

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.001.html>

◇基础医学研究◇

褪黑素对实验性动脉粥样硬化兔心脏的保护作用及其可能的分子机制

余沛 王雪 王怡 周青 汪渊 朱华庆

摘要 目的 观察褪黑素(MLT)对实验性动脉粥样硬化兔心脏的保护作用及其可能的分子机制。方法 普通级纯种新西兰大耳白兔随机分为3组,正常组:饲喂普通饲料;模型组:饲喂高脂饲料(普通饲料+1%胆固醇+5%猪油);褪黑素组:饲喂高脂饲料的同时MLT灌胃10 mg/(kg·d)治疗。纯种大耳白兔适应性饲养一周后,采用高脂饮食诱导造模,同时给予褪黑素药物治疗。于12周后处死进行采血,检测血清中血脂等指标。取动脉进行油红染色,检测脂质斑块形成情况;取心脏组织,包埋后HE染色观察心肌组织的形态变化;Masson染色检测心肌组织中胶原纤维的变化;Western blot法检测p38/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路相关蛋白及肌球蛋白轻链激酶(MLCK)、肌球蛋白轻链(MLC)、肌球蛋白轻链磷酸化(p-MLC)的表达水平。结果 动脉油红染色结果显示模型组出现大量脂质斑块,证明造模成功。血脂结果显示模型组总胆固醇(TCH)、三酰甘油(TG)浓度明显上升,而褪黑素组相对模型组下降。油红染色HE染色结果显示MLT能改善心肌组织形态的紊乱情况,Masson染色结果显示MLT能缓解心肌组织胶原纤维的堆积。Western blot结果显示MLT能下调p38的磷酸化水平以及MLCK蛋白的表达水平,以及下调MLC的磷酸化表达水平($P < 0.05$)。结论 MLT可能通过降低MAPK通路中相关蛋白p38的磷酸化调控MLCK蛋白的表达,从而降低MLC的磷酸化水平对动脉粥样硬化兔心肌组织起到保护作用。

关键词 动脉粥样硬化;心肌组织;褪黑素;丝裂原活化蛋白激酶;肌球蛋白轻链激酶

中图分类号 R 541.4; R 972.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1747-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.001

心血管疾病是动脉粥样硬化的并发症之一,也是其主要致死原因。如冠状动脉粥样硬化性心脏

病、心肌缺血以及心肌肥大等,但其发病机制复杂,有待于进一步研究^[1]。褪黑素(melatonin, MLT)是一种内源性分泌吲哚类物质^[2],主要由哺乳类动物和人类松果体分泌,具有很强的抗氧化作用,可抑制平滑肌细胞迁移炎症的发生等^[3]。肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)是一种重要的肌动蛋白调节因素,研究^[4]显示动脉粥样硬化病程中MLCK可以在19位丝氨酸和18位苏氨酸上磷酸化肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC),导致肌球蛋白构象发生变化形成张力纤维,引起内皮细胞骨架重排,导致动脉内膜屏障完整性被破坏,脂质更易沉积^[5]。该实验通过观察褪黑素对动脉粥样硬化兔心肌组织结构的影响及对MLCK蛋白的影响,探讨褪黑素对动脉粥样硬化心肌损伤的保护作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 酶标仪(ThermoMultiskanGO)、低温离心机(Legend micro21R)(美国Thermo-Fisher公司);大制冰机(AFI100,意大利SCOTSMAN公司);纯水机(RO DI Digital,上海和泰仪器有限公司);电子天平(JY2002,FA2004,上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂);石蜡切片机;生物组织摊烤片机(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);4℃及-20℃冰箱(青岛海尔集团);-80℃超低温冰箱(日本SANYO公司);电泳仪(DYY-41型,北京六一仪器厂)。

1.2 材料与试剂 雄性纯种新西兰大白兔购自山东青岛康大集团,普通级,重(1.8±0.2)kg;胆固醇购自中国医药(集团)上海化学试剂公司(AR级);正常兔饲料由安徽医科大学实验动物中心提供;三酰甘油(triglyceride, TG)浓度测定试剂盒购自温州市东瓯诊断产品有限公司;褪黑素购自美国Sigma公司;HE染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;总胆固醇(total cholesterol, TCH)浓度测定

2017-09-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81570419);安徽省高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2013Z127)

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:余沛,男,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

试剂盒、Masson 染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所; GAPDH、p38、p-p38、MLCK 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; p-MLC、MLC 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 二抗购自北京中杉金桥公司。

1.3 方法

1.3.1 AS 模型的建立 普通级纯种新西兰大白兔正常饲料适应性喂养一周后随机分为 3 组, 分笼饲养。正常组: 常规饲料喂养; 模型组: 高脂饲料(普通饲料 + 1% 胆固醇 + 5% 猪油) 喂养; 褪黑素组: 给予高脂饲料喂养的同时给予 MLT 治疗 10 mg/(kg · d)。所有动物于 12 周取血进行血脂水平分析, 6 只/(组 · 周)。

1.3.2 标本的制备 耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(3 g 戊巴比妥钠溶解于 100 ml 生理盐水中), 动物经麻醉后颈动脉抽血, 离心取血清, -20 °C 保存备用; 动物经腹部解剖后尽快剥离出心脏, 于冰上 PBS 漂洗后去除血渍并分离出周围的结缔组织及脂肪组织等, 10% 福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 切片后进行 HE 及 Masson 染色; 余下的组织放入冻存管中置 -80 °C 保存备用。

1.3.3 HE 染色 石蜡包埋的组织切片后梯度脱蜡脱水, 苏木素染色 8 min, 1% 盐酸乙醇分化, 伊红染色 8 s, 自来水冲洗, 纯水浸洗, 脱水透明, 用中性树胶封片。

1.3.4 Masson 染色 按 Masson 染色试剂盒说明书处理。切片脱蜡脱水 按照 Regaud 苏木精染液染核 5 ~ 10 min, Masson 丽春红酸性复红液染胞质 5 ~ 10 min, 1% 磷钼酸水溶液分化 3 ~ 5 min, 不经水洗, 直接用苯胺蓝或光绿液染 5 min 的先后顺序染色脱洗, 脱水透明封片。

1.3.5 Western blot 法检测 解剖后取出兔左心室, 冰上 PBS 清洗, 洗净血渍称取 100 mg, 加入 1 ml 裂解液, 于冰上充分研磨成匀浆, 移入 1.5 ml 的 EP 管中, -80 °C、4 °C 中反复冻融 3 次, 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 弃去组织沉淀, 上清吸入另一个 1.5 ml 的 EP 管中, 再次离心, 弃去漂浮的脂质及底部沉淀, 余下部分吸入另一个 1.5 ml 的 EP 管中, 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, 按比例加入蛋白上样缓冲液, 混匀后煮沸变性, 分装放于 -80 °C 保存。配制 SDS-PAGE 凝胶, 各组等量上样电泳, 之后转移入 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶(TBST 溶) 室温封闭 2 h, 然后一抗(p38、p-p38、MLCK、MLC、p-MLC) 4 °C 孵育过夜至数天不等, 二抗 37 °C 摇床孵育 2 h, TBST 摇床洗 3 遍, TBS 洗 1 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 Quantity One 软件分析灰度值。

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

2 结果

2.1 油红染色法检测斑块形成 结果表明模型组出现大量脂质斑块, 证明造模成功。见图 1。

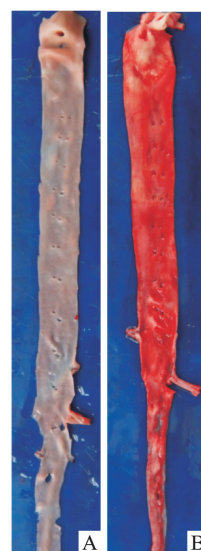


图 1 动脉油红染色结果
A: 正常组; B: 模型组

2.2 血脂统计结果 结果表明, 与正常组相比, 模型组 TG、TCH 的浓度明显升高 (*P* < 0.05), 而褪黑素组与模型组相比 TG、TCH 的浓度均有明显下降 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 12 周 MLT 对 AS 模型兔血脂的浓度影响 (*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	模型组	褪黑素组	<i>F</i> 值
TG (mmol/L)	0.588 ± 0.221	6.947 ± 2.382*	1.936 ± 1.007* #	56.335
TCH (mmol/L)	1.533 ± 0.645	55.279 ± 14.913*	39.861 ± 6.285* #	52.559

与正常组比较: * *P* < 0.05; 与模型组比较: # *P* < 0.05

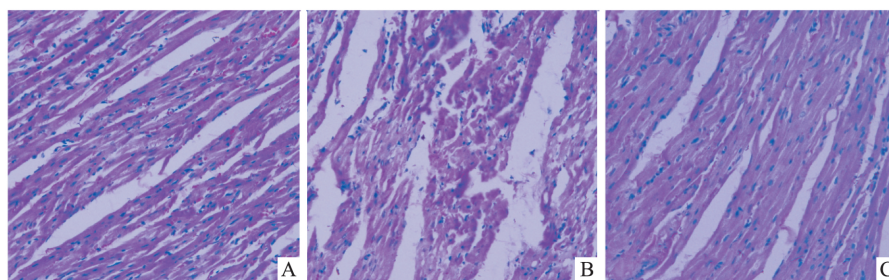


图2 各组兔心肌形态的变化 ×400

A: 正常组; B: 模型组; C: 褪黑素组

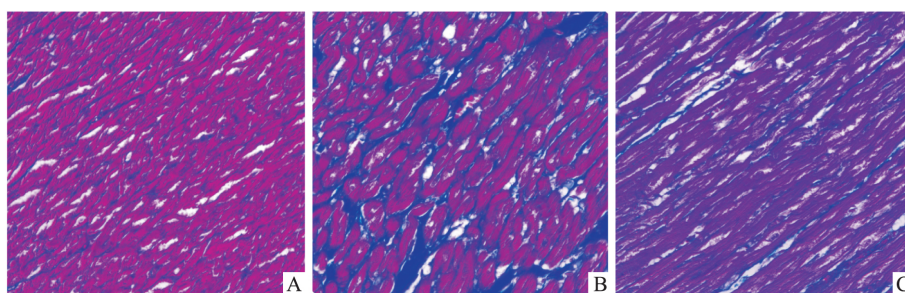


图3 各组兔心肌胶原纤维的变化 ×400

A: 正常组; B: 模型组; C: 褪黑素组

2.3 HE 染色结果 正常组心肌纤维呈粉红色, 结构有序且排列整齐, 细胞核结构清晰排列规律; 而模型组心肌纤维染色不均匀且排列紊乱, 细胞核结构排列杂乱。与模型组相比, 褪黑素组心肌纤维排列较整齐, 且细胞核结构清晰有序。见图 2。

2.4 Masson 染色结果 与正常组相比, 模型组心肌胶原纤维堆积明显增多, 且心肌纤维着色紊乱。而与模型组相比, 褪黑素组心肌胶原纤维明显, 但心肌纤维着色改善不太明显。见图 3。

2.5 Western blot 结果 结果显示与正常组相比, 模型组心肌组织丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路相关蛋白 p38 蛋白磷酸化程度明显增加, 而褪黑素组相对模型组明显降低 ($F = 12.070$, $P < 0.05$)。模型组中 MLCK 蛋白的表达也明显高于正常组, 褪黑素组相对模型组也明显降低 ($F = 14.006$, $P < 0.05$)。与正常组相比, 受 MLCK 调控的 MLC 蛋白的磷酸化水平在模型组中也明显增加, 褪黑素组相对模型组明显降低 ($F = 12.037$, $P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

动脉粥样硬化是以脂质沉积在血管壁为特征的一种慢性炎症疾病, 是导致冠心病等心脑血管疾病的主要病因, 其发病率和死亡率在我国都位居前

列^[6]。因此研究其发病机制, 采取相应的预防措施, 延缓其病程, 是目前心脑血管疾病领域的研究热点^[7]。

MLT 主要是由哺乳动物的松果体分泌的一种胺类激素, 已有研究^[8-10]显示 MLT 对阿霉素心脏毒性、心血管疾病、糖尿病视网膜病变均有保护作用。Simko et al^[11]研究发现 AS 增加左心室和主动脉的氧化应激、左室心肌肥厚和左室心肌纤维化, 而 MLT 治疗可以减轻上述病理性改变。本研究结果显示模型组兔心肌细胞发生损害, HE 染色结果显示模型组兔心肌纤维排列紊乱, 间隙变大, 且染色不均。Masson 染色结果显示心肌组织中胶原纤维含量明显增多。褪黑素组心肌损伤有好转, 表明 MLT 对 AS 兔心肌损伤有一定的保护作用。

MLCK 是一种钙调素依赖的蛋白激酶, 其广泛存在于各种真核细胞及非肌肉细胞中, 已经从许多肌肉组织如骨骼肌、平滑肌及非肌肉组织中纯化得到肌球蛋白轻链激酶。依赖于微丝的肌球蛋白可参与细胞的爬行运动, 其作用主要受 MLC 的磷酸化调控, 并与微丝之间的相互作用为细胞爬行提供基本的动力^[12]。而 MLCK 可以使 MLC 磷酸化, 进而促进细胞迁移^[13], 且 MLCK 蛋白活性的大小影响了 MLC 被磷酸化的程度。不同种类的细胞中 MLCK 催化 MLC 磷酸化参与不同的生理功能, 如骨骼肌

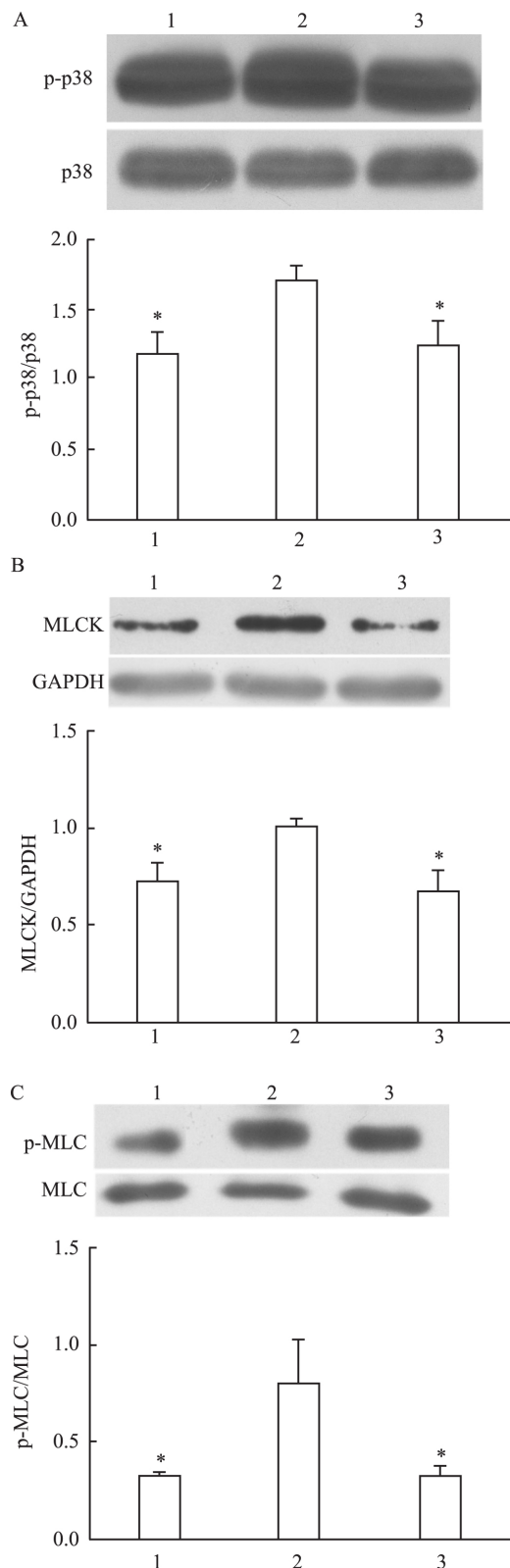


图4 MLT对AS兔心肌MAPK、MLCK、MLC相关蛋白的影响
A: p38; B: MLCK; C: MLC; 1:正常组; 2:模型组; 3:褪黑素组;
与模型组比较: * P < 0.05

MLCK催化MLC磷酸化调节神经与肌肉紧张的产生,平滑肌MLCK催化MLC磷酸化负责肌肉收缩的

启动。已知的研究^[14]结果显示,正常的细胞基本都具有完整的紧密连接,而细胞屏障被破坏的细胞中,其紧密连接结构都发生变化。动脉粥样硬化病程中肌球蛋白构象发生变化形成张力纤维,引起内皮细胞骨架重排,导致动脉内膜屏障完整性被破坏。本研究中观察到MLCK蛋白的表达及其介导的MLC的磷酸化程度在模型组中表达增高,而经MLT治疗组中表达明显下降。因此,笔者推测心肌纤维排列紊乱可能与MLC的表达变化有关。

MAPK信号转导通路是一条重要的细胞通路,主要包括c-Jun N端激酶、蛋白激酶和p38/MAPK三条途径。p38/MAPK是MAPK家族中的重要成员,可被炎症因子或环境压力等细胞外刺激信号所激发,从而引起细胞内蛋白激酶产生连锁反应,进而影响细胞内信号通路调节相关基因的转录和翻译以及受体表达等。有研究^[15]显示MLT可能是发挥其强力的抗氧化功能清除多余的自由基,抑制细胞释放生长因子等活性物质,从而抑制p38/MAPK信号通路调控MLCK表达。本实验用Western blot法检测了实验性AS兔模型心肌细胞中MAPK通路有关蛋白的表达水平,其结果显示,与正常组相比,模型组心肌组织中p38蛋白磷酸化水平显著升高,经过MLT治疗后,p38蛋白的磷酸化水平明显下降。因此,推测MLT对AS兔的心肌保护作用与MAPK通路的激活有关。

综上所述,本研究认为MLT可以对动脉粥样硬化兔的心肌产生保护作用,而这种保护作用可能通过降低MAPK通路中相关蛋白p38的磷酸化调控MLCK蛋白的表达,进而降低MLC的磷酸化程度所导致的。

参考文献

- [1] 李先明,秦涛. 褪黑素在心血管疾病中的研究进展[J]. 中西医结合心血管病杂志, 2016, 4(14): 7-9.
- [2] Paredes S D, Terrón M P, Marchena A M, et al. Effect of exogenous melatonin on viability, ingestion capacity, and free-radical scavenging in heterophils from young and old ringdoves (*Streptopelia risoria*) [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 304(1-2): 305-14.
- [3] Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans [J]. J Physiol Pharmacol, 2006, 57(Suppl 5): 19-39.
- [4] Kim C W, Kumar S, Son D J, et al. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(7): 1412-21.
- [5] 丁延辉,丁俊丽,周青,等. 全反式维甲酸对实验性动脉粥样硬化兔动脉血管内皮依赖性舒张功能的影响[J]. 安徽医

- 科大学学报, 2017, 52(1): 7-12.
- [6] Glass C K, Witztum J L. Atherosclerosis. the road ahead. [J]. *Cell*, 2001, 104(4): 503-16.
- [7] Wang Y, Wang F, Wu Y. MicroRNA-126 attenuates palmitate-induced apoptosis by targeting TRAF7 in HUVECs [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 399(1-2): 123-30.
- [8] Zhang Y, Li L, Xiang C, et al. Protective effect of melatonin against adriamycin-induced cardiotoxicity [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(5): 1496-500.
- [9] Tengattini S, Reiter R J, Tan D X, et al. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2008, 44(1): 16-25.
- [10] 贾秀月, 孟德欣, 李怀荆, 等. 褪黑素对糖尿病大鼠视网膜保护作用的研究 [J]. *黑龙江医药科学*, 2011, 34(2): 37-8.
- [11] Simko F, Pechanova O, Repova Bednarova K, et al. Hypertension and cardiovascular remodelling in rats exposed to continuous light: protection by ACE-inhibition and melatonin [J]. *Mediators Inflamm*, 2014: 703175.
- [12] Petit L, Lacroix I, de Coppel P, et al. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58(4): 633-9.
- [13] Dubocovich M L, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. [J]. *Endocrine*, 2005, 27: 101-10.
- [14] Yang X, Zou D, Tang S, et al. Ameliorative effect of melatonin against increased intestinal permeability in diabetic rats: possible involvement of MLCK-dependent MLC phosphorylation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 416(1-2): 23-32.
- [15] 肖林林, 朱华庆, 程筱雯, 等. 褪黑素通过 p38 /MAPK 信号通路调控 oxLDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 MLCK 的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2008, 43(1): 16-20.

Protective effect of melatonin on the heart of experimental atherosclerotic rabbits and its possible molecular mechanism

Yu Pei, Wang Xue, Wang Yi, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology Anhui Medical University;

Key Laboratory of Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effects of melatonin on myocardial tissue of experimental atherosclerosis rabbits and the possible mechanism. **Methods** New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups: the normal group were fed with standard diet; high-fat diet model group were fed with high-fat diet (standard diet supplemented with 1% cholesterol + 5% lard); MLT group were fed with high-fat diet and MLT [10 mg/(kg · d)]. Rabbits were adaptability raised after 1 week, high fat diet were used to induce model, melatonin was given by medical treatment. After 12 weeks, rabbits were sacrificed to get blood, detection in serum lipid indexes. Artery of lipid plaque was observed by oil red staining. Haematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect myocardial tissue morphological changes. Masson staining was used to detect myocardial tissue changes of collagen fibers. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways related proteins p38 and myosin light chain kinase (MLCK), myosin light chain (MLC), phosphorylation, myosin light chain (p-MLC) were detected by Western blot. **Results** Arterial oil red staining showed a large number of lipid plaques in the model group, demonstrating successful modeling. Compared with the normal group, concentration of total cholesterol (TCH) and triglyceride (TG) in model group increased significantly. HE, Masson staining showed that MLT can improve myocardial disorder in the form of organization situation and alleviate myocardial tissue accumulation of collagen fibers. Western blot showed that MLT can reduce p38 degree of phosphorylation, MLCK protein expression level, and decrease the phosphorylation of the degree of MLC ($P < 0.05$). **Conclusion** MLT may regulate the expression of MLCK protein by decreasing the phosphorylation of MAPK/p38 signaling pathway related proteins p38, thereby reducing the phosphorylation level of MLC to protect the myocardium of atherosclerotic rabbits.

Key words atherosclerosis; myocardial; melatonin; MAPK; MLCK