

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.002.html>

◇基础医学研究◇

光甘草定通过 p38/MAPK 通路调控 动脉粥样硬化模型兔动脉 MLCK 表达

王淦娴, 王 怡, 丁俊丽, 丁延辉, 周 青, 汪 渊, 朱华庆

摘要 目的 研究光甘草定能否通过 p38/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 通路影响动脉粥样硬化(AS) 兔模型主动脉内皮细胞肌球蛋白轻链激酶(MLCK) 的表达。方法 建立 AS 兔模型, 将新西兰大耳白兔随机分为 3 组: 正常对照组、高脂模型组、光甘草定组。正常对照组用正常饲料喂养; 高脂模型组、光甘草定组用高脂饲料喂养, 12 周后分析血清中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG) 成分的变化, 通过苏木精-伊红(HE) 染色分析兔动脉壁形态结构变化; 免疫组织化学方法观察兔模型主动脉内膜 MLCK 的分布和表达; Western blot 分析兔动脉内膜 MLCK 水平及 p38 蛋白磷酸化变化。结果 成功建立 AS 兔模型, 在给予高脂饮食 12 周以后, 与正常对照组相比, 血清中 TC 增高($P < 0.05$), TG 有所增加, 但差异无统计学意义; 大体标本观察到大量兔动脉粥样斑块形成, HE 染色显示高脂模型组兔主动脉血管内皮细胞间隙明显增大并伴有大量泡沫细胞, 内膜增厚明显; 免疫组化显示主动脉内膜 MLCK 表达量增多; Western blot 显示动脉 p38 磷酸化水平增强($P < 0.05$)。而加喂光甘草定后, 血管内膜病变程度有所下降, MLCK 表达有所下降, 动脉 p38 磷酸化水平有所下降($P < 0.05$)。结论 光甘草定可能通过 p38/MAPK 通路影响 AS 兔模型主动脉内皮细胞 MLCK 的表达。

关键词 动脉粥样硬化; 肌球蛋白轻链激酶; 光甘草定

中图分类号 R 972.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0309-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.001

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS) 发病的早期可表现出血管内皮细胞的功能障碍^[1]。血管内皮屏障功能障碍与细胞收缩的改变有密切联系。内皮细胞的收缩与肌动蛋白和肌球蛋白有关。对肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC) 的磷酸化被认为

是增加生物屏障通透性的分子基础, 肌球蛋白轻链激酶(myosin lightchain kinase, MLCK) 促进 MLC 的磷酸化, 引起内皮细胞(endothelial cells, EC) 骨架重排, 血管 EC 产生向心性收缩, 细胞间隙形成, 血管通透性增大并伴有大量脂质浸润沉积^[2]。

光甘草定属于光果甘草中的一种异黄酮成分^[3]。目前国内外研究^[4]表明光甘草定在降血压、调血脂方面有一定效果, 对 AS 的防治有益, 然而对其具体调控机制的研究还不十分明了。该研究通过构建 AS 兔模型, 探讨在 AS 形成发展过程中光甘草定是否通过 p38/MAPK 通路减轻实验性 AS 的病变程度, 为 AS 的防治及药物研究奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 动物: 雄性新西兰大耳白兔购自山东青岛康大集团, 普通级, (2.4 ± 0.5) kg, 用正常兔饲料喂养。光甘草定购自上海东苍生物科技有限公司; 胆固醇购自中国医药集团上海化学试剂公司(AR 级); 多价血清校正品购自北京九强公司; p38 抗体、pp38、 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; MLCK 抗体购自美国 Sigma 公司; 三酰甘油、胆固醇测定试剂盒购自浙江东瓯诊断产品有限公司; BCA 定量试剂盒和 ECL 发光剂购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 主要仪器 日立 7170A 型全自动生化分析仪(日本日立公司); 电子天平 FA 2004(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂); 转移电泳槽(DYY-III 408)、电泳仪 DYY-10(ECP3000)(北京六一仪器厂); TGL-18R 冷冻离心机(珠海黑马仪器公司)。

1.3 方法

1.3.1 AS 兔模型的建立 雄性新西兰大耳白兔共 18 只, 随机分 3 组。正常对照组: 基础饲料喂养 12 周; 高脂模型组: 高脂饲料喂养 12 周; 光甘草定组: 高脂饲料喂养的同时, 第 6 周开始给予光甘草定 2 mg/(kg·d), 共计 12 周。高脂饲料由 1% 胆固醇和 5% 猪油配制而成。

2016-12-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81270372); 安徽高校省级自然科学研究项目(编号: KJ2013Z127)

作者单位: 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、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: 王淦娴, 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

1.3.2 标本的制备 3%戊巴比妥钠麻醉动物,经颈动脉取血,离心血清, -20℃保存备用,于冰上分离主动脉,PBS漂洗,一部分主动脉经福尔马林固定后用于石蜡包埋,另一部分-80℃保存备用。

1.3.3 血脂的测定 使用全自动生化分析仪分析,所有测试项目用酶偶联比色法。

1.3.4 HE染色 切片脱蜡至水,苏木精染3 min,水洗2 min,1%盐酸乙醇分化3 s,水洗15~30 s,伊红染2 min,水洗1~2 s,80%乙醇、95%乙醇(I)、无水乙醇分别脱水30 s、3 min、7 min,二甲苯(I)、二甲苯(II)各透明5 min,中性树脂封片固定,镜下拍照。

1.3.5 免疫组织化学法检测 MLCK 的表达 上述石蜡切片;常规脱蜡至水;抗原修复:3% H₂O₂ 孵育5~10 min以消除内源性过氧化物酶,PBS冲洗3 min×3次;正常非二抗动物来源血清工作液封闭,室温孵育10~15 min,倾去勿洗;滴加适当比例稀释的一抗相互作用37℃孵育2~3 h,PBS冲洗3 min×3次;滴加标记二抗,37℃孵育10~15 min,PBS冲洗3 min×3次,滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,室温孵育10~15 min,PBS冲洗3 min×3次;DAB显色,阳性显色为棕色。

1.3.6 Western blot 法检测 p38 磷酸化及 MLCK 蛋白表达变化 组织标本在冰上剪碎,研磨组织提取蛋白,BCA法蛋白定量后分别与4×蛋白上样缓冲液按3:1混合。沸水煮5~10 min备用。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电转至PVDF膜上。封闭和抗体结合:封闭PVDF膜非特异抗原,依次加一抗[p38(1:1 000)、pp38(1:1 000)、β-actin(1:1 000)、MLCK(1:1 000)]进行孵育,后洗涤,再加入二抗[羊抗鼠IgG HRP(1:1 000)]进行孵育,后洗涤。使用ECL试剂盒显影曝光。

1.4 统计学处理 所有实验数据采用SPSS 16.0统计软件进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计量资料使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光甘草定对 AS 模型兔血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)含量的影响 高脂模型组与正常对照组相比总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(Triglyceride, TG)明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),光甘草定组与高脂模型组相比TC含量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),TG亦有所下降,但差异无统计学意义。见表1。

表1 各组兔血清TC、TG含量的比较(mmol/L, n=6, $\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	高脂模型组	光甘草定组	F值
TC	1.03 ± 0.38	68.56 ± 4.78*	52.90 ± 9.3#	118.540
TG	0.40 ± 0.21	9.16 ± 2.57*	6.45 ± 2.68	12.081

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与高脂模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 光甘草定对 AS 大体标本的影响 高脂饮食12周以后,与正常对照组相比,高脂模型组兔动脉壁有明显的纤维斑块,内膜平滑完整程度受到破坏,经光甘草定治疗后,AS程度得到改善,见图1。

2.3 HE染色结果 HE结果显示光镜下正常对照组内膜完整,内皮细胞间连接紧密;而高脂模型组可见内膜下大量泡沫细胞形成且动脉内膜明显增厚,光甘草定组可见内膜增厚不明显,平滑肌细胞较整齐,见图2。

2.4 光甘草定对 MLCK 表达的影响

2.4.1 免疫组织化学法检测结果 由免疫组织化学方法可见,正常对照组MLCK表达含量较少,经高脂饮食12周以后,高脂模型组可见MLCK表达含量增多,覆盖整个兔主动脉壁的内膜层及平滑肌层,而光甘草定组可见MLCK表达明显减少,见图3。

2.4.2 Western blot 法检测结果 Western blot结果显示,与正常对照组相比,给予高脂饮食12周以后,高脂模型组MLCK表达明显增高,而自第6周光甘草定给药后,光甘草定组MLCK表达水平有所降



图1 兔动脉壁形态比较(大体观)

A: 正常对照组; B: 高脂模型组; C: 光甘草定组

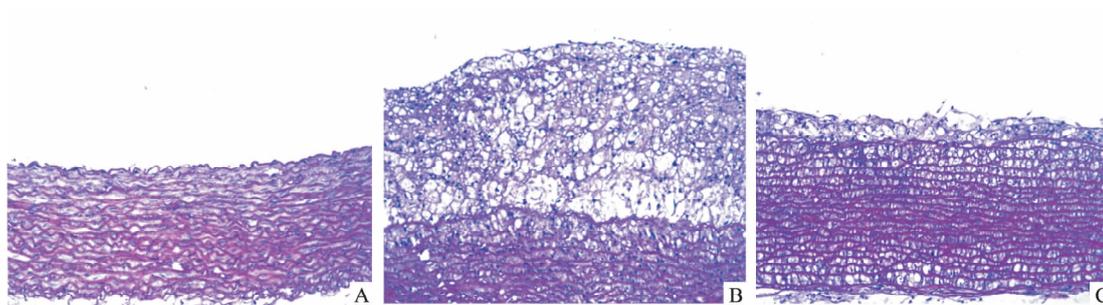


图2 兔动脉壁结构与形态比较 HE × 100

A: 正常对照组; B: 高脂模型组; C: 光甘草定组

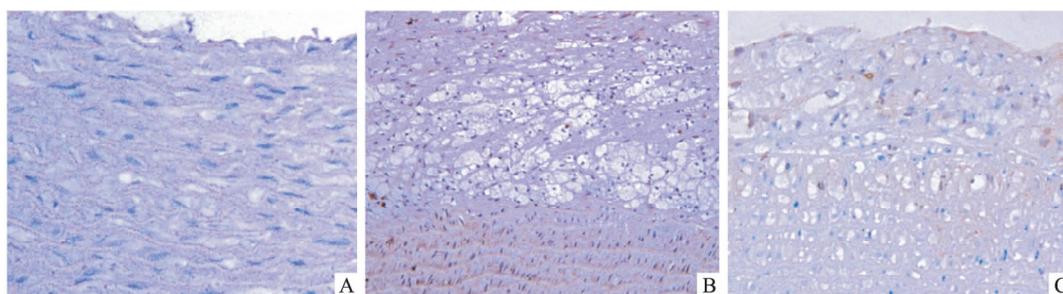


图3 兔动脉壁的免疫组织化学染色 × 100

A: 正常对照组; B: 高脂模型组; C: 光甘草定组

低,见图4。

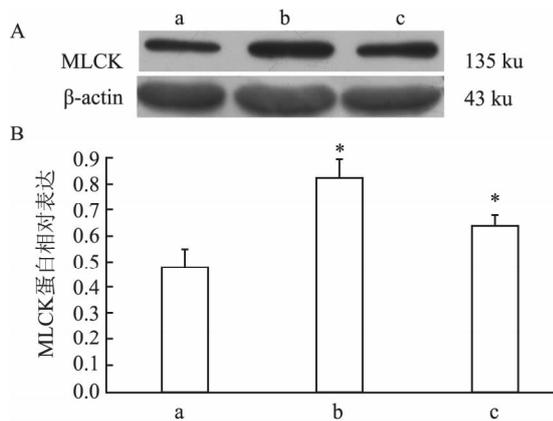


图4 Gla对MLCK蛋白的表达水平的影响

A: Western blot 检测各组 MLCK 表达水平; B: Western blot 检测各组 MLCK 表达水平统计分析; a: 正常对照组; b: 高脂模型组; c: 光甘草定组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

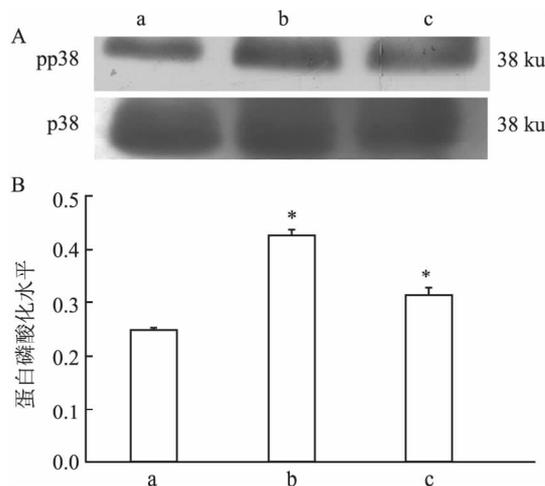


图5 光甘草定对MAPK途径中p38磷酸化的影响

A: Western blot 检测各组 p38 磷酸化水平; B: Western blot 检测各组 p38 磷酸化水平统计分析; a: 正常对照组; b: 高脂模型组; c: 光甘草定组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$

2.5 光甘草定对 p38 磷酸化的影响 Western blot 结果显示,正常对照组p38磷酸化较少,高脂饮食 12 周后,高脂模型组 p38 磷酸化程度明显增强,而光甘草定组可见 p38 磷酸化水平有所下降,见图 5。

3 讨论

目前认为以 AS 为基础的心脑血管疾病是发病率与死亡率最高的心脑血管疾病^[5]。动脉壁内皮

损伤及脂质浸润沉积是目前公认的 AS 起始因素^[6],迄今为止,对 AS 的发病机制的研究还不彻底,其发病机制十分复杂,存在多种危险因素,而临床相对缺乏有效的防治药物。

肌球蛋白的主要作用是调控细胞骨架结构并参与细胞的多种生理活动,而这些主要通过 MLC 的磷酸化与去磷酸化实现^[7]。MLC 的磷酸化是生物屏障通透性增加的分子基础^[8]。

MLCK 的功能主要是介导 MLC 磷酸化, 内皮细胞肌动蛋白与肌球蛋白 II 相互作用, 从而使得细胞收缩, 细胞间隙形成, 通透性增大^[9]。其通透性的增加导致粘附于血管内皮的单核细胞易于沉积于内皮下, 受细胞因子刺激转变为巨噬细胞, 然后在清道夫受体介导下吞噬脂质而形成巨噬细胞源性泡沫细胞, 促进 AS 的发展。本研究显示, 在实验性 AS 兔模型中, 高脂饮食后, 血管内皮层和平滑肌层 MLCK 的表达均明显增强。而血管平滑肌细胞的 MLCK 表达的增强亦会使 MLC 磷酸化增强, 平滑肌细胞收缩, 部分平滑肌细胞增生、向外迁移和聚集, 吞噬脂质形成平滑肌源性泡沫细胞。

MAPK 属于丝/苏氨酸蛋白激酶, 由一系列蛋白激酶及其磷酸化作用构成的级联反应, 在多种胞内信号转导途径中起关键作用。目前已知的至少有 4 条 MAPK 通路: 细胞外信号调节通路、c_jun 氨基末端激酶通路、p38/MAPK 通路以及 ERK 5/BMK1 通路^[10], 其中 p38/MAPK 是 MAPK 通路中比较重要的一条通路。4 条通路激活级联反应类似即 MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK) → MAPK 激酶 (MAPKK) → MAPK。受各种刺激因素依次激活后, NF- κ B 活化, 进而调节炎性细胞因子的表达^[11]。

本研究在建立 AS 兔模型基础上, 通过 HE 染色、免疫组织化学方法及 Western blot 可观察到给予高脂饮食后, 内膜下形成大量泡沫细胞, MLCK 表达明显增多, 经光甘草定治疗后, 泡沫细胞减少, MLCK 表达下降。同时 Western blot 显示 p38 在高脂饮食后, 磷酸化水平明显增高, 经光甘草定给药后磷酸化水平有所下降。

综上所述, 本研究推测光甘草定可能通过 p38/MAPK 通路调控 MLCK 的表达, 进而减轻 AS 的病变程度, 但是仍需进一步论证, 例如体外实验中加入 p38 特异性抑制剂进行论证, 而光甘草定是否还通过 MAPK 通路目前所知的其他几条通路调控兔动脉 MLCK 的表达, 这些都有待于进一步研究, 以便

为 AS 的防治提供新的思路和药物的应用提供新的理论依据。

参考文献

- [1] Daiber A, Steven S, Weber A, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction [J]. *Br J Pharmacol*, 2016. doi: 10.1111/bph.13517.
- [2] 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.
- [3] Gupta V K, Fatima A, Faridi U, et al. Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots [J]. *Ethnopharmacol*, 2008, 11(6): 377-80.
- [4] Yokota T, Nishio H, Kubota Y, et al. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation [J]. *Pigment Cell Res*, 1998, 11(6): 355-61.
- [5] Li D, Singh R M, Liu L, et al. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(1): 238-43.
- [6] Williams J K, Sukhova G K, Herrington D M, et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic mice [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31(3): 684-91.
- [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] Birukova A A, Tian X, Cokic I, et al. Endothelial barrier disruption and recovery is controlled by substrate stiffness [J]. *Microvasc Res*, 2013, 87: 50-7.
- [9] Jia Z, Zhen W, Velayutham Anandh Babu P, et al. Phytoestrogen genistein protects against endothelial barrier dysfunction in vascular endothelial cells through PKA-mediated suppression of RhoA signaling [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(2): 727-37.
- [10] 姜勇, 龚小卫. MAPK 信号转导通路对炎症反应的调控 [J]. *生理学报*, 2000, 52(4): 267-71.
- [11] Mao J, Liu J, Pang X, et al. Nicotine induces the expression of c-reactive protein via MAPK-dependent signal pathway in U937 macrophages [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(5): 457-61.

Regulation of glabridin on the expression of MLCK in endothelial cells through the pathway of p38/MAPK in the artery wall of atherosclerotic rabbits

Wang Ganxian, Wang Yi, Ding Junli, et al

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

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

Abstract Objective To discuss whether myosin light chain kinase (MLCK) in arterial endothelial cells was

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.004.html>

碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌 β -内酰胺类耐药基因研究

黄中海¹, 王中新², 周强³, 刘周³, 黄升海¹

摘要 目的 探讨碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌 β -内酰胺类耐药基因携带情况。方法 收集 242 株临床分离的粘质沙雷菌, 采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物系统对其鉴定并进行药敏试验, 筛选出对亚胺培南耐药 18 株、中介 1 株; 再用 K-B 法检测 19 株细菌对厄他培南和美罗培南的药物敏感性, 确认均为耐药; 采用改良 Hodge 试验及 EDTA 协同试验检测碳青霉烯酶; PCR 检测碳青霉烯酶基因 *blaKPC*、*blaNMC*、*blaIMP*、*blaGIM*、*blaVIM*、*blaOXA-23* 及超广谱 β -内酰胺酶基因 *blaVEB*、*blaPER*、*blaTEM*、*blaSHV*、*blaCTX-M-1*、*blaCTX-M-2*、*blaCTX-M-9*, 阳性结果进行 DNA 测序, BLAST 比对确定基因型。结果 药敏结果显示, 19 株细菌对美罗培南、厄他培南、氨曲南、环丙沙星、头孢唑林、头孢曲松、头孢噻肟全部耐药, 对亚胺培南 18 株耐药、1 株中介; 对阿米卡星全部敏感; 对庆大霉素敏感率为 57.9%; 妥布霉素敏感率不到 30%; 对头孢替坦、头孢他啶、头孢吡肟敏感率均不足 20%; 左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦敏感率均不足 10%; 改良 Hodge 试验阳性

18 株, 阴性 1 株; EDTA 协同试验全部阴性; PCR 扩增和 DNA 测序显示, 7 株含 *blaKPC-2*、6 株含 *blaCTX-M-14*、3 株含 *blaSHV-11*、2 株含 *blaSHV-12*、1 株含 *blaOXA-23* 基因; 19 株细菌均未检出 *blaNMC*、*blaIMP*、*blaGIM*、*blaVIM* 碳青霉烯酶基因及 *blaVEB*、*blaPER*、*blaTEM*、*blaCTX-M-1*、*blaCTX-M-2* 超广谱 β -内酰胺酶基因。结论 分离的碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌, 耐药现象较为严重, 主要携带 *blaKPC-2* 型、*blaCTX-M-14* 型耐药基因。

关键词 粘质沙雷菌; 耐药基因; 聚合酶链反应

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0313-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.002

粘质沙雷菌系沙雷菌属肠杆菌科革兰阴性杆菌, 常存于健康人的皮肤、肠道和呼吸道, 曾被认为是无害的环境污染菌。现研究^[1]表明, 该菌在机体抵抗力低下时, 可引起呼吸道、伤口、泌尿道感染及败血症等多种疾病, 重症者常能危及生命, 并可引起院内感染的爆发流行。近年来, 随着碳青霉烯类抗生素的广泛使用, 碳青霉烯类耐药的粘质沙雷菌检出率逐年提高^[2], 给临床治疗带来很大困难。粘质沙雷菌耐药机制比较复杂(如产生 β -内酰胺酶、外膜通透性下降及主动外排机制的过度表达等^[3])。该研究针对碳青霉烯类耐药粘质沙雷菌 β -内酰胺类耐药基因携带情况进行调查, 初步探讨其耐药机

2016-12-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371797)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院微生物学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

³安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

作者简介: 黄中海, 男, 副主任技师, 硕士研究生;

黄升海, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

accommodated by glabridin through the pathway of p38/MAPK on atherosclerosis(AS) model rabbit. **Methods** The AS model rabbit was set up and New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups: normal group, high fat model group, glabridin group. The changes of serum lipid components was analyzed in model rabbit. The ultrastructural changes of rabbit arterial wall was observed through by hematoxylin-eosin staining(HE). The distribution and expression of MLCK in rabbit arterial intima was measured by immunohistochemistry. The changes of MLCK and p38 phosphorylation in endothelial cells was surveyed by Western blot. **Results** The establishment of AS rabbit model was successful. After being fed up with the high fat diet for 12 weeks, the atherosclerotic plaques were observed clearly. And compared with the normal control, HE staining showed that the gap between the endothelial cells was gradually increased, and a large number of foam cells were formatted. The expression of MLCK and the expression of p38 phosphorylation was enhanced in the rabbit artery tissue. After glabridin was added into the high fat food, the expression of the MLCK and the p38 phosphorylation in the artery tissue were decreased. The level of aortic intimal lesion was certainly lessend. **Conclusion** Glabridin may regulate the expression of MLCK in endothelial cell of AS model of rabbit artery by the pathway of p38/MAPK.

Key words atherosclerosis; myosin light chain kinase; glabridin