

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.09.002

文章编号: 1005-8982 (2019) 09-0006-05

Urantide 对动脉粥样硬化大鼠心脏 U II 和 GPCR14 基因与蛋白表达的影响 *

孙晓旭, 王途, 周健, 刘凯, 崔海鹏, 谢云鹏, 赵娟

(承德医学院, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 观察 Urantide 对动脉粥样硬化 (AS) 大鼠心脏 U II 和 GPCR14 基因与蛋白表达的影响。**方法** 采用腹腔注射维生素 D₃ 及高脂饲料喂养复制大鼠 AS 模型, 随机分为正常组、AS 组、辛伐他汀组、Urantide 组 (3、7 和 14 d 组)。应用免疫组织化学、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)、Western blotting 检测大鼠心脏 U II、GPCR14 基因和蛋白的表达水平。**结果** 与正常组比较, AS 组大鼠心脏血管及病变部位 U II 及 GPCR14 阳性表达增加 ($P < 0.05$), U II 及 GPCR14 基因与蛋白质的表达水平升高 ($P < 0.05$)。与 AS 组比较, Urantide 各给药组大鼠心脏血管及病变部位的 U II 及 GPCR14 阳性表达减少 ($P < 0.05$), U II 及 GPCR14 基因与蛋白质的表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** Urantide 对 AS 大鼠的心脏具有保护作用。

关键词: 动脉粥样硬化; 心脏; Urantide; 尾加压素 II; GPCR14

中图分类号: R543.5; R363.1

文献标识码: A

Effect of Urantide on expression of U II and GPCR14 in atherosclerotic heart*

Xiao-xu Sun, Tu Wang, Jian Zhou, Kai Liu, Hai-peng Cui, Yun-peng Xie, Juan Zhao
(Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Urantide on the expression of U II and GPCR14 gene and protein in atherosclerotic heart. **Methods** A rat model of atherosclerosis (AS) was established by high-fat diet plus intraperitoneal injection of VD₃. Rats were randomly divided into Normal group, AS group, Simvastatin group and Urantide group. Expression of U II and GPCR14 gene and protein in rat heart was measured by immunohistochemistry, qRT-PCR and Western blotting. **Results** Positive staining of U II and GPCR14 in AS heart tissue were increased significantly when compared with normal group ($P < 0.05$). Quantification of U II and GPCR14 by qPCR and WB further confirmed upregulation of protein expression in AS group ($P < 0.05$). Increased expression of U II and GPCR14 in AS group was abolished by treatment of Urantide ($P < 0.05$). **Conclusions** Urantide has significant protective effect on heart in AS rats probably through downregulation of U II and GPCR14.

Keywords: atherosclerosis; heart; Urantide, urotensin II; GPCR14

收稿日期: 2018-12-16

* 基金项目: 河北省青年拔尖人才项目 (No: 冀组字 [2016]9 号); 河北省教育厅优秀青年基金项目 (No: YQ2013005); 河北省高校重点学科建设项目资助 (冀教高 [2013]4 号病理学与病理生理学)

[通信作者] 赵娟, E-mail: zhaojuan811015@sina.com; Tel: 0314-2291364

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 时, 动脉内膜脂质沉积形成粥样斑块, 从而引起血管腔狭窄或阻塞, 造成心肌缺血、缺氧或坏死, 出现心脏的病理改变。国内外大量研究报道, 多种心脏疾病与 AS 的发生、发展密切相关, 互为因果^[1-2]。因此, 研究心脏的病理改变及发病机制, 对防治 AS 具有重要的临床意义。Urantide 是在人尾加压素 II (human urotensin II, hU II) 基础上衍生而来, 目前被认为是最有效的肽类 U II 的特异性受体 G 蛋白偶联受体 14 (G-protein-coupled receptors 14, GPCR14) 的拮抗剂, U II 与其受体 GPCR14 结合从而发挥生物学效应^[3]。本课题组前期研究发现, Urantide 可加速胸主动脉壁内的胶原蛋白降解, 抑制 U II 对动脉炎症损伤的促进作用, 改善 AS 病变程度^[3-4]。而 Urantide 对 AS 大鼠心脏的具体作用及机制尚不清楚。本研究利用大鼠 AS 模型, 探讨 Urantide 对 AS 大鼠心脏 U II、GPCR14 基因和蛋白表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及试剂 无特定病原体 (SPF) 级健康雄性 Wistar 大鼠 180 只, 3 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK(京)-2016-0011, 生产合格证: 11400700 127208]; Urantide 由苏州强耀生物公司提供, 辛伐他汀 (simvastatin) 购自北京诺华制药有限公司, 免疫组织化学 (以下简称免疫组化) 染色试剂盒 (PV-6000) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 放射免疫沉淀测定 (RIPA) 裂解液 (P0013B)、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (P0006) 和超敏电化学发光 (ECL) 试剂盒 (Cat P0018) 均购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗大鼠 U II、GPCR14 均购自上海 Santa 公司, 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔二抗均自美国 Bioworlde 公司, Trizol (DP405-02)、TIAN Script cDNA 第一链合成试剂盒 (KR104)、Super Real Pre Mix SYBR Green (FP204) 均购自北京天根生化科技有限公司。

1.1.2 大鼠 AS 模型复制及实验分组 高脂饲料配制: 基础饲料, 胆固醇 35%, 猪油 10%, 丙硫氧嘧啶 0.2%, 胆酸钠 0.5%, 白糖 5%。Wistar 大鼠 180 只随机分为 2 组。正常组 30 只, 饲以普通饲料; 模型组 150 只, 在实验开始时饲以高脂饲料, 并在此基础上每只大鼠

连续 3 d 给予腹腔注射维生素 D₃ 150 u/(kg·d), 实验周期为 4 周^[5-6]。AS 模型复制成功后, 将 150 只模型组大鼠又随机分为 3 组: AS 模型组 (AS 组) 30 只, 阳性药辛伐他汀组 (辛伐他汀组) 30 只, Urantide 3、7 和 14 d 组 90 只 (给药时间分别为 3、7 和 14 d, 每组 30 只)。正常组和 AS 组每只大鼠每日尾静脉注射生理盐水 30 μ g/kg, 连续 14 d; 辛伐他汀组每只大鼠每日灌胃辛伐他汀 5 μ g/kg, 连续 14 d; Urantide 组每只大鼠每日尾静脉注射 Urantide 30 μ g/kg, 给药时间分别为 3、7 和 14 d。

1.1.3 样本采集 各组大鼠均采用小动物麻醉机吸入式麻醉安乐死方法处理。胸主动脉样本采集: 麻醉取血后, 立即摘取胸主动脉, 生理盐水洗去血迹后, 4% 多聚甲醛固定, 大鼠胸主动脉经脱水、透明、浸蜡、包埋后制备成石蜡切片, 经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、常规 HE 染色后, 光学显微镜下拍照观察病理学变化。心脏样本采集: 摘取胸主动脉后, 立即摘取心脏, 生理盐水洗去血迹后, 一部分标本用 4% 多聚甲醛固定, 待形态学检测; 另一部分冷冻于液氮进行分子生物学检测。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化法检测大鼠心脏 U II 和 GPCR14 的表达 心脏经酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后, 应用 LEICA (上海徕卡显微系统有限公司, RM2255) 切片机将组织切为 3 ~ 4 μ m 的蜡带, 然后进行免疫组化染色。应用病理图形分析软件 IP win32 对图像中阳性表达进行统计分析, 计算各组大鼠心肌中 U II 与 GPCR14 阳性颗粒表达的光密度 (OD) 值。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测大鼠心脏 U II 与 GPCR14 mRNA 的表达 Trizol 法提取心脏组织总 RNA, 紫外分光光度计进行定量检测, 逆转录合成 cDNA, qRT-PCR 检测 U II、GPCR14、GAPDH mRNA 的 Ct 值, 引物序列见表 1, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 个循环; 做溶解曲线。以各基因 Ct 值与 GAPDH mRNA Ct 值的差值为 Δ Ct, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因 mRNA 的相对表达水平, 并以正常组为参照做归一化处理, 其他各组与其做比较。

1.2.3 Western blotting 检测大鼠心脏 U II 与 GPCR14 蛋白的表达 RIPA 裂解液提取组织样本的总蛋白, Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。45 μ g 蛋白于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
U II	正向: 5'-GGAGGAGCTGGAGAGGACTG-3'	20
	反向: 5'-GAGTCTCGGCACTGGGATCT-3'	
GPCR14	正向: 5'-AATGGCTCTAGGGTCTCTCT-3'	20
	反向: 5'-AACAGCCTCTGTGATGGACA-3'	
GAPDH	正向: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	20
	反向: 5'-TCCCCATGAACGAGGAATTC-3'	

并转膜, 封闭, U II (1 : 200)、GPCR14 (1 : 100)、GAPDH (1 : 10 000) 兔抗大鼠一抗 4℃ 孵育过夜。加入 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1 : 5 000), 37℃ 孵育 1 h, 洗膜后用超敏 ECL 试剂盒显影。利用 Image J 光密度分析软件对各蛋白目的条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值作为各蛋白质的相对表达水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 大鼠胸主动脉的形态学改变

HE 染色结果显示, 正常组大鼠胸主动脉内膜、

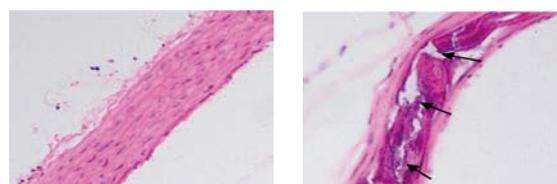
中膜、外膜结构完整清楚, 内皮细胞完整, 中膜平滑肌细胞排列整齐, 且外弹力板结构清晰, 呈环形排列, 外膜由疏松结缔组织构成; AS 组大鼠胸主动脉内皮细胞破坏, 出现钙化及炎症细胞浸润, 平滑肌细胞增殖、萎缩, 弹力纤维破坏、变薄, 内膜下脂质沉积形成 AS 斑块, 呈典型的 AS 病理改变。表明, 腹腔注射维生素 D₃ 及高脂饲料喂养的方法 4 周后成功复制大鼠 AS 模型。见图 1。

2.2 免疫组化染色结果

各组大鼠心脏 U II 与 GPCR14 阳性表达经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AS 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 阳性表达较正常组增多 ($P < 0.05$), 且多表达于血管周围及病变部位。与 AS 组比较, 经 Urantide 治疗后 Urantide 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 阳性表达减少 ($P < 0.05$), 其效果接近辛伐他汀组的表达水平 ($P < 0.05$)。见图 2、3 和表 2。

2.3 各组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 mRNA 表达

各组大鼠心脏 U II 与 GPCR14 mRNA 表达经单

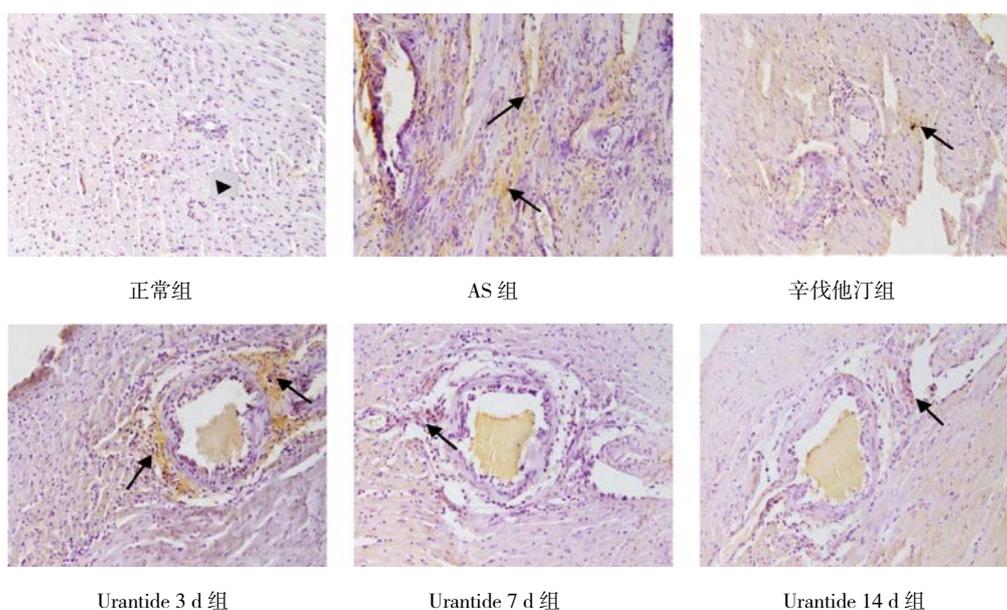


正常组

AS 组

箭头示 AS 时血管膜弹力纤维破坏, 出现明显钙化及斑块

图 1 AS 大鼠胸主动脉形态学改变 (HE × 400)



正常组

AS 组

辛伐他汀组

Urantide 3 d 组

Urantide 7 d 组

Urantide 14 d 组

箭头示大鼠心脏血管周围及病变部位 U II 阳性表达

图 2 大鼠心脏 U II 免疫组化染色结果 (× 200)

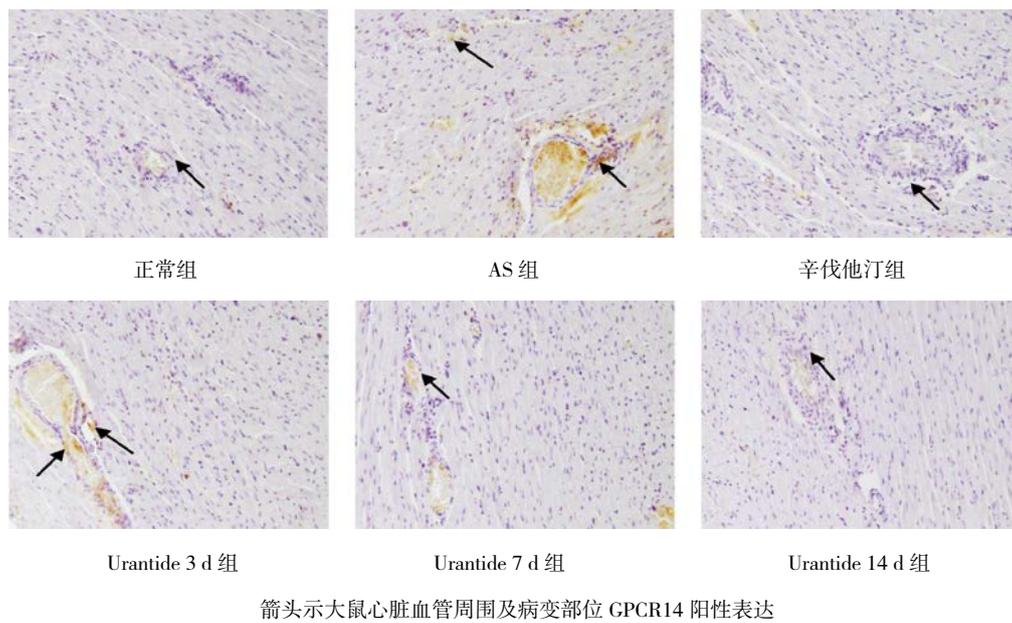


图3 大鼠心脏 GPCR14 免疫组化染色结果 (×200)

表2 各组大鼠心脏 U II 和 GPCR14 OD 值的比较 (n=30, $\bar{x} \pm s$)

组别	U II	GPCR14
正常组	0.16 ± 0.04 ¹⁾	0.08 ± 0.03 ¹⁾
AS 组	1.66 ± 0.15	1.20 ± 0.06
辛伐他汀组	0.69 ± 0.13 ¹⁾	0.27 ± 0.04 ¹⁾
Urantide 3 d 组	0.80 ± 0.04 ¹⁾²⁾	0.83 ± 0.06 ¹⁾²⁾
Urantide 7 d 组	0.58 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.50 ± 0.08 ¹⁾²⁾
Urantide 14 d 组	0.61 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.31 ± 0.07 ¹⁾²⁾
F 值	85.254	122.241
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 AS 组比较, P<0.05; 2) 与辛伐他汀组比较, P<0.05

因素方差分析, 差异有统计学意义 (P<0.05)。AS 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 mRNA 表达较正常组升高 (P<0.05)。与 AS 组比较, 经 Urantide 治疗后各 Urantide 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 mRNA 表达降低 (P<0.05), 其效果接近辛伐他汀组的表达水平 (P<0.05)。见表 3。

2.4 各组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 蛋白表达

各组大鼠心脏 U II 与 GPCR14 蛋白表达经单因素方差分析, 差异有统计学意义 (P<0.05)。AS 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 蛋白表达较正常组升高 (P<0.05)。经 Urantide 治疗后各 Urantide 组大鼠心脏 U II 及 GPCR14 蛋白表达降低 (P<0.05), 其效果接近辛伐他汀组的表达水平 (P<0.05)。见表 4 和图 4。

表3 各组大鼠心脏 U II 和 GPCR14 的 mRNA 表达 (n=30, $\bar{x} \pm s$)

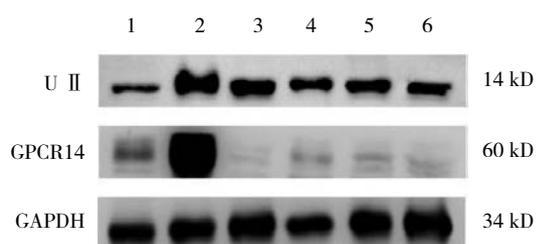
组别	U II mRNA	GPCR14 mRNA
正常组	1.00 ± 0.01 ¹⁾	1.00 ± 0.08 ¹⁾
AS 组	2.30 ± 0.05	2.30 ± 0.05
辛伐他汀组	1.10 ± 0.02 ¹⁾	1.20 ± 0.04 ¹⁾
Urantide 3 d 组	1.40 ± 0.03 ¹⁾²⁾	1.32 ± 0.06 ¹⁾²⁾
Urantide 7 d 组	1.25 ± 0.04 ¹⁾²⁾	1.48 ± 0.07 ¹⁾²⁾
Urantide 14 d 组	1.20 ± 0.08 ¹⁾²⁾	1.10 ± 0.09 ¹⁾²⁾
F 值	67.125	64.100
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 AS 组比较, P<0.05; 2) 与辛伐他汀组比较, P<0.05

表4 各组大鼠心脏 U II 和 GPCR14 的蛋白表达 (n=30, $\bar{x} \pm s$)

组别	U II 蛋白	GPCR14 蛋白
正常组	0.34 ± 0.02 ¹⁾	0.50 ± 0.01 ¹⁾
AS 组	0.96 ± 0.01	0.99 ± 0.01
辛伐他汀组	0.80 ± 0.03 ¹⁾	0.05 ± 0.00 ¹⁾
Urantide 3 d 组	0.70 ± 0.03 ¹⁾²⁾	0.19 ± 0.00 ¹⁾²⁾
Urantide 7 d 组	0.70 ± 0.03 ¹⁾²⁾	1.45 ± 0.00 ¹⁾²⁾
Urantide 14 d 组	0.56 ± 0.03 ¹⁾²⁾	0.13 ± 0.00 ¹⁾²⁾
F 值	89.031	93.428
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 AS 组比较, P<0.05; 2) 与辛伐他汀组比较, P<0.05



1: 正常组; 2: AS 组; 3: 辛伐他汀组; 4: Urantide 3 d 组; 5: Urantide 7 d 组; 6: Urantide 14 d 组

图 4 大鼠心脏 U II 与 GPCR14 的蛋白表达

3 讨论

U II 是一种生长抑素样环肽, 最早从鱼的脊髓尾部下垂体中分离出来, 是目前已知的最强的缩血管活性肽, U II 与其受体 GPCR14 相结合构成 U II /UT 系统在生理和病理条件下发挥多种生物学功能^[3]。国内外大量研究报道, U II 不但促进 AS 的进展, 而且参与了心肌纤维化、心脏重塑、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心力衰竭、心肌肥厚等多种心脏疾病的发生与发展, 其有可能成为一个影响因素^[7-8]。因此, 以 U II 为靶点, 保护心脏、治疗 AS 成为人们关注的热点。

Urantide 由 hU II 衍生而来, 目前被认为是最有效的 U II 受体 GPCR14 拮抗剂^[9]。CERNARO 等^[9]研究报道, Urantide 可以降低由 U II 和转化生长因子 β 诱导的纤维连接蛋白的表达, 在心肌纤维化中具有抗纤维化的作用。国内外有关 Urantide 与动脉粥样硬化心脏的报道极少, 迄今可查到的信息, 基本上都来自本课题组所做的工作。本研究室前期研究证明, 在体内实验中, U II 及其受体 GPCR14 基因与蛋白在 AS 大鼠胸主动脉中大量表达, 且 U II 可促进炎症因子的释放, 而 Urantide 可以下调其表达量, 减轻胸主动脉的炎症损伤, 起到保护胸主动脉的作用; 在体外实验中, U II 可以促进血管平滑肌细胞的增殖, 上调血管平滑肌细胞中 U II 与其受体 GPCR14 基因与蛋白的表达水平, 促进炎症因子的释放, Urantide 则可以下调其表达量, 对血管平滑肌细胞中的炎症因子具有抑制作用, 从而改善 AS 病理改变^[10]。

本结果显示, Urantide 作为 U II 受体 GPCR14 的

拮抗剂, 可减少大鼠心脏 U II、GPCR14 的阳性颗粒表达; qRT-PCR 及 Western blotting 结果进一步证实 Urantide 对 AS 大鼠心脏 U II、GPCR14 mRNA 及蛋白质表达水平均具有下调作用。笔者推测, U II 与其受体 GPCR14 结合后可加重 AS 大鼠的心脏损伤, 而 Urantide 则可阻断 U II 这种促进作用, 减轻大鼠 AS 病理改变。

综上所述, Urantide 可以通过降低 AS 大鼠心脏 U II 及其受体 GPCR14 的基因及蛋白质的表达水平, 而起到对抗损伤、保护心脏, 治疗 AS 的作用。但有关于 Urantide 对 AS 大鼠心脏的具体作用机制, 还需进一步研究, 以期为临床应用 Urantide 治疗 AS 提供更多的实验依据。

参 考 文 献:

- [1] GETZ G S, REARDON C A. Use of mouse models in atherosclerosis research[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1339: 1-16.
- [2] PING K, PANAGIOTA C, NIKOLAOS F. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. *Cell. Mol Life. Sci*, 2014, 71(4): 549-574.
- [3] ZHAO J, YU Q X, KONG W, et al. The urotensin II receptor antagonist, Urantide, protects against atherosclerosis in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(6): 1765-1769.
- [4] ZHAO J, XIE L D, SONG C J, et al. Urantide improves atherosclerosis by controlling C-reactive protein, monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor-beta expression in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6): 1647-1652.
- [5] 赵娟, 任立群. 大鼠动脉粥样硬化模型的复制[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(23): 4139-4141.
- [6] 赵娟, 李相军, 孙波, 等. 维生素 D3 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(21): 3569-3571.
- [7] LUO S Y, SHEN S, QIN Y D. Urotensin-II receptor antagonist SB-710411 protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via RhoA/ROCK pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): 1-16.
- [8] SAMAN J, ABUZER C, MURAT S. The role of human urotensin-II in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2017, 3(43): 1-24.
- [9] CERNARO V, MEDICI M A, BIANCO F, et al. Opposite actions of urotensin II and relaxin-2 on cellular expression of fibronectin in renal fibrosis: A preliminary experimental study[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(10): 1069-1071.
- [10] 赵娟. 尾加压素在大鼠动脉粥样硬化发病机制中的作用及 Urantide 的干预研究[D]. 长春: 吉林大学, 2010.

(王荣兵 编辑)