

# 藤茶双氢杨梅素对动脉粥样硬化大鼠的炎症因子及主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A 表达的影响

梁柱第<sup>1</sup>, 曾宪彪<sup>2</sup>, 韦桂宁<sup>2\*</sup>, 何飞<sup>2</sup>, 吕纪华<sup>2</sup>, 苏华<sup>2</sup>, 韦宝伟<sup>2</sup>

(1. 广西壮族自治区药品不良反应监测中心, 南宁 530022;

2. 广西中医药研究院, 南宁 530022)

**[摘要]** 目的:探讨藤茶双氢杨梅素对动脉粥样硬化(AS)大鼠血清炎症因子水平和 II A 分泌型血小板型磷脂酶 A<sub>2</sub> (secretory phospholipase A<sub>2</sub> of group II A, sPLA<sub>2</sub>-II A) mRNA 表达的影响,以了解藤茶双氢杨梅素对 AS 的作用机制。方法:取健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,随机分为 5 组,即正常组、模型组、辛伐他汀组(5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、及藤茶双氢杨梅素低、高剂量组(10, 40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组 12 只,除正常组大鼠喂以基础饲料外,其他组给大鼠饲养高脂饲料,并 ip 维生素 D<sub>3</sub>,复制 AS 模型,给药组 ig 给予相应药物,正常组与模型组给予等体积的生理盐水,连续 24 周后,观察藤茶双氢杨梅素对模型大鼠血清 C-反应蛋白(CRP),血清肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和白细胞介素-1(IL-1)的水平,RT-PCR 观察主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 表达的变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠血管管壁增厚,内皮粗糙,中膜平滑肌纤维明显增生,大鼠血清 CRP, TNF-α 和 IL-1 水平明显增高(P<0.05, P<0.01),主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 的表达明显增强(P<0.01);与模型组比较,藤茶双氢杨梅素低剂量组大鼠血管病变范围及内膜增厚程度略有减轻,高剂量组大鼠血管仅见局部内皮粗糙,内膜光滑,中膜平滑肌纤维轻度增生,藤茶双氢杨梅素高剂量组可明显降低 AS 大鼠血清 CRP 和 IL-1 水平(P<0.05),能显著降低 AS 大鼠主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 的表达(P<0.05)。结论:藤茶双氢杨梅素对 AS 具有一定的防治作用,其作用机制是通过改善 AS 大鼠炎症因子水平,抑制 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 的表达。

**[关键词]** 藤茶双氢杨梅素; 动脉粥样硬化; 炎症因子; II A 分泌型血小板型磷酸酶 A<sub>2</sub>

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0120-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040120

**Effect of Dihydromyricetin on Inflammatory Factors and sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA Expression of Aortic Arch in Atherosclerosis Rats** LIANG Zhu-di<sup>1</sup>, ZENG Xian-biao<sup>2</sup>, WEI Gui-ning<sup>2\*</sup>, HE Fei<sup>2</sup>, LYU Ji-hua<sup>2</sup>, SU Hua<sup>2</sup>, WEI Bao-wei<sup>2</sup> (1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Adverse Drug Reaction Monitoring Center, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of dihydromyricetin of *Ampelopsis grossedentata* on inflammatory factors and secretory phospholipase A<sub>2</sub> of group II A (sPLA<sub>2</sub>-II A) mRNA expression of aortic arch in atherosclerosis rats. **Method:** Sixty rats were randomly divided into the control group, the model group, the simvastatin group (5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and the high-, low-dose dihydromyricetin groups (40, 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). The atherosclerosis model was induced by feeding a high fat diet and injecting vitamin D<sub>3</sub> except rats in the control group. After 24 weeks, the serum C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-1 (IL-1) and sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA expression of the aortic arch were observed. **Result:** Compared with the normal group, the thickened blood vessel wall, rough endothelial and marked hyperplasia of the smooth muscle fiber were found in the model group. Besides, levels of serum CRP, TNF-α, IL-1 and sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA expression were remarkably increased in the model group (P<0.01). Compared with the model group, the area of vascular lesions and the thickened blood vessel wall were slightly improved in the low-dose dihydromyricetin group. Moreover, the

**[收稿日期]** 20140630(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360653);广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018258);广西中管局中医药科技专项基金项目(GZKZ0948)

**[第一作者]** 梁柱第,主管药师,从事药品不良反应监测和安全性评价研究, Tel:0771-5884912, E-mail:liangzhudi@163.com

**[通讯作者]** \* 韦桂宁, 硕士, 副主任药师, 从事中药药理学与毒理学研究, Tel:0771-5869102, E-mail:weiguiqing2004@163.com

local rough endothelial, smooth endomembrane and mild hyperplasia of the smooth muscle fiber were found in the high-dose dihydromyricetin group. The serum levels of CRP and IL-1 decreased significantly in the high-dose dihydromyricetin group, sPLA<sub>2</sub>-IIA mRNA expression was inhibited in the high-and low-dose dihydromyricetin group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dihydromyricetin has good therapeutic effect on atherosclerosis rats. Its mechanism may be related to reducing inflammatory factors level and inhibiting sPLA<sub>2</sub>-IIA mRNA expression of aortic arch.

[**Key words**] dihydromyricetin; atherosclerosis; inflammatory factors; sPLA<sub>2</sub>-IIA

广西藤茶双氢杨梅素是从广西瑶族藤茶 *Ampelopsis grossedntata* 的茎叶中提取的活性成分<sup>[1]</sup>。研究表明,藤茶双氢杨梅素对心血管疾病具有良好的治疗作用,能降低小鼠血脂,增强机体抗氧化能力,能预防性对抗超氧阴离子自由基引起的氧化性损伤<sup>[2-4]</sup>。前期研究结果表明,藤茶总黄酮可改善动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)大鼠血脂水平和血液流变学,对 AS 具有一定的防治作用<sup>[5]</sup>。双氢杨梅素为藤茶总黄酮的主要成分之一,这提示,双氢杨梅素可能具有抗 AS 的药理活性,具有开发成为抗 AS 新药的良好前景。为研究藤茶总黄酮抗 AS 的物质基础,及进一步观察藤茶双氢杨梅素对 AS 作用机制,本研究采用高脂饲料及维生素 D<sub>3</sub> 法,复制 AS 大鼠模型,观察藤茶双氢杨梅素对 AS 大鼠炎症因子,IIA 分泌型血小板型磷脂酶 A<sub>2</sub> (secretory phospholipase A<sub>2</sub> of group II A, sPLA<sub>2</sub>-IIA) mRNA 表达的影响,为临床治疗 AS 提供一定的实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠,雄性,SPF 级,体重 130 ~ 150 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(桂)2009-2002。

**1.2 药物及试剂** 藤茶双氢杨梅素(本单位自制,纯度 98%,给药剂量根据已报道的文献及预实验的结果而定),辛伐他汀片(湖北恒安药业有限公司,批号 120301),维生素 D<sub>3</sub> 注射液(上海第九制药厂,批号 070603),C 反应蛋白(CRP)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20120323),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 201205),白细胞介素-1(IL-1)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司,批号 2012045),总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司,批号 28218),RT-PCR 试剂盒、DNA 标志物(宝生物工程有限公司,批号分别为 00145165,00129355),其他试剂均为分子生物学专用试剂。

**1.3 仪器** Thermal Cycler HBPXE 02220 型 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司),Universal32R 型台式离心机(德国 Hettich Zentrifugen 公司),MK-20 型干

式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司),EC105 型电泳仪(美国 IEC 公司),722 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

**1.4 引物设计与合成** 大鼠 sPLA<sub>2</sub>-IIA 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的引物自行设计,由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

## 2 方法

**2.1 模型建立及给药**<sup>[6]</sup> 取大鼠 60 只,适应性喂养 1 周,随机分为 5 组:正常组、模型组、辛伐他汀组、及藤茶双氢杨梅素低、高剂量组,每组 12 只,除正常组喂以基础饲料外,其他各组按文献[6]方法建立模型,一次性 ip 维生素 D<sub>3</sub> 60 万单位/kg,喂以高脂饲料(组成为猪油 10%,胆固醇 5%,蛋黄粉 5%,胆酸钠 0.5%,丙基硫氧嘧啶 0.2%,基础饲料 79.3%)。造模开始,正常组和模型组每天 ig 等体积蒸馏水,辛伐他汀组按 5 mg·kg<sup>-1</sup>,藤茶双氢杨梅素低、高组(10,40 mg·kg<sup>-1</sup>),每天 ig 给药 1 次,自由进食与进水,连续 24 周。

**2.2 样品制备及检测** 末次给药前禁食 12 h,给药 1 h 后以水合氯醛麻醉动物,开腹,腹主动脉采血,分离血清,按试剂盒所示方法测定 CRP, TNF- $\alpha$  及 IL-1 的含量。分离主动脉弓,留待病理染色观察及 RT-PCR 检测 sPLA<sub>2</sub>-IIA mRNA 表达。

**2.3 RT-PCR 检测 sPLA<sub>2</sub>-IIA mRNA** 用 Trizol 提取主动脉弓总 RNA,然后用紫外分光光度计测定其纯度并定量,逆转录合成 cDNA。以  $\beta$ -actin 为内参,进行半定量逆转录聚合酶链反应。序列为 sPLA<sub>2</sub>-IIA,上游 5'-CATGAAGTCTCCTGTTGCT-3'下游 5'-GTGTTAGAGGATGTCTGGATG-3',其扩增产物长度为 386 bp。内参  $\beta$ -actin,上游 5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3',下游 5'-TAGAAGCATTGCGGTGGAC-3',其扩增产物长度 288 bp。sPLA<sub>2</sub>-IIA 的反应条件为 94 °C 预变性 4 min 后,94 °C 变性 1 min,57 °C 退火 1 min,71 °C 延伸 1 min,共进行 30 次循环,最后再 72 °C 延伸 5 min,4 °C 冷却终止反应。聚合酶链反应产物用溴化乙锭的 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。用凝胶扫描分析系统分别对 sPLA<sub>2</sub>-IIA

进行吸光度扫描。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 11.0 系统软件处理, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠体重的影响** 造模后第 12, 24 周, 和正常组比较, 模型组大鼠体重明显降低 ( $P < 0.01$ )。和模型组比较, 各给药组大鼠的体重无明显影响。见表 1。

表 1 藤茶双氢杨梅素对 AS 大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effects of dihydromyricetin on body weight of atherosclerosis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	体重/g		
		0 周	12 周	24 周
正常	-	275 ± 47	446 ± 62	528 ± 114
模型	-	281 ± 35 <sup>2)</sup>	231 ± 74 <sup>2)</sup>	198 ± 69 <sup>2)</sup>
辛伐他汀	5	278 ± 32	242 ± 105	212 ± 88
藤茶双氢	40	281 ± 42	239 ± 93	207 ± 65
杨梅素	10	277 ± 38	236 ± 101	201 ± 92

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

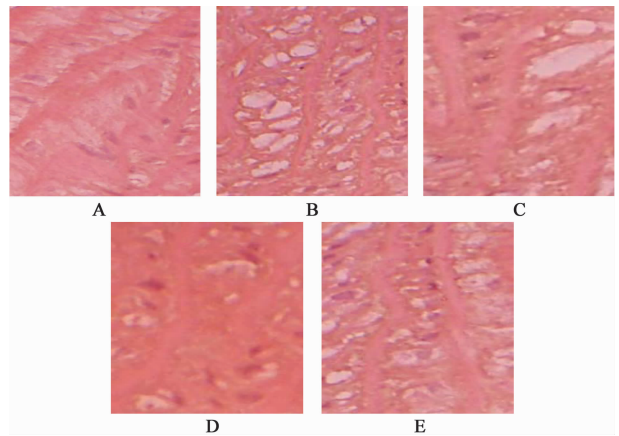
**3.2 对 AS 大鼠主动脉弓病理改变的影响** 正常组内皮及内膜光滑; 模型组大鼠主动脉管壁呈弥漫性隆起, 内膜明显增厚, 斑块内可见大量泡沫细胞及多层排列, 内皮细胞缺失或不连续, 中膜平滑肌增生; 藤茶双氢杨梅素低剂量组大鼠血管管壁增厚, 内皮粗糙, 中膜平滑肌纤维明显增生, 病变范围及内膜增厚程度略有减轻; 藤茶双氢杨梅素高剂量组大鼠血管仅见局部内皮粗糙, 内膜光滑中膜平滑肌纤维轻度增生。见图 1。

**3.3 对 AS 大鼠血清 CRP, TNF- $\alpha$  和 IL-1 水平的影响** 与正常组比较, 模型组大鼠 CRP, TNF- $\alpha$ , IL-1 水平显著高于正常组 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 提示 AS 模型造模成功; 与模型组比较, 藤茶双氢杨梅素高剂量组可显著降低血清 CRP 和 IL-1 水平 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.4 对 AS 大鼠主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 表达的影响** 饲养高脂饲料加腹腔注射维生素 D<sub>3</sub> 法复制的 AS 大鼠 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 表达明显上调, 与正常组比较具有明显差异 ( $P < 0.01$ )。藤茶双氢杨梅素可显著下调 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 的表达, 与模型组比较具有明显差异 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

### 4 讨论

AS 的病理学原因复杂, 现代医学认为 AS 是一种多种因素导致的炎症反应性疾病, 在 AS 发生和



A. 正常组; B. 模型组; C. 辛伐他汀 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组; D. 藤茶双氢杨梅素 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组; E. 藤茶双氢杨梅素 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组

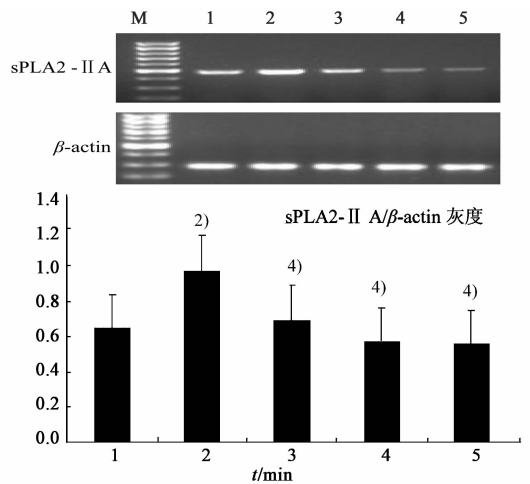
图 1 藤茶双氢杨梅素对 AS 大鼠主动脉弓病理改变的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effects of dihydromyricetin on pathology of the aortic arch of atherosclerosis rats (HE, ×400)

**表 2 藤茶双氢杨梅素对 AS 大鼠血清 CRP, TNF- $\alpha$  和 IL-1 水平的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effects of dihydromyricetin on serum CRP, TNF- $\alpha$  and IL-1 of atherosclerosis rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	CRP	TNF- $\alpha$	IL-1
		/mg·L <sup>-1</sup>	/ng·L <sup>-1</sup>	/ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	0.63 ± 0.14	8.63 ± 4.54	69.02 ± 16.69
模型	-	8.51 ± 2.31 <sup>2)</sup>	17.63 ± 9.58 <sup>1)</sup>	102.08 ± 27.20 <sup>1)</sup>
辛伐他汀	5	7.52 ± 5.78	9.09 ± 6.23	66.01 ± 23.10 <sup>3)</sup>
藤茶双氢	40	6.01 ± 2.77 <sup>3)</sup>	11.13 ± 8.61	71.99 ± 16.12 <sup>3)</sup>
杨梅素	10	9.09 ± 1.91	14.15 ± 8.11	80.27 ± 23.10



M. Mark; 1. 正常组; 2. 模型组; 3. 辛伐他汀 5 mg·kg<sup>-1</sup> 组; 4. 藤茶双氢杨梅素 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组; 5. 藤茶双氢杨梅素 10 mg·kg<sup>-1</sup> 组

图 2 藤茶双氢杨梅素对 AS 大鼠主动脉弓 sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of dihydromyricetin on expressions of sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA of aortic arch of atherosclerosis rats

发展过程中,炎症贯穿全程,CRP,IL-1,TNF- $\alpha$ 等炎症因子发挥了至关重要的作用。藤茶双氢杨梅素可显著降低AS大鼠血清CRP和IL-1水平,通过影响激活补体系统、单核细胞的吞噬作用、炎症因子的释放、诱导炎症因子的表达、血管平滑肌细胞凋亡的过程<sup>[11-13]</sup>,抑制AS的发展。

藤茶双氢杨梅素可显著抑制AS大鼠主动脉弓sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA的表达,从而影响sPLA<sub>2</sub>-II A的形成,修饰的LDL颗粒,影响炎症介质如白三烯、前列腺素、血小板激活因子等水平,参与粥样斑块的炎症和免疫过程,达到防治AS效果。这和sPLA<sub>2</sub>-II A的生理功能密切相关,sPLA<sub>2</sub>-II A为钙依赖的磷脂酶家族,在AS的形成和发展的病理过程中,起着重要的作用。能够水解细胞膜和脂蛋白磷脂的第2位酰基,产生溶血磷脂、游离脂肪酸及许多炎症因子如白介素、血小板激活因子等的前体<sup>[14]</sup>。

研究表明sPLA<sub>2</sub>-II A和CRP,两者之间存在紧密的联系,在AS的治疗中共同影响AS的发展进程<sup>[15-16]</sup>。实验结果表明,藤茶双氢杨梅素可显著抑制AS大鼠主动脉弓sPLA<sub>2</sub>-II A mRNA的表达,且可显著降低AS大鼠血清CRP和IL-1水平,提示藤茶双氢杨梅素抗AS的药理活性可能涉及到sPLA<sub>2</sub>-II A和CRP调节通路。藤茶双氢杨梅素具有影响AS脂质代谢关键酶的表达、影响脂质代谢、影响血清炎症因子水平的特性,提示其抗AS活性具有多靶点、作用的多环节的特点,更为详实的分子生物学机制,还有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 何桂霞. 藤茶活性成分的分离鉴定及药理作用研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2004.

[2] 唐瑛,罗祖友,严奉伟,等. 藤茶总黄酮对小鼠的体内抗氧化作用研究[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(12):1449-1452.

[3] 何桂霞,杜方麓,杨伟丽,等. 藤茶总黄酮清除氧自由基与抗脂质过氧化作用[J]. 中药材,2003,26(5):338-340.

[4] 陈玉琼,倪德江,程倩,等. 藤茶总黄酮及二氢杨梅素降血脂作用研究[J]. 茶叶科学,2007,27(3):221-225.

[5] 曾宪彪,韦桂宁,何飞,等. 藤茶总黄酮对动脉粥样硬化大鼠血脂及血液流变学的影响[J]. 重庆医学杂志,2014,43(5):518-520.

[6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学

技术出版社,2006:422-426.

[7] Wolf D, Stachon P, Bode C, et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis [J]. Hamostaseologie, 2014, 34(1):6371.

[8] Wildgruber M, Swirski F K, Zernecke A. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis [J]. Theranostics, 2013,3(11):865-884.

[9] Montecucco F, Mach F. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. Semin Immunopathol, 2009, 31(1):1-3.

[10] Hartman J, Frishman W H. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy [J]. Cardiol Rev, 2014, 22(3):147-151.

[11] Habib S S, Masri A. Relationship of high sensitivity C-reactive protein with presence and severity of coronary artery disease [J]. Pak J Med Sci, 2013, 29(6):1425-1429.

[12] Kaplan M, Hamoud S, Tendler Y, et al. A significant correlation between C-reactive protein levels in blood monocytes derived macrophages versus content in carotid atherosclerotic lesions [J]. J Inflamm (Lond), 2014, 11(1):7.

[13] Montecucco F, Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor [J]. Clin Interv Aging, 2008, 3(2):341-349.

[14] Cavigliolo G, Jayaraman S. Proteolysis of Apolipoprotein A-I by Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>: a new link between inflammation and atherosclerosis [J]. J Biol Chem, 2014, 289(14):10011-10023.

[15] Kupreishvili K, Baidoshvili A, Weeme M, et al. Degeneration and atherosclerosis inducing increased deposition of type IIA secretory phospholipase A<sub>2</sub>, C-reactive protein and complement in aortic valves cause neutrophilic granulocyte influx [J]. J Heart Valve Dis, 2011, 20(1):29-36.

[16] Mattsson N, Magnussen C G, Rönnekaa T, et al. Metabolic syndrome and carotid intima-media thickness in young adults: roles of apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, C-reactive protein, and secretory phospholipase A<sub>2</sub>: the cardiovascular risk in young Finns study [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(9):1861-1866.

[责任编辑 周冰冰]