组即正常对照组、牙周炎组、 β -隐黄素治疗组。采用正畸结扎丝结扎双侧上颌第二磨牙颈部联合注射内毒素(LPS)的方法建立牙周炎动物模型。 β -隐黄素给药 7 d 后,行腹主动脉采血后处死。分离双侧上颌骨,左侧用于组织学分析各组大鼠牙周组织炎症和牙槽骨丧失的情况,右侧分离牙龈组织并检测牙龈和血清中的丙二醛(MDA)的含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。结果 与牙周炎组比较, β -隐黄素治疗组炎症细胞浸润数和牙槽骨丧失量减少,牙龈组织和血清中 MDA 含量明显降低($P < 0.05$),SOD 和 GSH-Px 活性明显增高($P < 0.05$)。结论 β -隐黄素可以减轻实验性牙周炎大鼠的氧化应激反应。

关键词 β -隐黄素;牙周炎;氧化应激

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1499-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.003

牙周炎是由菌斑微生物与宿主组织相互作用引起的牙周支持组织的炎性感染性疾病,主要表现为

软组织破坏和牙槽骨丧失,是成年人牙齿松动和脱落的首要原因^[1]。近年来,各种证据表明氧化应激在牙周炎的发生发展机制中起重要作用。在炎症状态下,活性氧自由基的过度产生导致机体氧化应激和抗氧化防御系统失衡,从而对组织细胞产生损伤^[2]。减少氧化损伤和增加抗氧化能力是治疗牙周病的关键。 β -隐黄素,是一种已被证实的具有多种生物活性的类胡萝卜素,广泛存在于柑橘、玉米、豌豆等多种果蔬中,其生物安全性已被认证^[3]。Liu et al^[4]研究显示 β -隐黄素可以抑制镉诱导的大鼠睾丸组织的氧化应激反应。因此,推测 β -隐黄素可能在牙周组织的氧化应激中具有一定的保护作用。然而,有关此方面的研究尚未见报道。该研究旨在初步探讨 β -隐黄素如何影响内毒素(lipopolysaccharide, LPS)/结扎诱导的牙周炎大鼠氧化应激反应以及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及器械 β -隐黄素(美国 Sigma 公司);LPS(索莱宝生物科技有限公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(南京建成生物技术公司);显微照相系统(日本 Olympus 公司);Leica SM 2000R 切片机(德国徕卡 Microsystems Nussloch 公司);TDL-5 离心机(上海安宁科学仪器

2018-05-03 接收

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:16A320082)

作者单位:¹ 郑州大学第一附属医院口腔科,郑州 450052

² 郑州人民医院口腔科,郑州 450052

作者简介:崔晓宇,女,硕士研究生;

王国芳,女,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail: wg-fdxz2003@163.com

sue. H9c2 cardiomyocytes were cultured *in vitro* and divided into normal group, model group, ATRA group, ERK/MAPK selective inhibitor (PD) group. Western blot was employed to detect the expression of MLCK. **Results** The AS model rabbit was built successfully 12 weeks later. Compared with normal group, arterial wall formed lots of atherosclerotic plaques in model group; HE staining showed that there was a serious disturbance of myocardial tissue in the model group; Masson stain indicated that collagen fibers accumulated seriously in myocardial tissue. Immunohistochemistry showed that expression of MLCK and ERK phosphorylation were enhanced in myocardial tissue. After the treatment of ATRA, the expression of the MLCK and ERK phosphorylation decreased clearly. The expression of MLCK protein in the cells of the model group was increased, and the expression of MLCK decreased after the ATRA and ERK/MAPK inhibitors were given. **Conclusion** ATRA may regulate the expression of MLCK in myocardial tissue of AS model rabbit by the pathway of ERK/MAPK.

Key words all-*trans*-retinoic acid; atherosclerosis; myocardial tissue; MLCK; MAPK