

葛根通脉饮调控 BIP 蛋白表达抗动脉粥样硬化的作用

呼海涛, 徐学琴, 沈晓君*
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**研究葛根通脉饮对高同型半胱氨酸诱导增殖的兔主动脉血管平滑肌细胞内质网应激相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chains binding protein, BIP)表达的影响,探讨其抗动脉粥样硬化的机制。**方法:**30只大耳白兔随机分为空白组、高脂组、可定组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、葛根通脉饮低、高剂量组($5, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。空白组给予普通饲料饲喂,高脂组在普通饲料中加入2%胆固醇及0.02%蛋氨酸,可定组在高脂饲料喂养同时加入可定,葛根通脉饮高、低剂量组在高脂饲料的基础上加入不同剂量的葛根通脉饮药物,药物均采用 ig 给药。饲喂9周后,全自动生化仪测定各组血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL);胸主动脉切片病理学检查,Western blot法检测BIP蛋白的表达量。**结果:**与空白组比较,高脂组血清TC, TG, LDL, Hcy水平升高, HDL水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);与高脂组相比,可定组及葛根通脉饮两个剂量组血清TC, TG, LDL, Hcy水平降低, HDL水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,高脂组主动脉组织BIP蛋白表达明显上调($P < 0.01$),与高脂组比较,可定及葛根通脉饮两个剂量均能下调主动脉组织BIP蛋白表达($P < 0.05$)。病理学检验结果显示,可定及葛根通脉饮两个剂量均能明显延缓兔动脉粥样硬化病变进展。**结论:**葛根通脉饮有抗动脉粥样硬化的作用,其作用机制之一与调控BIP蛋白表达密切相关。

[关键词] 葛根通脉饮; 动脉粥样硬化; 免疫球蛋白重链结合蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0150-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010150

Effect of Gegen Tongmai Yin on Preventing Atherosclerosis by Down-regulating BIP Protein Expression

HU Hai-tao, XU Xue-qin, SHEN Xiao-jun* (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Gegen Tongmai Yin on vascular smooth muscle cells proliferation and immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP) expression of endoplasmic reticulum stress gene in homocysteine-induced rabbits, and to explore its preventive mechanism on atherosclerosis. **Method:** Thirty rabbits were randomly divided into five groups: normal group, high-fat diet model group, rosuvastatin group ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), low-and high-dose Gegen Tongmai Yin group ($5, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Each group was given the corresponding diet and drug. After nine weeks, the serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL) were detected by enzymatic assays. Pathological change and BIP expression of vascular were detected. **Result:** Compared to high-fat diet model group, plasma TC, TG, LDL in rosuvastatin group and Gegen Tongmai Yin group were decreased, while plasma HDL was increased with significant difference ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared to high-fat diet model group, BIP expression was down-regulated in rosuvastatin group, low-and high-dose Gegen Tongmai Yin group with significant difference ($P < 0.05, P < 0.01$). Pathological result indicated that Gegen Tongmai Yin could inhibited the development of atherosclerosis. **Conclusion:** Gegen Tongmai Yin could prevent atherosclerosis, which is related to the regulation of BIP expression.

[Key words] Gegen Tongmai Yin; atherosclerosis; immunoglobulin heavy chains binding protein

[收稿日期] 20140624(001)

[基金项目] 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A310612);河南省基础与前沿技术研究项目(072300450030);郑州市科技创新团队资助项目(121PCXTD520)

[第一作者] 呼海涛,副教授,从事心血管疾病基础及临床研究, Tel:13598803663, E-mail:hht6@hactcm.edu.cn

[通讯作者] * 沈晓君,教授,从事心血管疾病中医药防治研究, Tel:13526669581, E-mail:shenxiaojun0628@163.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是最常见的心血管疾病之一,现已公认脂质代谢紊乱、血管内皮细胞功能损伤、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增生迁移是 AS 发生发展过程的关键环节^[1-2]。有研究表明,中药葛根的有效成分葛根素具有促进心肌血液循环,防止血栓形成,保护动脉血管内皮细胞的作用^[3]。它可以抑制炎症介质的产生和释放,改善微循环,抗氧化应激损伤,调节细胞凋亡,从而发挥心脏保护的作用,因此在心血管疾病的防治中有较广泛的应用^[4]。而淫羊藿因其在心血管疾病尤其是 AS 治疗方面的多种药理活性,有较高的药用价值。研究发现,淫羊藿的有效单体淫羊藿苷具有调节血脂,抑制血小板聚集、保护动脉血管内皮细胞,拮抗高同型半胱氨酸引起的血管平滑肌异常增殖等良好的抗 AS 作用^[5]。淫羊藿总黄酮也具有防止血管内皮细胞损伤的作用^[6]。但目前鲜有将葛根与淫羊藿组方来治疗 AS 的报道。笔者即以葛根和淫羊藿为主药,辅以山楂、太子参等药物组成葛根通脉饮,通过观察该药物对高脂及高同型半胱氨酸(homocysteinemia, Hcy)诱导的兔主动脉粥样硬化病变及 VSMC 内质网应激(endoplasmicreticulum stress, ERS)相关基因免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chains binding protein, BIP)表达及血脂水平的影响,探讨葛根通脉饮抗 AS 的机制,为该药防治心血管疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 30 只日本雄性大耳白兔,5 月龄,体重为 2~2.5 kg,普通级,购自河南康达实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(豫)2010-0001。

1.2 药品及试剂 葛根通脉饮药方组成:葛根 30 g,山楂 15 g,太子参 12 g,当归尾 6 g,淫羊藿 6 g,赤芍 6 g,川芎 6 g,甘草 6 g;ZG-280 型全自动中药煎药机煎取药汁作为试验用葛根通脉饮药物。瑞舒伐他汀(可定,英国阿斯利康制药有限公司,批号 115720),胆固醇(美国 Amresco 公司,批号 0443),L-蛋氨酸(美国 Amresco 公司,批号 1112c321),苏木素、伊红购自北京恒业中远化工有限公司。

1.3 仪器 JY-SCZ 双垂直电泳仪(北京东方电泳设备有限公司),SM2000R 冰冻切片机、Leica DMR 病理成像系统(德国 Leica 公司),DHG-9078A 恒温箱(上海跃进医疗器械厂),XS2-D 倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司),DYCZ-40D 转膜仪(北京市六一仪器厂),Alpha mager 2200 紫外线成像仪(美国

Alpha Innotech Corporation 公司),7020 型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 适应性喂养 3 d 后,将 30 只雄性大耳白兔随机分为空白组、高脂组、可定组、葛根通脉饮低、高剂量组,每组 6 只,单笼喂养。空白组饲喂普通饲料,高脂组在普通饲料中加入 2% 胆固醇及 0.02% 蛋氨酸,可定组在高脂饲料喂养同时,给予可定 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig,葛根通脉饮低、高剂量组在高脂饲料喂养的同时给予葛根通脉饮 $5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,空白组、高脂组给予同等量的生理盐水 ig。

2.2 血脂水平检测 饲喂 9 周后,抽取空腹 12 h 静脉血,离心分离血清,采用全自动生化分析仪检测各组血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL)及高同型半胱氨酸(Hcy)。

2.3 病理组织学检查 饲喂 9 周后,ip 4% 戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,麻醉后仰卧位固定于手术台上,左胸前区备皮后常规消毒,在剑突上方 2 cm 处正中位用手术刀切开胸骨,沿胸骨正中向上用剪刀延长切口约 10 cm,用乳突牵开器轻轻牵开肋骨,暴露心脏。用眼科剪将心包前部剪开,可见胸主动脉,快速截取胸主动脉上段,部分至液氮罐($-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中保存。其余生理盐水洗净,10% 中性甲醛液固定,乙醇脱水,石蜡包埋,均匀切片,厚度为 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 。苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察胸主动脉组织形态学变化。

2.4 Western blot 取各组兔胸主动脉,剥除外膜的纤维脂肪层,用眼科剪沿血管外侧纵向剪开,在 Hanks 液中漂洗 3 次。将血管内膜面向上,铺于小木板上,用刀片自上而下刮除内皮细胞。将组织剪碎、匀浆,提取总蛋白质,BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度,常规电泳,转膜,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,以不同稀释比例的 BIP 一抗稀释液 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min。加 1:3 000 HRP 标记的二抗稀释液室温孵育 2 h。洗涤后用化学发光成像仪显影,使用软件分析条带灰度值。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间的比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对兔血脂水平的影响 与空白组比较,高脂组

的血清 TC, TG, LDL 及 Hcy 水平显著升高, HDL 显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与高脂组比较, 可定组及

葛根通脉饮组的血清 TC, TG, LDL 及 Hcy 均有所下降, HDL 水平升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 葛根通脉饮对兔血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

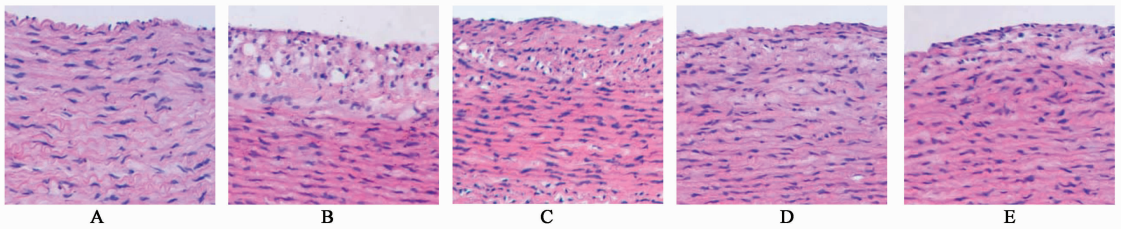
Table 1 Effect of Gegen Tongmai Yin on rabbit serum fat level ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | TC/ $mmol \cdot L^{-1}$ | TG/ $mmol \cdot L^{-1}$ | HDL/ $mmol \cdot L^{-1}$ | LDL/ $mmol \cdot L^{-1}$ | Hcy/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ |
|-------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 空白 | - | 1.71 \pm 0.09 | 0.52 \pm 0.03 | 1.76 \pm 0.17 | 0.79 \pm 0.09 | 5.31 \pm 0.12 |
| 高脂 | - | 8.95 \pm 0.17 ²⁾ | 1.78 \pm 0.07 ¹⁾ | 0.68 \pm 0.09 ¹⁾ | 6.98 \pm 0.22 ²⁾ | 21.36 \pm 0.15 ²⁾ |
| 可定 | 1×10^{-3} | 6.08 \pm 0.14 ³⁾ | 0.82 \pm 0.02 ³⁾ | 1.16 \pm 0.10 ³⁾ | 5.11 \pm 0.16 ³⁾ | 14.98 \pm 0.09 ³⁾ |
| 葛根通脉饮 | 5 | 6.01 \pm 0.15 ³⁾ | 0.81 \pm 0.03 ³⁾ | 1.39 \pm 0.15 ³⁾ | 5.19 \pm 0.18 ³⁾ | 13.22 \pm 0.11 ³⁾ |
| | 10 | 4.05 \pm 0.11 ⁴⁾ | 0.49 \pm 0.01 ⁴⁾ | 1.64 \pm 0.17 ³⁾ | 4.35 \pm 0.12 ³⁾ | 11.04 \pm 0.12 ⁴⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与高脂组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 病理组织学检查 光镜下空白组动脉内膜光滑, 内皮细胞完整、连接紧密; 高脂组主动脉内膜增厚, 不光滑, 内膜下可见大量脂质和泡沫细胞聚集, 形成 AS 斑块, 内皮细胞有明显脱落和缺失, 并可见中膜的 VSMC 向内膜迁移、增殖; 可定组血管内皮细

胞轻度损伤, AS 斑块较高脂组减轻, 可见少量泡沫细胞, 有少数 VSMC 向内膜迁移; 葛根通脉饮低、高剂量组仅见个别内皮细胞损伤及少量泡沫细胞, 未见明显 AS 斑块, 与高脂组比较 AS 病变明显减缓。见图 1。



A. 空白组; B. 高脂组; C. 可定 $1 mg \cdot kg^{-1}$ 组; D. 葛根通脉饮 $5 g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 葛根通脉饮 $10 g \cdot kg^{-1}$ 组 (图 2 同)

图 1 各组兔主动脉组织变化

Fig. 1 The changes of rabbit aortic tissues in different group (HE, $\times 100$)

3.3 对兔血管平滑肌细胞 BIP 蛋白表达的影响 与空白组比较, 高脂组主动脉组织 BIP 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.01$); 与高脂组相比, 可定组、葛根通脉饮组主动脉组织 BIP 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 2。

表 2 葛根通脉饮对兔 VSMC BIP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Gegen Tongmai Yin on BIP protein expression levels in rabbit vascular smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | BIP/ β -actin |
|-------|-----------------------|-------------------------------|
| 空白 | - | 0.21 \pm 0.11 |
| 高脂 | - | 1.19 \pm 0.14 ²⁾ |
| 可定 | 1×10^{-3} | 0.68 \pm 0.12 ³⁾ |
| 葛根通脉饮 | 5 | 0.63 \pm 0.13 ³⁾ |
| | 10 | 0.60 \pm 0.12 ³⁾ |

4 讨论

Hcy 是蛋氨酸代谢的中间产物, 高 Hcy 血症是 AS 独立的危险因素之一。研究发现, Hcy 可引发脂

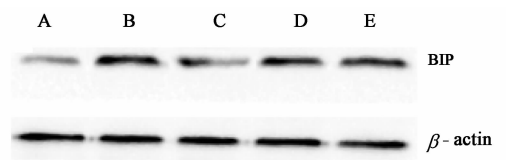


图 2 各组兔主动脉 BIP 蛋白表达水平

Fig. 2 The BIP protein expression level of rabbit aortic tissues in different group

质过氧化, 损伤血管内皮细胞, 促进血管平滑肌细胞增殖, 使血小板的黏附性和聚集性增加, 促使 AS 的发生^[7]。并且高 Hcy 血症会打破内质网的稳态, 导致蛋白质折叠障碍或错误折叠, 进而触发 ERS, 导致脂质异常沉积, 从而引起 AS^[8-9]。BIP 是 ERS 早期就迅速表达量增加的一种应激蛋白, 在 ERS 时作为分子伴侣参与蛋白质的糖基化修饰、折叠和转运, 帮助变性蛋白进行重新折叠, 恢复蛋白质的正确构象, 缓解 ERS, 同时将无法恢复的蛋白质转移降解, 避免

细胞进一步受到伤害。当 ERS 时间过长时,内质网功能失代偿,BIP 表达开始下降,同时细胞启动内质网相关凋亡程序,导致细胞死亡^[10-11]。本研究中采用胆固醇加蛋氨酸的高脂饮食饲喂兔,9 周后高脂组兔的 Hcy 水平显著升高,同时血脂水平发生了相应的变化,表现为血清总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白水平升高,高密度脂蛋白降低,镜下主动脉呈现出典型的 AS 病理变化,均提示获得了 AS 模型。且高脂组 BIP 蛋白表达量较空白组均显著增加,提示 ERS 在 AS 的发病机制中发挥着重要作用。

葛根素是中药葛根的有效成分之一,研究发现葛根素对 Hcy 损伤的血管内皮细胞有保护作用。淫羊藿可拮抗 Hcy 诱导的 VSMC 过度增殖,促进其凋亡,并具有降低血脂,保护血管内皮细胞等作用^[12]。本研究中,将葛根和淫羊藿为主药的中药复方制剂葛根通脉饮用于 AS 兔实验研究,方中葛根通利血脉,升阳解痉为君;山楂、赤芍、川芎补气活血化瘀,疏通脉络为臣;当归补血养血,淫羊藿、太子参温肾助阳,为佐药;炙甘草补脾和胃,益气复脉,调和诸药为使。实验结果显示,相较于高脂组和可定组,葛根通脉饮药物组 AS 病变发展延缓。相较于高脂组,经葛根通脉饮药物饲喂后,兔血清总 TC、TG 及 LDL 及 Hcy 水平显著降低,而 HDL 有所升高,均证实葛根通脉饮具有治疗 AS 的作用。葛根通脉饮药物组 BIP 蛋白表达量较高脂组降低,提示葛根通脉饮可抑制 Hcy 所致的兔主动脉组织 ERS,从而发挥抗 AS 的作用,BIP 蛋白表达可能是葛根通脉饮抗 AS 的作用靶点之一。

[参考文献]

[1] 丁绍祥. 脂质代谢失调作为慢性应激原致动脉粥样硬化的发病机制[J]. 中国老年学杂志, 2011, 17(11):2154-2159.

[2] 龙盼,张俊峰. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化[J]. 国际心血管病杂志, 2011, 38(2):79-83.

[3] 韩春妍. 葛根素治疗相关疾病的研究[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(3):178-180.

[4] 崔书霞,田炜,郝志梅. 葛根素对心脏疾病的保护作用[J]. 广东医学, 2013, 34(7):1139-1140.

[5] 何航,沈晓君,冯黎. 淫羊藿苷对动脉粥样硬化兔动脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中医研究, 2009, 36(12):15-17.

[6] 裴志芳,夏珂,高琪乐,等. 淫羊藿总黄酮对 LPC 诱导内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中南药学, 2009, 7(6):410-412.

[7] 徐倩,曹凯. 高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化机制的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(1):81-84.

[8] 闵敏,陈东风,王军,等. 葡萄糖调节蛋白 78 在大鼠非酒精性脂肪性肝炎中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1):79-81.

[9] Schroder M, Sutcliffe L. Consequences of stress in the secretory pathway: the ER stress response and its role in the metabolic syndrome[J]. Methods Mol Biol, 2010, 648:43-62.

[10] Meares G P, Zmijewska A A, Jope R S. HSP105 interacts with GRP78 and GSK3 and promotes ER stress-induced caspase-3 activation [J]. Cell Signal, 2008, 20(2):347-358.

[11] 吴逸园,杨业鹏,李载权. 葡萄糖调节蛋白 78 研究进展[J]. 生理科学进展, 2009, 40(2):135-141.

[12] 王东芝,李东万,张守刚,等. 淫羊藿在心血管疾病方面的研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(1):107-110.

[责任编辑 周冰冰]