

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.001>

· 论著 ·

氯喹在血管紧张素 II 诱导的小鼠血管重塑中的作用

田孝祥, 赵晓杰, 刘丹, 张艳, 屈莉莉, 吴鹏, 何廉旗

(沈阳军区总医院心血管病研究所心内科, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 探讨氯喹(chloroquine, CQ)对血管紧张素II(angiotensin II, AngII)诱导的小鼠血管重塑的作用及可能机制。方法: 将32只8周龄雄性C57 BL/6小鼠随机分为4组, 分别为对照组、AngII处理组、AngII+CQ低剂量组及AngII+CQ高剂量组, 每组8只。对照组不做任何处理, AngII组通过皮下埋置微渗透泵持续给予AngII, 剂量为490 ng/(kg·min)。AngII+CQ低剂量及高剂量组小鼠在接受AngII基础上, 按10 mg/(kg·d)及50 mg/(kg·d)剂量每天腹腔注射CQ。各组处理时间均为28 d。分别在第0, 3, 7, 14, 21及28天用尾套法测定各组小鼠血压及心率。在第28天时处死小鼠, 取主动脉, 采用HE染色及Masson染色评价主动脉血管重塑情况。采用Western印迹检测主动脉I型、III型胶原蛋白(collagen I/III)及自噬通路分子(LC3B-II与P62)表达。结果: 与对照组相比, AngII处理组小鼠血压升高, 主动脉管壁增厚, 主动脉发生明显纤维化, collagen I/III表达增加, 自噬发生标志LC3B-II表达增加, 自噬底物P62表达降低。与AngII处理组相比, CQ低剂量及高剂量处理组小鼠血压降低, 主动脉管壁变薄, 纤维化减轻, collagen I/III表达减少, LC3B-II及P62表达均增加; 并且CQ高剂量组较低剂量组上述各指标的改变程度更大。结论: CQ可剂量依赖性地抑制AngII诱导的小鼠主动脉重塑, 其机制可能与抑制自噬过度激活有关。

[关键词] 氯喹; 血管重塑; 血管紧张素II; 自噬

Effect of chloroquine in angiotensin II induced vascular remodeling in mice

TIAN Xiaoxiang, ZHAO Xiaojie, LIU Dan, ZHANG Yan, QU Lili, WU Peng, HE Lianqi

(Department of Cardiology, Cardiovascular Research Institute, General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and potential mechanism of chloroquine (CQ) in angiotensin II (AngII) induced murine vascular remodeling. **Methods:** A total of 32 male C57 BL/6 mice aged 8 weeks were randomly divided into a control group, an AngII group, an AngII + low-dose CQ and an AngII + high-dose CQ (8 mice for each). Control group was left untreated. AngII group received 490 ng/(kg·min) AngII by subcutaneously imbedded osmotic pump. AngII + low-dose and AngII high-dose CQ group were injected intraperitoneally with 10 mg/(kg·d) and 50 mg/(kg·d) CQ respectively based on AngII treatment for 28 days. Mouse blood

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-30

通信作者 (Corresponding author): 田孝祥, Email: tian_xx@163.com

基金项目 (Foundation item): 辽宁省科学技术计划项目 (201602791). This work was supported by the Science and Technology Project of Liaoning Province, China (201602791).

pressure and heart rate were monitored by using tail-cuff method on day 0, 3, 7, 14, 21 and 28. On day 28, all the mice were sacrificed to collect aortas for H&E and Masson's staining to access aortic remodeling. Western bolt was performed to detect expression of collagen I/III and autophagy related molecules (LC3B-II and P62).

Results: Compared with control group, AngII group presented with elevated blood pressure, thickened aortic vessel wall, significant aortic fibrosis, increased collagen I/III expression, increased autophagic indicator LC3B-II expression and decreased autophagy substance P62. In contrast to AngII group, both low-dose and high dose CQ treatment produced lower blood pressure, thinned aortic vessel, alleviated fibrosis, lowered collagen I/III, more LC3B-II and P62 abundance. Moreover, high-dose CQ treatment showed better improvement than low-dose CQ treatment in terms of all the measurements mentioned above. **Conclusion:** CQ inhibited AngII induced murine aortic remodeling in a dose dependent manner, which might be mediated through inhibiting over-activated autophagy.

Keywords chloroquine; vascular remodeling; angiotensin II; autophagy

血管重塑是指血管壁对血管损伤、血流改变及血管老化等因素作出的一系列结构及功能改变^[1]。血管重塑在高血压^[2]、动脉粥样硬化^[3]、糖尿病性大血管病变、血管成型术后再狭窄^[4]等多种疾病的发生发展中发挥重要作用,但其机制尚未阐明。目前临床上除血管紧张素转换酶抑制剂外,仍缺乏有效对抗血管重塑的药物^[5]。氯喹(chloroquine, CQ)是一种经典的抗疟疾药,近年研究^[6-11]发现:CQ可调节免疫、对抗炎症反应、抑制自噬过度激活,对系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、癌症、艾滋病等疾病均有治疗作用。CQ还可减轻肺动脉高压,而血管重塑在肺动脉高压的发生、发展中发挥重要作用。但CQ在血管重塑中的作用尚不清楚。因此,本研究拟利用血管紧张素II(angiotensin II, AngII)诱导的小鼠血管重塑模型,观察CQ对血管重塑的作用,并从自噬角度探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

C57 BL/6小鼠购自北京维通利华公司。AngII购自大连美仑生物技术公司。1004型28 d微渗透泵购自美国Alzet公司。CQ、苏木精-伊红(HE)染液、三色(Masson)染色试剂盒购自美国Sigma-Aldrich公司。兔抗collagen I、兔抗collagen III、兔抗LC3B-I/II、小鼠抗P62及小鼠抗 β -tubulin抗体购自美国Abcam公司。辣根过氧化物酶标记驴抗兔及驴抗小鼠二抗购自美国Jackson ImmunoResearch公司。蛋白酶抑制剂、放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)缓冲液、

双辛丁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒及增强型化学发光试剂盒购自美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及处理

将32只8周龄雄性C57 BL/6小鼠随机分为4组(每组8只),分别为对照组、AngII处理组、AngII+CQ低剂量组及AngII+CQ高剂量组。对照组不做任何处理。AngII及CQ处理组均需AngII处理,具体方法为将AngII溶于无菌生理盐水(终浓度为4.3 mg/mL),取100 μ L注入到微渗透泵中,然后将装载有AngII的微渗透泵埋置到小鼠背部皮下。AngII以490 ng/(kg·min)(按小鼠平均体重22 g计算)剂量泵入小鼠皮下,并持续28 d。CQ低剂量组及高剂量组还需接受CQ处理,CQ低剂量与高剂量的选择参照既往研究^[12],具体方法为将CQ溶于无菌生理盐水(终浓度分别为2.2 mg/mL及11 mg/mL),每天腹腔注射100 μ L[按体重22 g计算,给药剂量分别为10 mg/(kg·d)及50 mg/(kg·d)]。实验观察周期为28 d。本研究经沈阳军区总医院实验动物伦理委员会审核批准。

1.2.2 小鼠血压及心率测量

在第0, 3, 7, 14, 21及28天,于固定时间用尾套法(Softron BP-2010,北京软隆生物技术有限公司)测定各组小鼠鼠尾血压及心率。血压及心率结果通过BPeditU 1.1.0.0软件(北京软隆生物技术有限公司)导出,并进行后续统计分析。

1.2.3 主动脉取材

第28天,血压测量结束后,脱颈处死小鼠,取小鼠全长主动脉。取升主动脉固定于4%多聚甲醛

溶液中用于组织学分析, 取胸主动脉保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱, 用于蛋白提取及Western印迹分析。

1.2.4 HE 染色及 Masson 染色

对固定后的主动脉组织, 进行常规石蜡包埋及切片。切片后脱蜡、水化, 进行常规HE染色, 乙醇脱水、二甲苯透明后封片。显微镜下观察血管形态。另外, 利用Masson三色染色试剂盒, 根据试剂盒操作步骤, 对切片进行Masson染色, 观察主动脉纤维化情况。

1.2.5 Western 印迹检测

取冻存的胸主动脉, 称重后剪成大小约 1 mm^3 的小块。置于冰冷的组织研磨器中, 加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液进行研磨。研磨后冰上放置20 min。12 000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心15 min, 取上清为所提蛋白。BCA法定测定蛋白浓度。按 $20\text{ }\mu\text{g}$ 上样, 根据分子量大小选择合适浓度的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。90 V湿转120 min, 将蛋白转印到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用含5%脱脂奶粉的TBS-T缓冲液室温封闭1 h。一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇晃孵育过夜。TBS-T洗3遍。二抗室温孵育1 h。用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)发光试剂盒在暗室显影。将显影的胶片扫描, 并用Quantity One v4.5(美国Bio-Rad公司)软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析进行多组间均数比较, 在方差齐性基础上采用

最小显著性差异(least significant difference, LSD)进行组内两两均数比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CQ 减轻 AngII 诱导的小鼠血压升高

对照组在各时间点血压没有明显变化。AngII处理组在第3天时, 收缩压较对照组显著升高, 在第14天收缩压达到高峰, 在第21及28天时收缩压维持在较高水平。CQ低剂量组和高剂量组收缩压在第3及第7天时较单纯AngII组均有降低趋势, 但差异无统计学意义。在第14天后, CQ低剂量及高剂量处理组收缩压较AngII组显著降低($P<0.05$), 且CQ高剂量组较低剂量降低更显著($P<0.05$), 但未降低到对照组水平(图1A)。各组小鼠心率无显著差别, 排除了心率对血压的影响(图1B)。

2.2 CQ 减轻 AngII 诱导的血管壁增厚及纤维化

HE及Masson染色结果示: 与对照组相比, AngII处理后小鼠主动脉管壁明显增厚, 纤维化增多。与AngII组相比, CQ低剂量及高剂量处理均能降低血管壁厚度及血管纤维化程度; 其中CQ高剂量组较低剂量组降低程度更明显(图2)。

Western印迹法检测主动脉中纤维化的标志collagen I/III的表达, 其变化趋势与Masson染色结果一致, 即AngII处理后collagen I及collagen III表达量明显增加, CQ低剂量可降低AngII处理后上述2种蛋白的表达水平, CQ高剂量组降低程度最明显(图3)。

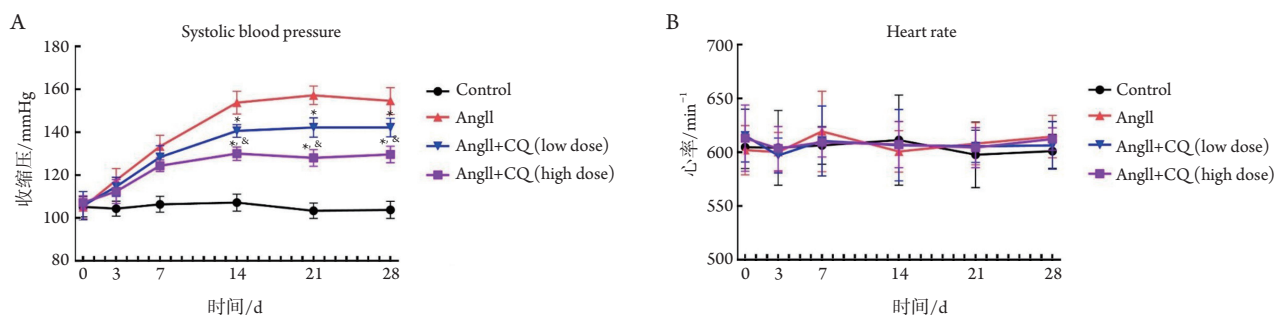


图1 CQ对AngII处理后小鼠收缩压(A)及心率(B)的影响

Figure 1 Effect of CQ on systolic blood pressure (A) and heart rate (B) in mice treated with AngII

与AngII组相比, $*P<0.05$; 与AngII+CQ低剂量组相比, $^{\&}P<0.05$ 。

Compared with the AngII group, $*P<0.05$; compared with AngII + CQ low-dose group, $^{\&}P<0.05$.

1 mmHg=0.133 kPa.

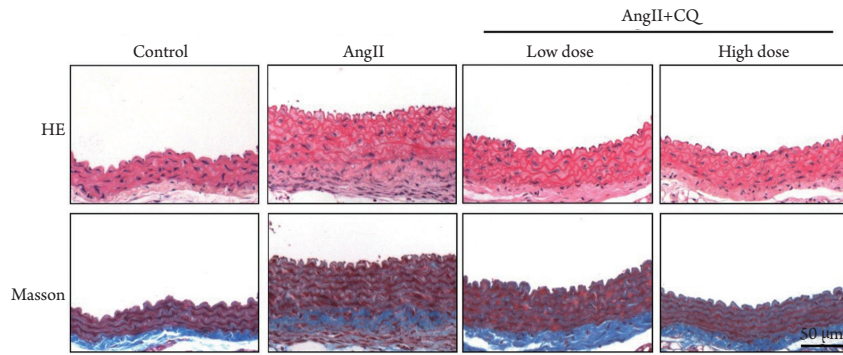


图2 HE及Masson染色评价CQ对AngII诱导的小鼠主动脉重构的影响

Figure 2 Effect of CQ in AngII induced mouse aortic remodeling assessed by HE and Masson's staining

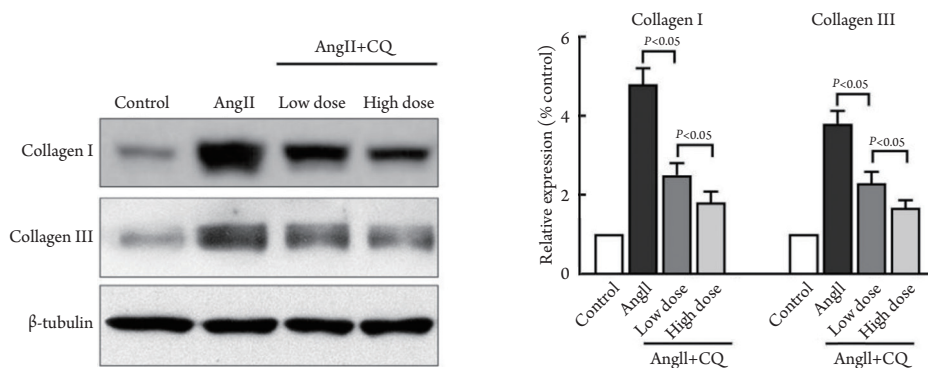


图3 Western印迹评价CQ对AngII处理后小鼠主动脉胶原蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of CQ in AngII induced collagen expression in mouse aorta assessed by Western blot

2.3 CQ 抑制 AngII 诱导的主动脉自噬过度激活

与对照组相比, AngII处理组主动脉中自噬发生标志物LC3B-II表达增加, 而自噬底物P62表达降低, 表明AngII处理后血管中自噬过度激活。与

AngII组相比, 低剂量CQ处理后LC3B-II及自噬底物P62均升高, 表明CQ可抑制自噬过度激活。与CQ低剂量组相比, CQ高剂量组LC3B-II及P62水平进一步升高(图4)。

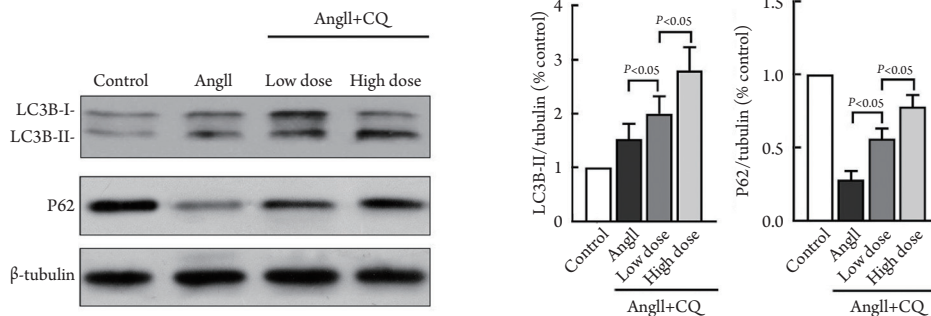


图4 Western印迹评价CQ对AngII处理后小鼠主动脉自噬流的影响

Figure 4 Effect of CQ in AngII induced autophagy flux in mouse aorta assessed by Western blot

3 讨论

本研究采用经典的AngII[490 ng/(kg·d)]^[13-15]持续皮下泵入方法制备小鼠血管重塑模型,发现AngII处理后小鼠血压升高、主动脉管壁增厚、主动脉纤维化增加,表明模型构建成功。血管重构的发生机制目前仍不清楚,但有研究^[16]表明自噬过度激活可能在血管重构中发挥重要作用。

自噬是指细胞将自身的长寿命蛋白质或受损细胞器等运送到溶酶体,在溶酶体中降解并被细胞重新利用的过程,是维持细胞存活的基本生理功能之一^[17]。根据被降解物质进入溶酶体的方式不同,自噬可分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。通常所说的自噬是指巨自噬^[18]。自噬发生时,首先由双层膜结构的小泡包裹一部分细胞质形成自噬体,继而自噬体与溶酶体或晚期内体融合形成自噬溶酶体,发挥降解功能,这一动态过程被成为自噬流。在评价自噬时,不仅要检测自噬发生标志物微管相关蛋白1轻链3(LC3II),还要检测自噬降解底物P62水平,才能反映自噬流是否通畅^[19]。本研究发现:AngII处理后小鼠主动脉中自噬过度激活,表现为LC3B-II增加而P62降低,这与Yu等^[16]在AngII诱导的大鼠血管重构模型中的发现相符。提示抑制自噬过度激活可能成为血管重构的治疗靶点^[20]。

CQ是一种很早就应用于临床的抗疟疾药物。CQ及其类似物具有抗炎及调节免疫等多种非抗疟作用,目前已被用于系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等疾病的治疗^[8]。此外,CQ可通过破坏溶酶体酸性环境抑制溶酶体功能,而溶酶体是自噬的最终效应细胞器,因此CQ也是一种经典的自噬抑制剂^[21-23]。本研究发现:CQ可剂量依赖性地抑制AngII诱导的血压升高及血管重塑;进一步检测血管自噬情况发现,CQ可抑制AngII诱导的自噬过度激活,表现为LC3B-II与P62表达增加。LC3B-II增加有两种情况,一种是自噬激活,自噬体形成增多;另一种是自噬受到抑制,自噬流受阻,LC3B-II不能降解^[19]。CQ处理后,自噬的终末环节受到抑制,LC3-II及P62的降解减少,因此表现为LC3-II及P62均增高。

本研究的不足之处在于:研究对象主要为动物,而主动脉中包括内皮细胞、血管平滑肌细胞、血管外膜成纤维细胞及巨噬细胞等多种成分,CQ通过哪一种或哪几种细胞发挥作用、CQ发挥作用的具体分子机制等问题仍有待在今后的研究中深入探讨。

综上所述,本研究在动物水平发现CQ具有对抗血管重构的作用,并初步探讨了其自噬机制,可为CQ的抗疟以外作用提供实验依据,并可能为未来拓展CQ适应症及开发新的血管重塑治疗药物提供新的靶点。

参考文献

1. Tanaka LY, Laurindo FRM. Vascular remodeling: a redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 109: 11-21.
2. Montezano AC, Tsiropoulou S, Dulak-Lis M, et al. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(5): 425-433.
3. Papafaklis MI, Koskinas KC, Chatzizisis YS, et al. In-vivo assessment of the natural history of coronary atherosclerosis: vascular remodeling and endothelial shear stress determine the complexity of atherosclerotic disease progression[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2010, 25(6): 627-638.
4. García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, et al. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 110-120.
5. Zhang Z, Chen L, Zhong J, et al. ACE2/Ang-(1-7) signaling and vascular remodeling[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(8): 802-808.
6. Plantone D, Koudriavtseva T. Current and future use of chloroquine and hydroxychloroquine in infectious, immune, neoplastic, and neurological diseases: a mini-review[J]. *Clin Drug Investig*, 2018, Epub ahead of print.
7. An N, Chen Y, Wang C, et al. Chloroquine autophagic inhibition rebalances Th17/Treg-mediated immunity and ameliorates systemic lupus erythematosus[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1): 412-422.
8. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, et al. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases[J]. *Inflammopharmacology*, 2015, 23(5): 231-269.
9. Savarino A, Shytaj IL. Chloroquine and beyond: exploring anti-rheumatic drugs to reduce immune hyperactivation in HIV/AIDS[J]. *Retrovirology*, 2015, 12: 51.
10. Wu K, Zhang Q, Wu X, et al. Chloroquine is a potent pulmonary vasodilator that attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(22): 4155-4172.
11. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(3): 297-309.
12. Moore BR, Page-Sharp M, Stoney JR, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and allometric scaling of chloroquine in a murine malaria model[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(8):

- 3899-3907.
13. Ji H, Pai AV, West CA, et al. Loss of resistance to angiotensin II-induced hypertension in the Jackson laboratory recombination-activating gene null mouse on the C57BL/6J background[J]. *Hypertension*, 2017, 69(6): 1121-1127.
 14. Bersi MR, Bellini C, Wu J, et al. Excessive adventitial remodeling leads to early aortic maladaptation in angiotensin-induced hypertension[J]. *Hypertension*, 2016, 67(5): 890-896.
 15. Ebersson LS, Sanchez PA, Majeed BA, et al. Effect of lysyl oxidase inhibition on angiotensin II-induced arterial hypertension, remodeling, and stiffness[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124013.
 16. Yu KY, Wang YP, Wang LH, et al. Mitochondrial KATP channel involvement in angiotensin II-induced autophagy in vascular smooth muscle cells[J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(4): 416.
 17. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349-364.
 18. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5): 521-527.
 19. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
 20. Ibrahim YF, Shults NV, Rybka V, et al. Docetaxel reverses pulmonary vascular remodeling by decreasing autophagy and resolves right ventricular fibrosis[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 363(1): 20-34.
 21. Li P, Hao L, Guo YY, et al. Chloroquine inhibits autophagy and deteriorates the mitochondrial dysfunction and apoptosis in hypoxic rat neurons[J]. *Life Sci*, 2018, 202: 70-77.
 22. Qu X, Sheng J, Shen L, et al. Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173712.
 23. Ye H, Chen M, Cao F, et al. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16(1): 178.

本文引用: 田孝祥, 赵晓杰, 刘丹, 张艳, 屈莉莉, 吴鹏, 何廉旗. 氯喹在血管紧张素II诱导的小鼠血管重塑中的作用[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(8): 1595-1600. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.001

Cite this article as: TIAN Xiaoxiang, ZHAO Xiaojie, LIU Dan, ZHANG Yan, QU Lili, WU Peng, HE Lianqi. Effect of chloroquine in angiotensin II induced vascular remodeling in mice[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(8): 1595-1600. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.001