

补阳还五汤抗动脉粥样硬化与间隙连接蛋白关系的研究

邱顺辉, 章常华, 高书亮, 刘玉晖*, 杨丹, 彭杏
(江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)致动脉粥样硬化(AS)的保护作用与细胞间隙连接蛋白(connexin, Cx)的关系。方法:将 32 只雄性载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠随机分为模型组、补阳还五汤低、中、高剂量组,以正常雄性 C57BL/6J 小鼠设正常对照组。模型组和治疗组采用 Hcy ig 造模,0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹。造模同时,治疗组分别 ig 补阳还五汤(5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹)。8 周后观察和测量主动脉根部 AS 斑块面积、血管壁面积,检测主动脉组织活性氧(ROS)含量,p38MAPK,ERK,Cx37,Cx43 蛋白表达变化。结果:模型组 AS 病变明显,主动脉组织中 ROS 含量(17.01 ± 1.31) × 10⁵ RFU 与正常对照组 ROS 含量(2.73 ± 0.18) × 10⁵ RFU 相比显著升高(P < 0.01);模型组与正常组比 p38MAPK,ERK,Cx43 蛋白表达明显增高,Cx37 蛋白表达显著降低;不同剂量的补阳还五汤改善 AS 病变的同时显著降低血管组织中 ROS 含量,下调 p38MAPK,ERK,Cx43 的蛋白表达水平,提高 Cx37 蛋白的表达水平。结论:补阳还五汤可能通过拮抗有丝分裂激活蛋白激酶磷酸化水平,改善细胞间隙连接而抗 Hcy 所致动脉硬化的作用。

[关键词] 补阳还五汤;同型半胱氨酸;动脉粥样硬化;间隙连接蛋白;有丝分裂激活蛋白激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0161-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110721.1733.003 **[网络出版时间]** 2011-07-21 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110721.1733.003.html>

Anti-atherosclerosis Effect of Buyang Huanwu Decoction Relates with Connexins

QIU Shun-hui, ZHANG Chang-hua, GAO Shu-liang, LIU Yu-hui*, YANG Dan, PENG Xing
(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jiangxi University of
Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the possible link between preventing effect of Buyang Huanwu decoction (BHD) for atherosclerosis (AS) with connexins (Cx). **Method:** Thirty-two male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into four groups: model group and three dose groups of BHD (5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹). C57BL/6J mice was used to set up a normal control group. AS model was established by intragastric administration of homocysteine (0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹). Meanwhile, treatment groups were intragastric administrated with BHD (5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹). Eight weeks later, the area of atherosclerotic plaques, blood vessel walls and the ratio between them were observed and measured. The aortic ROS content and the expression of MAPKp38, ERK, Cx37, Cx43 were determined. **Result:** Model group showed evident AS lesions differently to the three treatment groups. The model group ROS content was elevated (17.01 ± 1.31) × 10⁵ RFU, compared with that in control group (2.73 ± 0.18) × 10⁵ RFU, showing significant difference (P < 0.01). The MAPKp38, ERK, Cx43 protein expressions were significantly elevated, while Cx37 decreased in the models. Different doses of BHD could decrease ROS content,

[收稿日期] 20110409(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960505);国家科技部 973 计划项目(2010CB530603)

[第一作者] 邱顺辉,研究生,E-mail:qsh85@163.com

[通讯作者] *刘玉晖,博士,副教授,从事中药药理学研究,E-mail:liuyuhui77@126.com.

down-regulate MAPKp38, ERK, Cx43 protein expressions, and up-regulate Cx37 expression. **Conclusion:** BHD could prevent atherosclerosis induced by homocysteine via preventing AMPKs and regulating connexin expression.

[**Key words**] Buyang Huanwu decoction; homocysteine; atherosclerosis; connexins; MAPK

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的升高已成为导致动脉粥样硬化(AS)的一个独立危险因素,实验研究证实高 Hcy 血症引发脂质过氧化、损伤血管内皮细胞、使血小板的黏附性和聚集性增加、对血液流变学的影响以及与自由基的关系等方面的致病机制与气虚瘀血相似^[1],因此许多学者认为高 Hcy 血症的中医病机可归于血瘀范畴。血管壁细胞之间的通讯功能主要由间隙连接(gap junction, GJ)所介导,而血管壁细胞的 GJ 主要由缝隙连接蛋白(connexin, Cx)组成,近年的研究证实 Cx 与 GJ 功能的改变与动脉粥样硬化的发生发展机制中具有重要的意义^[2]。本研究拟通过 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠用 Hcy 复制 AS 模型,研究益气活血化瘀经典复方补阳还五汤对 AS 的防治作用与 Cx 的关系。

1 材料

1.1 药品与试剂 Hcy 购自 Sigma;补阳还五汤(黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 5 g,川芎 3 g,红花 3 g,桃仁 3 g,地龙 3 g)由江西中医学院附属医院提供;抗鼠 p38 MAPK, ERK, Cx37, Cx 43 等一抗购自 Santa Cruz 公司;活性氧(ROS)初级荧光测定试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司,批号 GMS10016.4; Cx37: SC-27715, Cx: SC-14558, ERK: SC-271270, P38MAPK; SC-101427。

1.2 动物 ApoE^{-/-}小鼠, C57BL/6J-12 小鼠, 雄性, 8 周龄, 购自北京大学动物医学部, 许可证号 SCXK(京)2006-0008。

1.3 仪器 IVC-II 型(智能型)独立送风隔离笼具(苏州市冯氏实验动物设施设备有限公司), DYY-7C 型电泳仪(北京市六一仪器厂), 电热蒸馏水器, 隔水式恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), RE52-05 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), 台式高速冷冻离心机(Thermo Scientific Biofuge Stratos), 全自动酶标检测仪(北京中诺远东科技有限公司), VICTOR³ Multilable Plate Counter (Perkin Elmer)。

2 方法

2.1 分组 将 32 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、补阳还五汤低、中、高剂量共 4 组, 以正

常 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠设正常对照组。全部动物饲养于在 IVC-II 型(智能型)独立送风隔离笼具, 喂食 SPF 鼠料, 正常饮水。适应性喂养 5 d 后, 模型组及 3 个给药组上午 ig 1 次, Hcy 0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹, 给药组下午 ig 1 次, 分别给补阳还五汤 5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 8 周。

2.2 标本取材及制备 动物处死前禁食 12 h 以上, 麻醉, 将动物主动脉从根部至髂动脉分叉处离断取出, 将其近心端 1cm 切下, 生理盐水清洗管腔, 10% 福尔马林固定, 进行石蜡切片。其余主动脉在液氮中速冻后, 转存于 -80 °C 冰箱中, 用于 ROS 定量检测和 p38MAPK, ERK, Cx37, Cx43 蛋白的 Western-blot 检测。

2.3 HE 染色与光镜检测 参照文献 [3] 方法, 主动脉根部标本取 600 μm, 间隔 4 μm 进行石蜡连续切片 30 张, 每间隔 10 张取 1 张行 HE 染色, 每张切片 2 个组织面。试验结果图像的采集和分析: 显微镜下分别选取切片 HE 染色的动脉壁, 实验结果经数码相机采集, ×100 倍镜下实域分割, 分别选取所有斑块, Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测量模块计算主动脉根部每一切面横截面 As 改变的面积和管壁面积及其比值并记数。×200 倍镜下观察斑块组织学特点。

2.4 活体组织氧化应激 ROS 含量 根据试剂盒说明, 将组织称重, 清洗, 加入稀释液, 匀浆, 定量, 最后将各血管蛋白调至一致浓度, 各取 50 μL, 加入染色液后于 VICTOR³ Multilable Plate Counter 检测: 激发波长 485 nm, 散发波长 535 nm。

实际 RFU = 样品 RFU - 对照 RFU

2.5 MAPKp38, ERK, Cx37, Cx43 蛋白表达

2.5.1 蛋白提取 取出 -80 °C 冰箱的血管组织, 放入研钵中, 液氮研碎; 加 Western 及 IP 细胞裂解液及 PMSF 配制液, 继续研磨, 至组织样品完全裂解 30 min 后, 即可将裂解液移至 1.5 mL 离心管中置于离心机中 10 000 ~ 14 000 × g 离心 3 ~ 5 min, 取上清, 分装保存于 -80 °C 冰箱。

2.5.2 电泳, 转膜, 孵育, 显影 蛋白定量后, 采用十二烷基硫酸钠-变性聚丙烯酰胺凝胶不连续缓冲

系统,进行电泳。然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,将 PVDF 膜放入抗鼠 p38 MAPK,ERK,Cx37,43 等一抗(1:400)中孵育,4 ℃ 过夜,清洗,加入二抗 Donkey anti-goat IgG-HRP (santa cruz 1:5 000)常温下孵育 1 h,清洗,显影。

2.6 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS 11.5 软件,计量资料组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计意义。

3 结果

3.1 HE 染色观察和动脉粥样硬化面积测量 主动脉 HE 染色显示,对照组 C57BL/6J 小鼠主动脉内膜较薄,结构完整,中膜平滑肌细胞排列规则,内膜下无脂质沉积,未见泡沫细胞形成等动脉粥样硬化改变。模型组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉内膜增厚、隆起、内皮细胞部分脱落,内皮下间隙明显增宽,大量泡沫

细胞形成和堆积,突向管腔,中膜平滑肌细胞增生并且排列紊乱;补阳还五汤高剂量组:内膜较薄,内皮细胞基本完好未见明显脱落,内皮下间隙未见明显增宽,中膜无明显增厚,平滑肌细胞增生不明显,细胞数目接近正常,排列较规则;补阳还五汤中、低剂量组,AS 病变较模型组明显减轻。统计结果显示,与正常组相比,模型组血管壁面积和 AS 面积增加($P < 0.01$);与模型组相比,补阳还五汤 3 个剂量组血管壁面积和 AS 面积都有减小($P < 0.01$);与模型组相比,补阳还五汤中、高剂量组 AS 面积/血管壁面积比值减小($P < 0.01$)(表 1)。

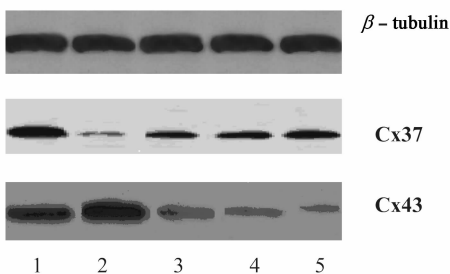
3.2 ROS 含量测定 与正常组相比,模型组 ROS 含量明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,补阳还五汤 3 个剂量组含量都有降低($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 各组血管壁面积、AS 面积、AS 面积/血管壁面积以及 ROS 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	血管壁面积 /像素	AS 面积 /像素	AS 面积/血管壁面积 /像素	ROS 含量 /RFU × 10 ⁵
正常对照	-	31 168 ± 5 079	0	0	2.73 ± 0.18
模型	-	78 758 ± 12 668 ¹⁾	19 533 ± 8 177 ¹⁾	0.21 ± 0.09	17.01 ± 1.31 ¹⁾
补阳还五汤	5	50 752 ± 7 039 ²⁾	12 216 ± 5 201 ²⁾	0.24 ± 0.10	13.16 ± 0.89 ²⁾
	10	40 033 ± 6 999 ²⁾	4 510 ± 1 439 ²⁾	0.11 ± 0.02 ²⁾	3.44 ± 0.19 ²⁾
	20	36 528 ± 7 477 ²⁾	1 865 ± 827 ²⁾	0.05 ± 0.22 ²⁾	2.44 ± 0.20 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 Cx 蛋白表达情况 与对照组相比,模型组血管组织中的 Cx43 蛋白表达显著增高,而不同剂量的补阳还五汤组均能降低 3 个蛋白的表达,其中以高剂量 20 g·kg⁻¹ 的补阳还五汤最为显著;与对照组相比,Cx37 蛋白表达明显降低,而不同剂量补阳还五汤均能提高其表达,以高剂量 20 g·kg⁻¹ 最为明显。见图 1。



1. 对照组; 2. 模型组; 3. 补阳还五汤 5 g·kg⁻¹ 组; 4. 补阳还五汤 10 g·kg⁻¹ 组; 5. 补阳还五汤 20 g·kg⁻¹ 组(图 2 同)

图 1 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 Cx 蛋白表达

3.4 p38MAPK, ERK 蛋白表达 与对照组相比,模型组血管组织中的 p38MAPK、ERK 蛋白表达显著增高,而不同剂量的补阳还五汤组均能降低 3 个蛋白的表达,其中以高剂量 20 g·kg⁻¹ 的补阳还五汤最为显著。见图 2。

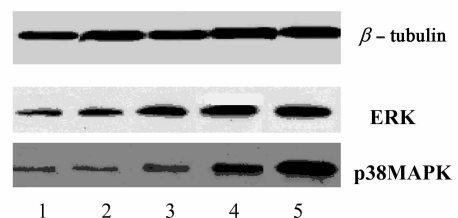


图 2 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 ERK, p38MAPK 蛋白表达

4 讨论

祖国医学认为 AS 属中医的“眩晕”、“头痛”、“呆病”等范畴,基本病机为本虚标实。本实验采用 Hey ig ApoE^{-/-} 小鼠,8 周后处死动物,主动脉经 HE 染色后显微镜下观察发现,模型组主动脉内膜增厚、

隆起、内皮细胞部分脱落,内皮下间隙明显增宽,大量泡沫细胞形成和堆积,突向管腔,中膜平滑肌细胞增生并且排列紊乱,且与正常组相比,模型组小鼠 AS 面积/血管壁面积之比差异显著。而益气活血的代表方剂补阳还五汤高、中、低剂量明显改善血管内皮损伤引发的 AS 病变。

GJ 所介导的连接通讯进行着信息、能量和物质的交换,对维持细胞间信息的传递,调节细胞增殖、分化及维持组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用^[4]。GJ 由排列整齐且紧密相邻的通道组成,每个通道是由相邻细胞膜的两个连接子(connexons, Cx)构成,内皮细胞主要表达 Cx37, Cx40, Cx43, 平滑肌细胞则主要表达 Cx43, Cx45^[5]。本实验中发现,与正常组相比,模型组 Cx37 蛋白表达明显减少, Cx43 蛋白表达与正常组相比有所升高。给药补阳还五汤后 Cx37 蛋白表达与模型组相比,都有升高,高剂量组比较明显, Cx43 蛋白表达与模型组相比都有减少,高剂量减少较明显。因此补阳还五汤可以通过提高 AS 拮抗因子 Cx37 的表达,减少 AS 保护因子 Cx43 来防治 AS。研究显示, Cx37 基因缺失(Cx37^{-/-})的 ApoE^{-/-}小鼠与正常组(Cx37^{+/+} ApoE^{-/-})相比, Cx37^{-/-}加速了 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化^[6]。LDLR^{-/-}小鼠喂食高胆固醇饮食后,早期动脉粥样硬化病变中,内膜平滑肌 Cx43 表达增加^[7]。

Hcy 的升高已成为 AS 的独立危险因素, Hcy 可以通过激动体内重要的氧化酶——烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(NADPH Oxidase),产生大量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),导致内皮细胞功能改变甚至引发内皮细胞的凋亡^[8]。在本实验中,我们发现模型组小鼠在给 Hcy 后,与正常组相比, ROS 含量急剧升高($P < 0.01$),与文献报道一致。

有丝分裂原激活的蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是信息传递途径的交汇点和共同通路,包括细胞应激反应、增殖、分化和凋亡等。研究显示,在 Klotho^(-/-)(ROS 高表达)小鼠中,氧化应激水平的升高可以直接导致 p38MAPK 的激活^[9]; ROS 的产生对 ERK 途径的活化同样起到重要的作用^[10]。而多种蛋白激酶可直接或间接磷酸化连接蛋白,从而影响细胞连接通讯的功能。壬基酚与甲萘醌可分别通过 p38MAPK、

ERK 途径使 Cx43 发生脱磷酸化,从而下调 GJ 功能^[11-12]。本实验中我们发现与正常组相比, ROS 急剧升高的模型组中 p38MAPK, ERK 表达水平随着升高,提示 ROS 可能参与激活 p38MAPK, ERK 途径,引起下游反应。补阳还五汤干预后, ROS 含量较模型组减少, p38MAPK, ERK 蛋白表达水平也降低,与 Cx 蛋白表达变化一致。

本研究结果表明,补阳还五汤可以降低 Hcy 所致 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中 ROS 含量的升高,下调 p38MAPK 和 ERK 蛋白表达,进而提高 Cx37 表达,降低 Cx43 的表达,改善 GJIC 功能,从而保护血管内皮功能而拮抗 AS 的作用。可见,补阳还五汤能明显抑制 Hcy 所致 ApoE^{-/-}小鼠 AS 病变与抑制氧化应激以及改善 Cx 的功能有关。

[参考文献]

- [1] 杨瑞雪,张继东,张维东,等. 益肾活血胶囊对同型半胱氨酸血症大鼠生长因子的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2007,45(4):412.
- [2] Brisset A C, Isakson B E, Kwak B R. Connexins in vascular physiology and pathology[J]. Antioxid Redox Signal, 2009,11(2):267.
- [3] 程军,李金平. ApoE 基因敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠血脂及主动脉组织病理学的对比观察[J]. 实验动物学,2008,25(2):4.
- [4] Leybaert L, Braet K, Vandamme W, et al. Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release[J]. Cell Commun Adhes,2003,10(4/6):251.
- [5] Bolon M L, Ouellette Y, Li F, et al. Abrupt reoxygenation following hypoxia reduces electrical coupling between endothelial cells of wild-type but not connexin40 null mice in oxidant-and PKA-dependent manner[J]. FASEB J,2005,19(12):1725.
- [6] van Rijen H V, van Kempen M J, Postma S, et al. Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40, and connexin37 in human umbilical vein endothelial cells[J]. Cytokine,1998, 10(4):258.
- [7] Kwak B R, Mulhaupt F, Veillard N, et al. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002, 22(2):225.
- [8] 徐雅琴,张钧话,柯杨,等. 牛磺酸对同型半胱氨酸致人血管内皮细胞损伤的拮抗作用[J]. 中华医学杂志,2000,80(2):151.

忍冬叶黄酮-磷脂复合物的降血脂作用

姜洪芳^{1,2}, 石宝俊², 赵伯涛², 张玖², 张卫明^{1,2*}

(1. 南京师范大学, 南京 210046; 2. 南京野生植物综合利用研究院, 南京 210042)

[摘要] **目的:** 研究忍冬叶黄酮-磷脂复合物对高脂饲料喂养鹌鹑高血脂症的影响。**方法:** 健康雄性鹌鹑 80 只, 随机分成 6 组, 任意取 1 组设定为正常对照组喂以基础饲料, 其他 5 组均喂高脂饲料, 12 d 后检测动物颈静脉血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量, 确定已经造成高血脂模型后, 喂食含忍冬叶总黄酮(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、忍冬叶黄酮-磷脂复合物高、低剂量(80, 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)的高脂饲料, 45 d 后检测颈静脉血清 TC, TG, 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量及肝脏中脂肪含量; 观察肝组织切片。**结果:** 与高脂模型组比较, 忍冬叶黄酮-磷脂复合物高、低剂量组(80, 20 mg·kg⁻¹)对血清 TC 降低作用明显, 降低率分别为 55.58%, 24.91%, 剂量间有高度显著性差异($P < 0.01$); 忍冬叶黄酮-磷脂复合物能减轻肝细胞水肿和脂肪浸润, 使肝脏脂肪含量显著下降($P < 0.05$)。**结论:** 忍冬叶黄酮-磷脂复合物具有降血脂和抗脂肪肝作用。

[关键词] 总黄酮; 黄酮-磷脂复合物; 忍冬; 高血脂症; 脂肪肝

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0165-04

Effect of Flavonoid-phospholipid Complex from *Lonicera japonica* on Hyperlipidemia

JIANG Hong-fang^{1,2}, SHI Bao-jun², ZHAO Bo-tao², ZHANG Jiu², ZHANG Wei-ming^{1,2*}

(1. Life Science Institute of Nanjing Normal University, Nanjing 210046 China;

2. Nanjing Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

[Abstract] **Objective:** To study the lipid-lowering effects on flavonoid-phospholipid complex from *Lonicera japonica* Thunb in quails fed with high lipid food. **Method:** Eighty quails were randomly divided into 6 groups, one normally fed control group and other 5 groups. The quails in the 5 groups were fed with high lipid food for 12 days

[收稿日期] 20101227(012)

[基金项目] 中华全国供销合作总社社会发展项目(2008GYF0815)

[第一作者] 姜洪芳, 副研究员, 从事植物有效物质开发利用研究, Tel: 025-85472692, E-mail: jhf74@163.com

[通讯作者] * 张卫明, 研究员, 博导, 主要研究植物活性成分开发与应用, E-mail: botanyzh@163.com

[9] C C Hsieh, Makoto Kuro-o, Kevin P Rosenblatt. The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging[J]. Aging (Albany NY), 2010, 2(9): 597.

[10] Hsieh H L, Wang H H, Wu W B, et al. Transforming growth factor- β_1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes; roles of ROS-dependent ERK and JNK-NF- κ B pathways [J]. J Neuroinflammation, 2010, 6(7): 88.

[11] Aravindakshan J, Cyr D G. Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mito gen-activated protein kinase pathway[J]. Biol Rep Rod, 2005, 72(5): 1232.

[12] Abdelmohsen K, von Montfort C, Stuhlmann D, et al. Doxorubicin induces EGF receptor-dependent downregulation of gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells [J]. Biol Chem, 2005, 386(3): 217.

[责任编辑 聂淑琴]