

化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响

陈宁, 宋因, 贾连群*, 陈丝, 王健, 王群, 杨关林*

(辽宁中医药大学, 辽宁省中医转化医学研究中心, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**探究化痰祛痰方对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响,并探讨其相关的作用机制。**方法:**健康 SPF 级雄性新西兰白兔 90 只,随机分为正常组、模型组、化痰祛痰方高、中、低剂量组(4, 8, 16 g·kg⁻¹),辛伐他汀组(1.4 mg·kg⁻¹),每组 15 只。正常组给予基础饲料喂养,其他组采用高脂饲料喂养,建立动脉粥样硬化模型,造模 8 周后,化痰祛痰方高、中、低剂量组与辛伐他汀组给予相应药物溶液,正常组和模型组给予等量生理盐水,4 周后,全自动生物化学分析仪检测血清甘油三酯(triglyceride, TC),胆固醇(cholesterol, TC),高密度脂蛋白(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C),低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的含量;苏木素-伊红(HE)和油红 O 染色观察肝组织形态学改变;分光光度法检测家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物活性;Blue-Native-Page 技术检测线粒体呼吸链酶复合物含量。**结果:**与正常组比较,模型组家兔血清中 TC, TG, LDL-C 显著升高, HDL-C 显著降低;与模型组比较,化痰祛痰方高、中、低剂量组与辛伐他汀组家兔血清中 TC, TG, LDL-C 显著降低, HDL-C 显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中化痰祛痰方中以高剂量效果最为显著。HE 及油红 O 染色结果显示模型组较正常组比较家兔肝组织肿胀明显、脂肪空泡清晰可见,胞浆内脂滴蓄积明显;与模型组比较,化痰祛痰高、中、低剂量组及辛伐他汀组脂肪空泡明显减少或消失,肝组织形态恢复或部分恢复正常,其中化痰祛痰方中以高剂量效果最为显著。与正常组比较,模型组肝脏线粒体呼吸链酶复合物 I, II, III, IV, V 活性及含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,化痰祛痰方高剂量组与辛伐他汀组肝脏线粒体呼吸链酶复合物 I, II, III, IV, V 活性和含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**化痰祛痰方可能是通过影响线粒体呼吸链酶复合物的活性及含量减少脂质沉积,防治动脉粥样硬化。

[关键词] 化痰祛痰方; 动脉粥样硬化; 线粒体呼吸链酶复合物; 脂质沉积

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0171-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20180723

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180117.1623.002.html>

[网络出版时间] 2018-01-22 8:41

Effect of Huayu Qutan Recipe on Respiratory Chain Enzyme Complexes of Liver Mitochondria in AS Rabbits

CHEN Ning, SONG Nan, JIA Lian-qun*, CHEN Si, WANG Jian, WANG Qun, YANG Guan-lin*
(*Translational Medicine Research Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) in Liaoning Province, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Huayu Qutan recipe on liver mitochondrial respiratory chain enzyme complexes in atherosclerosis (AS) rabbits. **Method:** Totally 90 healthy male SPF New Zealand white rabbits were randomly divided into the normal group, the model group, high, middle and low dose Huayu Qutan recipe groups (4, 8, 16 g·kg⁻¹), simvastatin group (1.4 mg·kg⁻¹), 15 rats in each group. The normal group was fed with basic feeding, and other groups were fed with high-fat diet to establish the atherosclerosis model. After

[收稿日期] 20171117(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774022);国家百千万人才工程项目(2017-58);辽宁省高等学校优秀人才支持计划项目(LR2015041)

[第一作者] 陈宁, 硕士, 从事中药防治心血管病分子生物学机制研究, Tel: 13504970361, E-mail: 2471818237@qq.com

[通信作者] * 贾连群, 博士, 教授, 从事中药防治心血管病分子生物学机制研究, Tel: 024-31207093, E-mail: jilq-8@163.com;

* 杨关林, 博士, 教授, 从事中西医结合防治心脑血管病研究, Tel: 024-31207028, E-mail: yang_guanlin@163.com

8 weeks, high, middle and low dose Huayu Qutan recipe groups and simvastatin group were given with corresponding drug solution, while the normal group and model group were given with the same amount of saline. After 4 weeks, the levels of triglyceride (TG), cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum were tested by the automatic biochemistry analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining were used to observe the changes of liver tissue morphology. The activity of liver mitochondrial respiratory chain enzyme complexes was tested by the spectrophotometry. The content of mitochondrial respiratory chain enzyme complexes was tested by Blue-Native-Page. **Result:** As compared with the normal group, TC, TG, LDL-C levels in serum were increased significantly, and HDL-C level was decreased significantly in model group. As compared with the model group, TC, TG, LDL-C levels were decreased significantly, and HDL-C was increased significantly in high, middle and low dose Huayu Qutan recipe groups and simvastatin group ($P < 0.01$). The effect of high dose Huayu Qutan recipe was most obvious. HE and oil red O staining results showed that as compared with the normal group, the swelling of rabbit liver tissues was obvious and fat vacuoles were clearly visible, with significantly accumulated lipid droplets in the cytoplasm in model group. As compared with the model group, fatty vacuoles in high, middle and low dose Huayu Qutan recipe groups and simvastatin group were decreased significantly or disappeared, and liver tissue morphology was all or partly recovered. The effect of high dose Huayu Qutan recipe was most obvious. As compared with the normal group, the activity and contents of hepatic mitochondrial respiratory chain enzyme complexes I, II, III, IV, V were decreased in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the activity and contents of liver mitochondrial respiration chain enzyme complexes I, II, III, IV, V were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huayu Qutan recipe may reduce lipidosis to prevent and treat atherosclerosis by affecting contents and activity of mitochondrial respiratory chain enzyme complexes.

[**Key words**] Huayu Qutan recipe; atherosclerosis; mitochondrial respiratory chain enzyme complex; lipidosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由于血管内皮损伤,脂质异常蓄积引起的大、中动脉的慢性炎症性疾病^[1]。线粒体功能障碍可加重机体氧化应激、炎症反应、细胞凋亡及胆固醇蓄积等病理过程,进而影响动脉粥样硬化的发生发展^[2-5]。目前有研究发现在人动脉粥样硬化斑块中存在线粒体功能障碍,氧化呼吸速率减慢^[6],提示血管内皮细胞线粒体功能发生变化可能是 AS 潜在的发病机制。线粒体是氧化磷酸化的主要场所,氧化磷酸化是指物质在体内氧化释放能量最终形成 ATP 的一种偶联反应,主要依赖于线粒体呼吸链上的电子传递,而呼吸链上酶复合体的活性和数量决定了氧化磷酸化的速率,这五种酶分别为 NADH (复合物 I),琥珀酸氧化还原酶(复合物 II),细胞色素 C 氧化还原酶(复合物 III),细胞色素 C 还原酶(复合物 IV)和 ATP 合成酶(复合物 V),但以上 5 种复合物酶的变化是否参与 AS 形成的过程中,有待深入探讨。目前中医归纳 AS 的发病机制主要与痰、瘀、虚相关。研究所选用的化痰祛痰方药具有健脾益气、化痰祛瘀之功效,由党参、黄芪、绞股兰、丹参、茯苓、法半夏、石菖

蒲、川芎和郁金组成,具有健脾益气,化痰祛瘀之功效,并取得了良好的临床疗效。课题组前期研究发现化痰祛痰方及其拆方能影响胆固醇的合成,调控胆固醇代谢相关基因等方面影响脂质代谢^[7-9]。鉴于化痰防治 AS 的机制仍需进一步探讨,本实验拟通过观察化痰祛痰方对 AS 家兔肝脏线粒体呼吸链关键酶复合物的影响进一步探究化痰祛痰方防治 AS 的可能机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雄性新西兰白兔 90 只,体重(2.2 ± 0.2) kg,SPF/VAF 级,由济南金丰实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(鲁)2014-0006。动物实验符合辽宁中医药大学实验动物伦理委员会标准,实验动物伦理审查编号 20160704。

1.2 药物及试剂 细胞色素 C(Cyt C),还原性辅酶 I(NADH),乙酰辅酶 A(AcCoA),2,6-二氯靛酚钠盐水合物(DCPIP),5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB),Ubiquinone-1(Ub),Tris,叠氮化钠(NaN₃),乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA),4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-

(2-乙磺酸)(HEPES), TritonX-100, 乙二胺四乙酸(EDTA)(美国Sigma公司,批号分别为C2506, N1630, A2181, D1878, D8130, C7956, 10708976001, S8032, E0396, H3357, T9284, 798681); 辛伐他汀(杭州默沙东制药有限公司,批号L036325); 甘油三脂(TG); 总胆固醇(TC), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测定试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司,批号分别为CH0101151, CH0101152, CH0101161, CH0101162); 化痰祛痰方由党参30g, 黄芪30g, 绞股蓝30g, 丹参15g, 茯苓15g, 法半夏15g, 石菖蒲20g, 川芎20g, 赤芍15g, 郁金15g组成, 以上药材均购于辽宁中医药大学附属医院, 由本院中医药实验中心副主任中药师樊晖鉴定为正品, 均符合2015年版《中国药典》的标准, 以上药物由辽宁中医药大学动物实验中心统一煎煮。

1.3 仪器 U-3900型紫外分光光度计(日本日立公司); TAB-120FR型全自动生化分析仪(日本东芝公司); Thermo Scientific Multiskan FC型酶标仪(德国Thermo Scientific公司); BX51型荧光显微镜(日本Olympus公司); GS-900型校准型光密度仪, Mini-PROTEAN Tetra型小型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司),

2 方法

2.1 动物分组与处理 健康SPF级雄性新西兰白兔90只, 普通饲料适应性喂养2周后, 随机分为正常组、模型组、化痰祛痰方高、中、低剂量组及辛伐他汀组, 每组15只。正常组喂饲普通饲料, 其他各组喂饲高脂饲料(高脂饲料配方为1.5%胆固醇, 1%胆盐, 3%猪油, 3%花生油, 5%蛋黄粉, 加86.5%普通饲料), 自由摄食, 饮水不限^[10-12]。8周后, 化痰祛痰方高、中、低剂量组及辛伐他汀组分别给予相应药物干预, 给药剂量按人和动物体表面积折算系数换算, 化痰祛痰方低、中、高剂量组给药剂量分别为4, 8, 16 g·kg⁻¹·d⁻¹, 辛伐他汀组1.4 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 正常组与模型组给予同体积的蒸馏水, 灌胃给药, 给药容积8 mL·kg⁻¹·d⁻¹, 连续给药4周。各组家兔末次给药后禁食12h, 称体质量后腹腔注射10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)进行麻醉, 迅速剖开腹腔, 腹主动脉取血, 肉眼观察肝脏大体外观后, 称取定量肝脏组织后放入冻存管中, 加入预冷的等量肝脏组织冻存液(0.21 mol·L⁻¹甘露醇, 0.07 mol·L⁻¹蔗糖, 20%二甲基亚砷, pH 7.5), 冰上静置10 min左右, 储存于-80℃冰箱内用于线粒体提取。另外再取若干

块约1 cm×1 cm大小肝组织用于肝脏组织病理学检测。

2.2 血脂检测 家兔腹主动脉取血后放入离心机内3 500 r·min⁻¹离心25 min, 获得血清采用全自动生化分析仪检测各组家兔血清中TC, TG, HDL-C, LDL-C水平。

2.3 肝脏组织病理学观察 苏木素-伊红(HE)染色, 将肝脏固定于4%多聚甲醛24 h以上, 梯度脱水后包埋, 行石蜡切片, 片厚5 μm, 按说明书步骤进行染色。油红O染色, 取各组肝组织切成1 cm×1 cm小块进行包埋, 将包埋后肝脏固定于冰冻切片机上, 行厚10 μm的横断面切片, 4%多聚甲醛固定5 min, 60%异丙醇浸40 s, 浸入油红O工作液15 min, 60%异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗2次, 苏木素染色5 min, 蒸馏水冲洗2次, 1%盐酸-乙醇分化1 s, 封片后在光镜下观察分别以多聚甲醛固定及冷冻。

2.4 肝脏线粒体制备 取绿豆大小家兔肝脏于匀浆器中, 加入Liver-1 2 mL, pH 7.4(0.045 mol·L⁻¹甘露醇, 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.015 mol·L⁻¹蔗糖, 0.1 mol·L⁻¹ EGTA, BSA 0.25 g)冰上研磨至匀浆状, 740×g转速4℃条件下离心10 min取上清(反复3次)。9 000×g转速4℃条件下离心15 min取沉淀; 使用liver-1重悬沉淀, 9 000×g转速4℃条件下离心15 min离心, 弃上清取沉淀(反复2次); 再使用liver-2, pH 7.4(0.045 mol·L⁻¹甘露醇, 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.015 mol·L⁻¹甘露醇, 0.25 g BSA)重悬沉淀, 10 000×g转速4℃条件下离心15 min, 弃上清取沉淀(反复2次), 最后使用MRB, pH 7.4(0.1 mol·L⁻¹ EGTA, 0.5 mol·L⁻¹ HEPES, 0.07 mol·L⁻¹甘露醇, 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.015 mol·L⁻¹蔗糖)重悬线粒体并测定其浓度, 统一将线粒体浓度用MRB调节成1 g·L⁻¹分装备用。测定线粒体酶复合物活性前将线粒体在液氮中反复冻融3次。

2.5 分光光度法测定肝脏线粒体呼吸链酶活性

2.5.1 线粒体呼吸链酶复合物I活性测定 取复合物I反应缓冲液94 μL [0.5 mol·L⁻¹ KPi 100 μL (pH 7.5), 50 g·L⁻¹牛血清白蛋白(BSA) 60 μL, 0.5 mol·L⁻¹ NaN₃ 10 μL, 10 mmol·L⁻¹ NADH 10 μL, 蒸馏水定容至994 μL]与线粒体(mito) 5 μL, 于37℃温浴2 min, 再加入5 mmol·L⁻¹ Ub 1 μL, 连续测定2 min内340 nm波长处NADH的吸光度A变化(NADH的消光系数ε=6.2 mmol·L⁻¹·cm⁻¹)。

2.5.2 线粒体呼吸链酶复合物II活性测定 取复

合物 II 反应的缓冲液 96 μL [0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐体系 (Kpi) 50 μL (pH 7.5), 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 20 μL , 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 10 μL , 400 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 琥珀酸盐 (succinate) 50 μL , 质量分数 0.015% DCPIP 145 μL , 蒸馏水定容至 996 μL] 与 mito 3 μL , 于 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 10 min, 再加入 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ub 1 μL , 连续测定 2 min 内 600 nm 波长处 DCPIP 的 A 的变化测定 2 min (DCPIP 的消光系数 $\varepsilon = 19.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

2.5.3 线粒体呼吸链酶复合物 III 活性测定 取复合物 III 反应的缓冲液 96 μL [0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kpi 体系 50 μL (pH 7.5), 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CytC 75 μL , 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaN_3 15 μL , 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 7.5) 20 μL], 体积分数 2.5% Tween-20 10 μL , 蒸馏水定容至 990 μL] 与 mito 3 μL , 于 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 2 min, 再加入 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 还原型 DB 2 1 μL , 连续测定 2 min 内 550 nm 波长处 CytC 的 A 的变化 (细胞色素 C 的消光系数 = 18.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

2.5.4 线粒体呼吸链酶复合物 IV 活性测定 取复合物 IV 反应的缓冲液 97 μL [100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kpi 250 μL (pH 7.0), 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 还原型 CytC 50 μL , 蒸馏水定容至 995 μL] 与 mito 3 μL , 于 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 2 min, 连续测定 2 min 内 550 nm 处还原型 CytC 的 A 变化 3 min (细胞色素 C 的消光系数 $\varepsilon = 18.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

2.5.5 线粒体呼吸链酶复合物柠檬酸合酶 (CS) 活性测定 取复合物 CS 反应的缓冲液 94 μL [200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 500 μL , (pH 8.0, 含体积分数 0.2% TritonX-100), 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTNB 100 μL ,

10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AcCoA 30 μL , 蒸馏水定容至 950 μL] 与 mito 3 μL , 于 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 2 min, 再加入草酰乙酸 3 μL 启动, 连续测定 3 min 内 412 nm 处 AcCoA 的 A 变化 (AcCoA 的消光系数 $\varepsilon = 13.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

2.6 Blue Native Page 电泳法检测呼吸链酶复合物 I, II, III, IV, V 含量 提取线粒体并测定浓度, 取 400 ng 线粒体, 15 000 $\times g$ 转速 4 $^\circ\text{C}$ 条件下离心 10 min 去上清, 加入 solution buffer A 40 μL (0.32 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, EDTA 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Hcl, pH 7.4) 和 20% digitonin 6 μL , 冰上静置 20 min, 20 000 $\times g$ 转速 4 $^\circ\text{C}$ 条件下离心 45 min 离心取上清。冰上配置 BNG 梯度凝胶, 电泳 (4 $^\circ\text{C}$, 45 V, 1 h; 4 $^\circ\text{C}$, 180 V, 2 ~ 2.5 h)。考马斯亮蓝室温慢摇染色 1 h, 使用脱色剂 (甲醇 12.5 mL + 冰乙酸 4 mL, 使用蒸馏水定容至 50 mL) 在摇床上脱色 30 min, 4 ~ 5 次, 最后使用 GS-900 进行拍摄。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对动脉粥样硬化家兔血脂的影响 与正常组比较, 模型组血清中 TC, TG, LDL-C 含量升高 ($P < 0.01$), HDL-C 含量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 化痰祛痰方高、中、低剂量组及辛伐他汀组 TC, TG, LDL-C 含量显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 含量显著升高 ($P < 0.01$)。其中化痰祛痰方高剂量组效果最优。见表 1。

表 1 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常	-	6.34 \pm 0.91	1.48 \pm 0.43	6.11 \pm 0.66	3.94 \pm 0.56
模型	-	67.87 \pm 3.50 ¹⁾	10.18 \pm 1.07 ¹⁾	42.19 \pm 3.39 ¹⁾	1.01 \pm 0.62 ¹⁾
化痰祛痰方	16	30.54 \pm 2.96 ²⁾	2.60 \pm 0.67 ²⁾	26.84 \pm 2.54 ²⁾	3.57 \pm 0.47 ^{2,4)}
	8	36.49 \pm 3.78 ^{2,3)}	4.36 \pm 0.98 ^{2,4)}	32.56 \pm 5.64 ^{2,3)}	2.28 \pm 0.34 ^{2,4)}
	4	41.29 \pm 3.72 ^{2,4)}	5.48 \pm 1.07 ^{2,4)}	37.24 \pm 2.45 ⁴⁾	2.03 \pm 0.69 ⁴⁾
辛伐他汀	0.001 4	22.22 \pm 2.61 ²⁾	1.52 \pm 0.10 ²⁾	20.13 \pm 1.07 ²⁾	3.70 \pm 0.76 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与化痰祛痰方 16 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对动脉粥样硬化家兔肝脏组织形态学的影响 正常组肝细胞索条理清晰, 中央静脉居中, 肝窦正常, 核圆、大、居中, 胞浆内无脂滴蓄积; 与正常组比较, 模型组肝细胞体积增大, 肿胀变圆, 胞浆内出现

大量脂肪空泡, 橘红色脂滴明显蓄积; 与模型组比较, 化痰祛痰高、中、低剂量组和辛伐他汀组兔肝组织肝细胞的体积大小有所恢复, 细胞肿胀明显减轻, 空泡变少, 橘红色脂滴明显减少, 脂肪变性程度减

低。其中化痰祛痰方高剂量组对于肝组织病理形态的改善明显优于中剂量及低剂量组。HE 染色见图 1, 油红 O 染色见图 2。

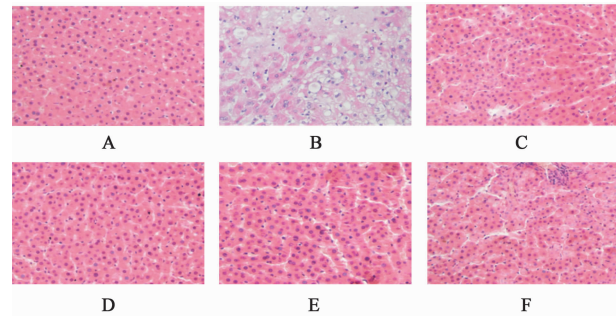


图 1 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔肝脏组织形态学的影响 (HE, ×400)
A. 正常组; B. 模型组; C. 辛伐他汀组; D. 化痰祛痰方 16 g·kg⁻¹ 组; E. 化痰祛痰方 8 g·kg⁻¹ 组; F. 化痰祛痰方 4 g·kg⁻¹ 组 (图 2 同)

Fig. 1 Effect of Huayu Qutan recipe on liver tissue morphology in diet-induced rabbit atherosclerosis model (HE, ×400)

3.3 对动脉粥样硬化家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物的影响 在血脂和形态学的结果中明确了化痰祛痰方高剂量最佳, 后续实验重点观察化痰祛痰方高剂量组的结果。与正常组比较, 模型组线粒体呼吸链酶复合体 I, II, III, IV 活性显著降低 ($P <$

表 2 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔呼吸链酶复合物活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Huayu Qutan recipe on respiratory chain enzyme complex activity in diet-induced rabbit atherosclerosis model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
nmol·min⁻¹·mg⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Complex I /CS	Complex II /CS	Complex III /CS	Complex IV /CS
正常	-	1.453 ± 0.384	3.228 ± 0.823	5.146 ± 0.781	0.543 ± 0.055
模型	-	0.503 ± 0.114 ¹⁾	1.508 ± 0.238 ¹⁾	3.172 ± 0.439 ¹⁾	0.369 ± 0.039 ¹⁾
化痰祛痰方高剂量	16	1.378 ± 0.346 ³⁾	3.023 ± 0.863 ³⁾	4.737 ± 0.924 ³⁾	0.527 ± 0.082 ³⁾
辛伐他汀	0.001 4	1.125 ± 0.338 ²⁾	2.633 ± 0.677 ²⁾	4.449 ± 0.803 ²⁾	0.477 ± 0.017 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔线粒体呼吸链酶复合物含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Huayu Qutan recipe on content of mitochondrial respiratory chain enzyme complex in diet-induced rabbit atherosclerosis model ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
正常	-	1	1	1	1	1
模型	-	0.798 ± 0.012 ¹⁾	0.569 ± 0.058 ¹⁾	0.661 ± 0.056 ¹⁾	0.684 ± 0.049 ¹⁾	0.532 ± 0.064 ¹⁾
化痰祛痰方高剂量	16	0.958 ± 0.012 ²⁾	0.990 ± 0.041 ²⁾	0.982 ± 0.032 ²⁾	0.968 ± 0.038 ²⁾	0.959 ± 0.018 ²⁾
辛伐他汀	0.001 4	0.866 ± 0.030 ²⁾	0.722 ± 0.069 ²⁾	0.939 ± 0.039 ²⁾	0.891 ± 0.022 ²⁾	0.805 ± 0.037 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

中医本无动脉粥样硬化对应的病名, 可归属于中医中的“胸痹”、“心悸”等范畴, 其病机多为本虚标实, 脾虚痰浊, 针对此病机导师杨关林教授创立化痰祛痰方, 临床取得可喜疗效, 同时课题组前期也从炎

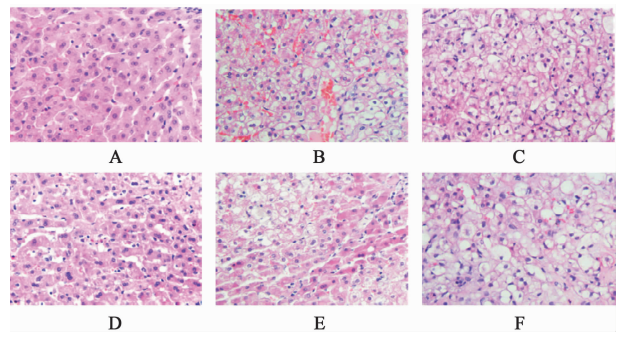


图 2 化痰祛痰方对动脉粥样硬化家兔肝脏组织形态学的影响 (油红 O, ×400)

Fig. 2 Effect of Huayu Qutan recipe on liver tissue morphology in diet-induced rabbit atherosclerosis model (oil red O, ×400)

0.01); 与模型组比较, 化痰祛痰方高剂量组和辛伐他汀组线粒体呼吸链酶复合体 I, II, III, IV 活性均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 化痰祛痰方高剂量组与辛伐他汀组之间无显著性差异。见表 2。

3.4 对动脉粥样硬化家兔肝脏线粒体呼吸链酶复合物酶含量的影响 与正常组比较, 模型组线粒体呼吸链酶复合体 I ~ V 含量降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 化痰祛痰方高剂量组和辛伐他汀组呼吸链酶复合体 I ~ V 含量增加, 另外化痰祛痰方高剂量组升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

症、自噬、氧化应激等多方面初步阐明了化痰祛痰方防治 AS 的机制, 本文则以线粒体能量代谢为新的切入点, 对于化痰祛痰方防治 AS 的潜在机制进行研究。

家兔为食草动物, 对富含胆固醇的饮食及其敏感, 易于形成 AS 模型, 广泛应用于 AS 的研究中, 课

课题组选取了家兔作为研究对象,采用高脂饮食诱导的方法进行造模,以线粒体作为切入点,探究化痰祛痰方对线粒体氧化磷酸化的影响具有一定意义。

实验结果显示,模型组家兔血清中 TG, TC, LDL-C 含量明显升高, HDL-C 明显下降,肝脏病理组织切片发现大量的脂质沉积级脂肪变性,说明造模成功^[13]。与模型组比较,治疗组家兔血清中 TG, TC, LDL-C 含量显著降低, HDL-C 明显升高,肝脏组织也有不同程度的恢复。其中化痰祛痰方高剂量组较中剂量和低剂量 2 组效果更佳,因此在后续实验取化痰祛痰方高剂量组进行机制探讨。

脂质代谢异常是形成动脉粥样硬化的关键环节,肝脏在脂质代谢中起着核心作用,它是脂肪酸氧化和合成的主要器官。肝脏内脂质合成与分解间的失衡是引起肝与血脂水平的变化的主要原因^[14]。有研究表明,减少线粒体氧化磷酸化蛋白含量能够抑制脂肪酸 β 氧化,从而导致脂肪生成和 TG 分泌^[15-16]。脂肪酸的合成与分解均需要乙酰辅酶 A 的参与,线粒体氧化磷酸化的底物是乙酰辅酶 A,由此可见乙酰辅酶 A 是关联着脂肪酸合成分解和线粒体氧化磷酸化的重要桥梁。当线粒体呼吸链上复合体酶的活性或者酶的数量增加则线粒体氧化磷酸化速率提高,加速了肝脏乙酰辅酶 A 池内得乙酰辅酶 A 进入线粒体内最终转化为 ATP。肝脏内乙酰辅酶 A 的减少,一方面促使肝脏外更多的脂肪酸进入肝脏内分解成乙酰辅酶 A,另一方面使脂肪酸在肝脏内合成胆固醇速率下降,进而由肝脏进入血液的胆固醇也减少。线粒体氧化磷酸化速率的提高加速了循环内脂质进入肝脏内分解成乙酰辅酶 A 同时也降低了肝脏内乙酰辅酶 A 转变成胆固醇输出入血,降低了肝脏内和血液中的脂质沉积,说明线粒体呼吸链酶复合物在这一过程中起到了重要的作用。本研究结果显示模型组线粒体呼吸链上酶复合物 I, II, III, IV 的活性减弱同时也减少了 I, II, III, IV, V 酶的含量,化痰祛痰方能纠正以上的变化趋势,进而提高线粒体氧化磷酸化效率。化痰祛痰方能降低脂质沉积,减缓动脉粥样硬化的发展,其作用机制可能是通过调控线粒体呼吸链酶复合物实现的。对于调控以上呼吸链酶复合物的基因是如何变化尚不知晓,还有待进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2015, 36(2): 141-152.

[2] 王志丹,宋因,吕美君,等. 益气健脾化痰祛痰方对脾虚痰浊动脉粥样硬化巴马小型猪肝脏线粒体能量代谢的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 4107-4110.

[3] 熊诗强,马丽群,王沛坚,等. 激活 TRPV1 上调 UCP2 改善血管内皮线粒体功能即拮抗冠状动脉粥样硬化[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1820.

[4] 秦江瑜,康毅,刘欣. 线粒体功能障碍与动脉粥样硬化及其危险因素[J]. 医学综述, 2011, 17(11): 1635-1637.

[5] 司艳红,陈晓凤,秦树存. 线粒体功能障碍参与动脉粥样硬化的分子机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(9): 897-903.

[6] YU E, Reinhold J, YU H, et al. Mitochondrial respiration is reduced in atherosclerosis, promoting necrotic core formation and reducing relative fibrous cap thickness[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(12): 2322-2332.

[7] 贾连群,杨关林,罗莹,等. 化痰祛痰方及其拆方对 HepG2 细胞胆固醇代谢的影响及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 158-162.

[8] 贾连群,陈文娜,赵秋宇,等. 化痰祛痰方药对动脉粥样硬化模型小鼠肝脏胆固醇代谢相关基因表达调控的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 214-218.

[9] 冷雪,贾连群,杨关林,等. 化痰祛痰方对脾虚型高脂血症大鼠肝脏 SREBP-2 信号通路的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 320-326.

[10] 刘剑刚,董国菊,马鲁波,等. 免疫损伤结合高脂饲料致兔动脉粥样硬化斑块形成的相关因素分析[J]. 实验动物科学, 2013, 30(2): 32-38.

[11] 李琳,窦健霖,楚天舒,等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3690-3693.

[12] 王园园,龙民慧,周磊磊,等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物科学, 2008, 25(3): 18-21.

[13] 魏国华,刘兰,蔡晓波,等. 高脂饮食所致动脉粥样硬化家兔肝组织学损伤评估[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 373-375.

[14] Seung-Hoi K. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis[J]. Clin Mol Hepatol, 2013, 19(3): 210-215.

[15] Perfield J W, Ortinau L C. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice[J]. J Obes, 2013, doi: 10.1155/2013/296537.

[16] Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease[J]. Diabetes Metab, 2003, 29(5): 478-485.

[责任编辑 周冰冰]