

脂脉宁对动脉粥样硬化家兔氧化应激反应及 LDL-R, VCAM-1 基因表达的影响

刘应柯¹, 张玉峰², 刘尚岭¹, 张希卿¹

(1. 中国人民解放军第 153 中心医院, 郑州 450042; 2. 河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] 目的:探讨脂脉宁抗动脉粥样硬化(AS)的作用机制。方法:用高脂饲料复制家兔 AS 模型,于 4 周后再灌服脂脉宁 4 周,检测血脂、氧化指标及主动脉低密度脂蛋白受体(LDL-R) mRNA 及血管细胞黏附分子-1(VCAM-1) mRNA 的表达。结果:模型组血脂 4 项及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)均明显较空白组升高,谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)降低,主动脉内膜、斑块明显增厚;脂脉宁 0.375, 0.188 g·kg⁻¹ 血脂及 MDA 含量均明显较模型组降低,GSH, GSH-Px 升高,动脉斑块减小,高剂量组效果更明显。模型组 LDL-R mRNA 表达明显降低,VCAM-1 mRNA 表达升高;给药 2 组 LDL-R mRNA 表达则明显升高,VCAM-1 mRNA 表达降低,高剂量组尤为明显。结论:脂脉宁抗 AS 作用与其调整脂质代谢、抗氧化及调控 LDL-R mRNA 及 VCAM-1 mRNA 表达有关。

[关键词] 脂脉宁;动脉粥样硬化;血管细胞黏附分子-1;低密度脂蛋白受体;氧化反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0214-04

Effect of Zhimaining on Oxidative Stress and Gene Expression of LDL-R, VCAM-1 in Rabbit with Atherosclerosis

LIU Ying-ke¹, ZHANG Yu-feng², LIU Shang-ling¹, ZHANG Xi-qing¹

(1. Hospital 153 of PLA, Zhengzhou 450042, China;

2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the anti-atherosclerosis mechanism of Zhimaining. **Method:** Rabbit atherosclerosis model was reproduced with high fat diet. Zhimaining was fed for 4 weeks when hyperlipidemia had been taken shape in 4 weeks, Index of lipid, oxidation, Low density lipoprotein-R(LDL-R) mRNA and VCAM-1 mRNA were detected. **Result:** There was a significant increase in lipid, superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) and decrease in Glutathione(GSH), Glutathione peroxidase(GSH-Px) in model group compared with control group; there was a significant increase in aorta endometrial and plaque in model group compared with control group. A very significant decrease of lipid and MDA and increase of GSH, GSH-Px in high dose(0.375 g·kg⁻¹) and low dose(0.188 g·kg⁻¹) group were manifested compared with control group. There was a significant increase of the expression of VCAM-1 mRNA and decrease of the expression of LDL-R mRNA both in the Zhimaining groups compared with control group. **Conclusion:** The anti-atherosclerosis mechanism of Zhimaining may be related with regulating the antioxidant and metabolism of lipid and the expression of LDL-R mRNA and VCAM-1 mRNA.

[Key words] Zhimaining; atherosclerosis; VCAM-1; LDL-R; oxidation

[收稿日期] 2011-04-11

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(061142400)

[第一作者] 刘应柯,医学博士,主任医师,从事心脑血管病防治研究, Tel:13663863198, E-mail:Liuyingke153@sina.com

动脉粥样硬化(AS)是多种心脑血管病的早期病理改变,预防和逆转 AS 一直是医学界研究的热点。前期我们通过临床研究及对血管内皮细胞培养证实,脂脉宁胶囊有可靠的调整脂质代谢及抗氧化作用^[1];对过氧化氢诱导血管内皮-304 细胞核转录因子-kB 及热休克蛋白-70 的高表达可明显下调^[2],提示该药具有明显的抗炎及抗氧化作用。本研究采用 AS 模型,探讨高血脂、氧化应激反应及相关基因表达对 AS 形成的影响及脂脉宁的干预作用。

1 材料和方法

1.1 药物 脂脉宁由解放军 153 中心医院中药制剂室制备,浸膏含生药 2.6 g·g⁻¹。

1.2 动物 雄性大耳白家兔,体重(1.6~2.0)kg,购于河南省实验动物中心,

1.3 试剂 VCAM-1 mRNA 原位杂交试剂盒、低密度脂蛋白受体基因(LDL-R mRNA)原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),胆固醇(郑州利伟生物有限公司),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),谷胱甘肽(GSH),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物总公司)。

1.4 仪器 真彩色病理细胞显微分析系统(北京天地百年科技有限公司),薄层层析扫描仪(日本 Shimadu 公司)。

1.5 方法 采用高脂饲料喂养法建立家兔动脉粥样硬化模型,高脂饲料配方:1.5%胆固醇、8%猪油、90.5%普通饲料。家兔 32 只,常规饲养 1 周,随机分为 4 组:空白组喂普通饲料,每天 ig 蒸馏水 5 mL·kg⁻¹;模型组每天喂高脂饲料 100 g 后再喂普通饲料,ig 蒸馏水 5 mL·kg⁻¹;脂脉宁 2 组每天喂高脂饲

料 100 g 后再喂普通饲料,第 1~4 周 ig 蒸馏水,5~12 周 ig 脂脉宁浸膏粉 0.375,0.188 g·kg⁻¹·d⁻¹(相当于人等效剂量的 5,2.5 倍)。每周称体重 1 次调整给药量,连续喂养 12 周。实验结束时耳中央动脉采血后,用戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹麻醉动物,放血处死后迅速剪取升主动脉。

1.5.1 指标检测 低温离心 3 000 r·min⁻¹,15 min 分离血清。常规方法测定血脂。SOD, GSH-PX, GSH,MDA 检测均按试剂盒说明书测定。

1.5.2 主动脉病理学观察 用生理盐水冲洗,立即甲醛固定,制片染色均按常规进行。

1.5.3 LDL-R mRNA 及 VCAM-1 mRNA 测定 取新鲜主动脉标本,切成 4 mm³ 小块,立即以 4% 多聚甲醛的固定液固定 1 h。常规制片。VCAM-1 mRNA,LDL-R mRNA 的测定严格按照原位杂交试剂盒说明书进行。用真彩色病理细胞显微分析系统观察,摄像,并对图片进行薄层色谱扫描(530 nm 波长)。应用薄层层析扫描仪进行扫描,并对免疫组织化学染色标本应用图象分析仪扫描各标本的免疫反应信号的灰度值。

1.6 统计分析 采用 SPSS 11.5 软件分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对 AS 家兔血脂的影响 与空白组比较,模型组血脂各指标均显著升高;给药 2 组虽也明显升高,但与模型组比则明显降低($P < 0.05 \sim 0.01$);给药 2 组相比多有显著性差异,提示脂脉宁有明显降血脂作用,且有一定的剂量依赖关系,见表 1。

表 1 脂脉宁对 AS 家兔血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC	TG	HDL	LDL
空白	-	5.54 ± 0.37	0.68 ± 0.13	1.62 ± 0.26	3.98 ± 0.36
模型	-	28.72 ± 3.28 ¹⁾	2.59 ± 0.45 ¹⁾	11.48 ± 1.72 ¹⁾	20.19 ± 2.04 ¹⁾
脂脉宁	0.375	12.34 ± 3.74 ^{1,3,5)}	1.25 ± 0.29 ^{1,3,4)}	9.54 ± 1.21 ^{1,3)}	8.66 ± 1.32 ^{1,3,5)}
	0.188	19.19 ± 3.90 ^{1,3)}	1.67 ± 0.32 ^{1,3)}	9.06 ± 1.25 ^{1,2)}	13.48 ± 2.17 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;脂脉宁高剂量与低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 对氧化物含量及抗氧化酶活性的影响 模型组 SOD,MDA 均比空白组明显升高,GSH,GSH-Px 明显降低;给药组与模型组比则明显降低;给药 2 组之间多有显著性差异,提示脂脉宁有明显抗氧化作用,且有一定的量效关系。见表 2。

2.3 对主动脉相关基因的表达的影响 模型组

LDL-R mRNA 表达明显降低,VCAM-1 mRNA 表达升高($P < 0.01$);给药 2 组皆可使 LDL-R mRNA 表达上调,VCAM-1 mRNA 下调,高剂量组作用更明显,见表 3。

2.4 主动脉硬化斑块观测 空白组家兔主动脉结构正常,内膜完整;模型组主动脉内膜明显增厚隆

表 2 脂脉宁家兔血清 SOD,MDA,GSH,GSH-px 变化的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $nmol \cdot mL^{-1}$	GSH/ $mg \cdot L^{-1}$	GSH-px/ $U \cdot mL^{-1}$
空白	-	91.6 ± 5.7	278.4 ± 18.5	146.0 ± 30.5	369.6 ± 27.5
模型	-	105.1 ± 4.2 ²⁾	865.0 ± 31.3 ²⁾	72.8 ± 15.1 ²⁾	315.4 ± 25.1 ²⁾
脂脉宁	0.375	95.7 ± 6.2	355.9 ± 36.2 ^{2,4)}	112.7 ± 23.9 ^{2,3)}	347.6 ± 37.2 ⁴⁾
	0.188	98.7 ± 4.7	403.1 ± 44.7 ^{2,4,5)}	94.5 ± 13.6 ²⁾	332.9 ± 28.1 ^{1,4)}

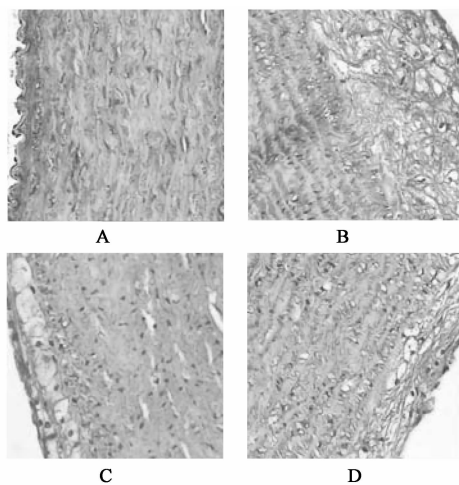
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;高剂量与低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 脂脉宁对兔主动脉 LDL-R mRNA 及 VCAM-1

分组	mRNA 的表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)			灰度
	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LDL-R mRNA	VCAM-1 mRNA	
空白	-	136.7 ± 23.4	51.5 ± 10.7	
模型	-	52.4 ± 18.5 ²⁾	145.6 ± 21.3 ¹⁾	
脂脉宁	0.375	115.7 ± 21.8 ^{3,4)}	68.9 ± 15.9 ^{1,3,4)}	
	0.188	92.4 ± 18.5 ^{1,3)}	116.7 ± 21.8 ^{1,3)}	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;高剂量与低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

起,平滑肌细胞大量增殖,可见成堆泡沫细胞;高剂量组主动脉内膜增厚不明显,未见显著的平滑肌增生。低剂量组主动脉内膜局部轻度增厚,有少量泡沫细胞,可见少量增生的平滑肌细胞,见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 脂脉宁 0.375 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
D. 脂脉宁 0.188 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 家兔主动脉硬化斑块(HE 染色 $\times 200$)

3 讨论

动脉粥样硬化与血管内皮细胞损伤、脂蛋白浸润、平滑肌细胞增殖、炎性细胞浸润、氧自由基的产生等因素有关。动脉内皮下层巨噬细胞内大量脂质堆积,形成泡沫细胞是 AS 早期重要特征,平滑肌细胞及血液循环中的单核细胞均参与形成泡沫细胞。泡

沫细胞的形成与氧化修饰 LDL 密切相关。LDL 在体内氧化修饰是一个复杂过程,目前公认为与氧自由基诱导的氧化应激反应关系密切。氧化应激是指机体随着不正常的代谢骤然产生大量氧自由基,当氧自由基的数量超过体内氧化防御能力,则可导致细胞损伤^[4]。本研究采用高胆固醇复制 AS 家兔,4 周时血清胆固醇、LDL 及过氧化脂质的代谢产物 MDA 含量均显著升高,GSH,GSH-Px 降低,SOD 活性升高,而应用脂脉宁后 TC,LDL 及 MDA 含量均明显降低,抗氧化能力升高,SOD 活性趋于正常,动脉硬化斑块较模型组明显变小、变薄。

LDL-R 表达量受细胞内胆固醇浓度的调节,当细胞内有大量胆固醇堆积时,LDL-R 表达量减少。已经证实,血浆胆固醇水平在很大程度上取决于 LDL-R 基因表达的高低^[5],即 LDL-R 表达水平降低,则血浆胆固醇降解受阻,造成高脂血症,而高脂血症与动脉粥样硬化直接相关。LDL-R 可调节血浆脂蛋白和血脂水平,调节周围组织对血浆脂蛋白的摄取量,加快 LDL 的分解及清除,防止血浆胆固醇异常升高及 AS 的发生。随着分子生物学技术的广泛应用,使人们对 LDL-R 基因表达水平及调控因素有可能进行深入研究^[6]。近年国外一些学者发现高胆固醇血症患者 LDL-R 活性降低^[7],通过药物作用增强 LDL-R 的表达来降低血胆固醇水平是当前的研究热点。本实验结果显示,高胆固醇复制的 AS 模型家兔血 TC, TG, HDL, LDL 均显著升高,主动脉 LDL-R mRNA 表达降低,内膜明显增厚隆起,平滑肌细胞大量增殖,可见成堆的泡沫细胞。

黏附分子是炎症反应的标志物,有证据表明 AS 的形成与慢性炎症反应有关,表现为 VCAM-1、C 反应蛋白等炎症标志物的高表达。已知正常动脉内皮细胞不表达 VCAM-1,而当其受到炎性介质或其他刺激时才会表达^[8]。研究证实,给家兔喂高胆固醇饲料后 1 周,血清总胆固醇即由 1.97 $mmol \cdot L^{-1}$ 上升至 11.29 $mmol \cdot L^{-1}$,主动脉内膜即有明显的 VCAM-1

黄芪提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用

李成浩¹, 张红英^{2*}

(1. 延边大学附属医院消化内科, 吉林 延吉 133002; 2. 基础医学院机能学实验中心, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的: 研究黄芪提取物对四氯化碳(CCl₄)致大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。方法: 取一批大鼠, 其中 10 只为正常组, 除正常组 sc 等体积生理盐水外, 其他大鼠均从第 1 d 开始颈背部 sc CCl₄ 原液(5 mL·kg⁻¹)。以后每周 2 次 sc 40% CCl₄ 花生油(3 mL·kg⁻¹) 7 周, 以复制大鼠肝纤维化模型。选造模好的肝纤维化大鼠, 随机分为黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹) 组, CCl₄ 模型组, 每组 10 只。造模结束第 2 d 开始给药。正常组和 CCl₄ 模型组 ig 蒸馏水, 药物组 ig 黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹), 每天 1 次, 连续 ig 给药 30 d。用赖氏法测定大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的活性, 用放免法测定大鼠血清透明质酸(HA)和肿瘤坏死因子(TNF-α)的含量, 并观察肝脏病理变化。结果: 黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹) 组 ALT 和 AST 活性为(36. 82 ± 7. 25), (48. 83 ± 17. 55) U·L⁻¹, (75. 87 ± 15. 04), (96. 69 ± 34. 56) U·L⁻¹ 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 ALT 和 AST 活性; HA 和 TNF-α 含量为(211. 88 ± 72. 77), (300. 00 ± 142. 83) μg·L⁻¹, (0. 91 ± 0. 20), (1. 00 ± 0. 11) μg·L⁻¹ 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 HA 和 TNF-α 含量; 黄芪提取物可明显减轻大鼠肝纤维化的程度。结论: 黄芪提取物有显地保肝和抗肝纤维化作用, 其作用机制可能与降低 HA 和 TNF-α 含量有关。

[关键词] 黄芪; 肝纤维化; 四氯化碳; 透明质酸; 肿瘤坏死因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0217-04

[收稿日期] 20110329(003)

[第一作者] 李成浩, 硕士, 主治医师, Tel: 15526770468, E-mail: yjch2003@yahoo. com. cn

[通讯作者] * 张红英, 高级实验师, 从事心脑血管药理研究, Tel: 0433-13843366516, E-mail: zhanghongying52@163. com

mRNA 表达, 至 6 周出现 AS 病灶时 VCAM-1 mRNA 表达更加丰富, 提示在高血脂促进 AS 形成的过程中, VCAM-1 基因很早就被激活并持续表达^[9]。

本研究结果显示, 模型组主动脉有明显的动脉硬化斑块, LDL-R mRNA 表达降低, VCAM-1 mRNA 表达增高。脂脉宁可明显减轻 AS 斑块, 增强 LDL-R mRNA 的表达, 降低 VCAM-1 的表达, 可调控 LDL-R 及 VCAM-1 的表达, 加速血浆中 LDL 及胆固醇的清除, 防止在细胞内过度积聚, 提示脂脉宁抗动脉粥样硬化作用与其调整脂质代谢、清除氧自由基、调控 LDL-R mRNA, VCAM-1 的表达等作用有关。

[参考文献]

[1] 刘应柯. 脂脉宁胶囊对高脂血症患者脂质代谢、抗氧化及血液流变学影响的临床研究[J]. 新中医, 2005, 37(10): 30.
[2] 谢磊, 刘应柯, 宫瑾瑜. 脂脉宁对 H₂O₂ 诱导 VEC-304 细胞表达 NF-κB 及 HSP-70 的影响[J]. 实用医药杂志, 2009, 26(8): 48.
[3] 刘建文. 药理实验方法学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 258.

[4] Lee Y J, Kang I J, Bungler R, et al. Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2003, 66(2): 91.
[5] Lecras T D, Gherardi E, Bowyer D E. A sensitive Rnase protection assay for the quantitation of the mRNAs for the LDL receptor and HMG-CoA reductase in human total RNA[J]. Atherosclerosis, 1991, 90: 81.
[6] Gebhardt, Petersa, Gerdingd, et al. Rapid quan titation of mRNA species in ethidium bromide stained gelsofcom petitive RT-PCR products[J]. J lipid Res, 1994, 35(6): 976.
[7] Rudlingm, Hepatic mRNA level for the LDL receptor and HMG Co A reductase show coordinate regulation *in vivo* [J]. J lipid Res, 1992, 33(4): 493.
[8] Weidingerff, Mclenachanjm, Cybulskymi, et al. Hypercholes terolemiaen hances macrophage rec-ruitmen tanddys function of regeneratedendo the liumafter balloon injury of therabbi tiliacartery [J]. Circulation, 1991, 84(2): 755.
[9] 徐荣良, 张国元, 秦永文, 等. 高脂兔主动脉黏附分子 VCAM-1 基因表达的研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(12): 950.

[责任编辑 何伟]