

· 博士之窗 ·

绞股蓝总甙对高脂诱导动脉粥样硬化
大鼠炎性分子表达的影响

权 媛 钱民章

摘要 目的 研究绞股蓝总甙(gyrenosides, GP)对高脂诱导动脉粥样硬化(AS)大鼠病变部位炎性因子表达的影响及可能机制。**方法** 采用高脂饲料喂饲和腹腔注射维生素 D₃ 建立大鼠 AS 模型。60 只雄性健康 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、GP 3 个剂量组、辛伐他汀组。7 周后处死大鼠,光镜下观察胸主动脉病理学改变;免疫组织化学染色法检测主动脉壁细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和核因子 κ B p65(NF- κ B p65)的表达;ELISA 法测定血清氧化型低密度脂蛋白水平(ox-LDL);比色法测定血清总抗氧化能力、硫代巴比妥酸法测定血清丙二醛(MDA)水平。**结果** 与模型组比较,GP 各剂量组可减轻 AS 病变;下调主动脉壁 ICAM-1、MCP-1 和 NF- κ Bp65 的表达($P < 0.01$);降低血清 MDA、ox-LDL 水平($P < 0.01$),升高血清总抗氧化水平($P < 0.01$)。**结论** GP 可下调 ICAM-1 及 MCP-1 的表达、抑制实验性大鼠 AS 病变的形成,其机制可能与其抗氧化进而抑制 NF- κ B 的激活有关。

关键词 病理生理学;动脉粥样硬化;绞股蓝总甙;氧化应激;炎症

Effect and Mechanism of Gypenosides on the Inflammatory Molecular Expression in High-fat Induced Atherosclerosis Rats QUAN Yuan and QIAN Min-zhang *Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Guizhou (563003)*

ABSTRACT Objective To evaluate the effect and possible mechanism of gypenoside (GP) on expression of inflammatory factors in aortic lesion of rats with high-fat induced atherosclerosis. **Methods** Atherosclerotic rat model was established by feeding high-fat diet and intraperitoneal injection of vitamin D₃. Sixty healthy male SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, the simvastatin treated group and the three GP groups treated respectively with different dosages of GP. Rats were sacrificed 7 weeks later, their histopathological changes in thoracic aorta were observed by light microscope; expressions of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) in aortic wall were detected by immunohistochemistry; serum level of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) was determined by ELISA; serum total antioxidant capacity determined by colorimetry, and serum malondialdehyde (MDA) level determined by Thiobarbituric acid method. **Results** In comparing with the model group, GPS showed actions in lessening the atherosclerosis lesion; reducing expressions of ICAM-1, MCP-1 and NF- κ Bp65 in aortic wall ($P < 0.01$) and serum levels of MDA, ox-LDL ($P < 0.01$), as well as increasing the serum level of total antioxidant capacity ($P < 0.01$). **Conclusion** GP can down-regulate the expressions of ICAM-1 and MCP-1, inhibit the atherosclerosis formation in experimental rats, its mechanism might be related with its anti-oxidation effect and further inhibiting on the NF- κ B activation.

KEYWORDS pathophysiology; atherosclerosis; gypenosides; oxidative stress; inflammation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一类多病因相互作用而产生的疾病。大量的研究表明,氧化

基金项目:贵州省科技厅资助项目(No. 黔科合 J 字[2009]2178 号)

作者单位:遵义医学院生化教研室(贵州 563003)

通讯作者:钱民章, Tel: 0852 - 8609792, E-mail: qian_mzh@ hot-mail.com

应激在 AS 中扮演重要角色^[1]。氧化应激是过量的活性氧与内源性清除活性氧的抗氧化系统间失去平衡。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)可以激活核因子 κ B(nuclear factors- κ B, NF- κ B)等炎症信号转导通路,诱导对氧化还原敏感的基因,如细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的

表达,从而加重血管内皮的炎症损伤,促进 AS 的形成^[2,3]。

近 20 年来,国内外学者对中药绞股蓝进行了大量研究^[4],发现其主要药效成分为绞股蓝总甙(gypenosides,GP)。研究表明,GP 通过降脂、抗血小板聚集、抗血栓等多方面发挥抗 AS 的作用^[5],由此研发的中成药绞股蓝总甙片(胶囊)临床广泛用于防治高脂血症、AS 等疾病,取得可喜疗效。但对于 GP 抗 AS 作用的细胞分子机制所知甚少。GP 能否通过抗氧化应激作用抑制炎症分子表达,从而发挥抗 AS 的效应。本研究对此进行了探讨。

材料与方法

1 动物 60 只 SPF 级健康 SD 大鼠,雄性,体重(210±10)g,第三军医大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXKC(渝)2007-005。饲养条件:室温(22±4)℃,光照与黑暗循环时间为 12 h。

2 药物 GP 为浅黄色精细干粉制剂,纯度≥98%(西安赛邦医药科技有限公司);辛伐他汀(每片 5 mg,海南海灵制药有限公司,批号:071222);维生素 D₃注射液(每支 30 万 IU,江苏吴中医药集团有限公司,批号:070601);丙基硫氧嘧啶(每片 50 mg,上海复星朝晖药业有限公司,批号:08070)。

3 试剂与仪器 goat anti-rat ox-LDL 试剂盒(美国 ADL 公司产品);总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供;兔抗 ICAM-1、MCP-1、NF-κB p65 多克隆抗体(北京博奥森公司产品)、SABC 试剂盒(武汉博士德公司产品);胆固醇和胆酸钠(北京爱普华美生物科技有限公司产品),其他试剂均为国产分析纯。Olympus AU5400 全自动生化分析仪,日本 Olympus 公司产品;Leica DM2500 数字图像分析系统,德国 Leica 公司产品;ELX800 酶联免疫检测仪(美国 BioTek 公司产品);721 分光光度计(上海菁华仪器有限公司产品)。

4 AS 模型建立、分组及给药方法 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常对照(A)组、模型(B)组、GP 小、中、大 3 个剂量(C、D、E)组、辛伐他汀(F)组。A 组饲以普通标准饲料,其余各组饲以高脂饲料(3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.02%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、81.3%标准饲料)。喂食开始,同时腹腔注射维生素 D₃注射液 60 万 IU/kg,每隔 30 天重复注射维生素 D₃ 30 万 IU/kg,对照组腹腔注射同等体积的生理盐水。根据人体实验剂量和成人与大鼠的体重折算

系数折算成大鼠用药量^[6]。造模同时灌胃给 GP, C 组每天 40 mg/kg、D 组每天 80 mg/kg、E 组每天 160 mg/kg、F 组给予辛伐他汀,每天 5 mg/kg、A、B 组每天灌服 10 mL/kg 的生理盐水,每周称体重调整用药量,连续灌胃 7 周。

5 观察项目及检测方法

5.1 血清 T-AOC、MDA 含量测定 采用比色法检测血清中 T-AOC。血清测试前 2000 r/min,离心 10 min,与测试试剂充分混匀,放置 10 min,双蒸水调零,1 cm 光径,520 nm 处,测各管吸光度。采用硫代巴比妥法测定血清中 MDA 含量,532 nm 波长处测定其吸光度。具体操作步骤及计算公式严格参照试剂盒说明书进行。

5.2 血清氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)浓度测定 采用双抗夹心 ELISA 检测试剂盒,抗大鼠 ox-LDL 单抗包被于酶标板上。实验前试剂盒应平衡至室温(20~25℃),临用前 15 min 配制工作液。操作步骤参照试剂盒说明书进行。

5.3 大鼠胸主动脉 ICAM-1、MCP-1、NF-κB 表达检测 采用免疫组织化学染色法。每只大鼠胸主动脉连续切片,间隔 50 μm 连续 6 张切片,切片厚度 3 μm,常规脱蜡至水,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,高压抗原修复,5%正常山羊血清封闭。滴加一抗分别为兔抗 ICAM-1(1:100)、MCP-1(1:100)、NF-κBp65(1:50)多克隆抗体,4℃过夜。每组均以 PBS 代替一抗作为阴性对照。然后滴加生物素标记羊抗兔二抗,再滴加链霉亲和素-生物素复合物。DAB 显色,镜下控制显色时间,苏木精复染、脱水、透明、封片。每张切片选取 3 个不同的视野(左上,右上,中下),计算机图像分析仪测定阳性产物的平均光密度(integral optical density, IOD)。

6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 15.0 统计软件处理。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 胸主动脉病理学改变结果(图 1) A 组:血管壁层次清晰,内膜表面光滑完整,平滑肌层均匀、厚度正常,外层结缔组织未见异常变化;B 组:动脉内皮细胞脱落,内膜增厚,纤维化,出现了显著 AS 病变,斑块中大量泡沫细胞、脂质沉积,炎性细胞聚集,中膜严重萎缩、钙化,血管壁三层结构不清晰;C 组:动脉壁薄厚不均匀,内膜可见轻度隆起、增厚,亦见散在斑块生长,中膜可见大小不等的钙化灶,外膜结缔组织层变薄;D

组:动脉壁薄厚不均匀,内膜可见轻度隆起、增厚,可见泡沫细胞,平滑肌细胞排列较乱,外膜结缔组织层变薄;E 组:动脉壁薄厚较均匀,内膜较光滑,增厚不明显,比较完整,中膜平滑肌细胞排列基本整齐,但有些仍可见纵横交错,外膜结缔组织无明显变化;F 组:动脉壁薄厚较均匀,内膜较光滑,增厚不明显,比较完整,中膜平滑肌细胞排列基本整齐,外膜结缔组织无明显变化。

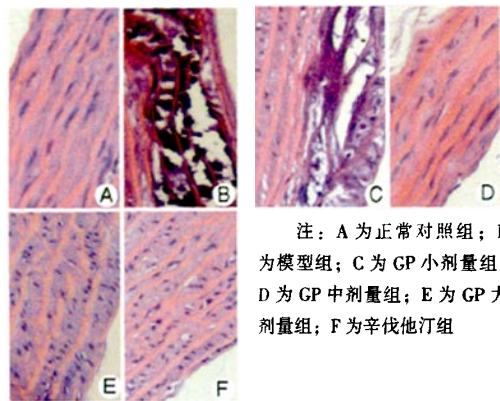


图 1 各组大鼠胸主动脉 AS 病变结果
(苏木精-伊红染色, ×200)

2 各组大鼠 ICAM-1、MCP-1 及 NF-κB p65 测定结果比较(表 1) A 组 ICAM-1、MCP-1 在主动脉内膜核中膜细胞胞浆内不表达或弱表达;而在 B 组的表达明显高于 A 组($P < 0.01$);与 B 组比较,C、D、E、F 组 ICAM-1、MCP-1 阳性表达明显减少($P < 0.01$)。D 组 ICAM-1、MCP-1 阳性表达水平显著低于 C 组($P < 0.01$);E 组 ICAM-1、MCP-1 表达水平低于 D 组($P < 0.01$);其余各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。A 组 NF-κB p65 在主动脉内皮细胞和平滑肌细胞胞核和胞浆中弱表达或不表达;B 组 NF-κB p65 在主动脉内皮细胞和平滑肌细胞胞核和胞浆中阳性表达明显高于 A 组($P < 0.01$);与 B 组比较,C、D、E、F 组 NF-κB p65 阳性表达明显减少($P < 0.01$);D 组 NF-κB p65 阳性表达水平低于 C 组($P < 0.01$);E 组 NF-

表 1 各组大鼠 ICAM-1、MCP-1 及 NF-κB p65
测定结果比较 (×10⁴, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ICAM-1	MCP-1	NF-κB p65
A	8	0.34 ± 0.10	0.36 ± 0.07	0.38 ± 0.10
B	8	1.52 ± 0.24 [*]	1.40 ± 0.21 [*]	1.60 ± 0.25 [*]
C	9	1.14 ± 0.14 [△]	1.14 ± 0.38 [△]	1.20 ± 0.20 [△]
D	8	0.78 ± 0.17 ^{△△}	0.80 ± 0.25 ^{△△}	0.78 ± 0.10 ^{△△}
E	10	0.62 ± 0.15 ^{△○}	0.58 ± 0.12 ^{△○}	0.61 ± 0.16 ^{△○}
F	9	0.58 ± 0.11 ^{△△}	0.57 ± 0.16 ^{△△}	0.60 ± 0.17 ^{△△}

注:与 A 组比较,^{*} $P < 0.01$;与 B 组比较,[△] $P < 0.01$;与 C 组比较,^{△△} $P < 0.01$;与 D 组比较,^{△○} $P < 0.01$;下表同

κB p65 阳性表达水平低于 D 组($P < 0.05$)。
3 各组大鼠血清 T-AOC、MDA 及 ox-LDL 水平比较(表 2) 与 A 组比较,B 组 T-AOC 水平明显下降($P < 0.01$),MDA、ox-LDL 水平明显升高($P < 0.01$);各治疗组 AS 大鼠的 T-AOC 增强,表现为血清 T-AOC 水平高于 B 组($P < 0.01$),MDA、ox-LDL 生成水平显著低于 B 组($P < 0.01$);D 组 T-AOC 水平升高,MDA、ox-LDL 水平降低,与 C 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);E 组 MDA 水平显著低于 D 组($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血清 T-AOC、MDA 及 ox-LDL
水平比较 (×10³, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	T-AOC (U/L)	MDA (nmol/L)	ox-LDL (μg/L)
A	8	19.04 ± 1.46	3.96 ± 0.55	4.94 ± 1.12
B	8	6.09 ± 1.83 [*]	15.51 ± 1.50 [*]	12.30 ± 1.11 [*]
C	9	9.77 ± 1.13 [△]	12.60 ± 0.79 [△]	11.12 ± 1.08 [△]
D	8	12.24 ± 1.05 ^{△△}	8.93 ± 0.44 ^{△△}	9.78 ± 0.81 ^{△△}
E	10	13.06 ± 1.41 [△]	7.09 ± 0.54 [△]	9.47 ± 0.95 [△]
F	9	12.96 ± 1.45 [△]	7.17 ± 0.48 [△]	9.53 ± 1.27 [△]

讨 论

GP 是从中药绞股蓝中提取出的有效成分群,由 80 余种具有人参皂甙基本结构的单体皂甙组成,均属甾萜脂烷醇类结构。基础研究及临床试验证实^[7,8],GP 具有降脂抗 AS 作用。本实验病理学检查进一步证实,GP 对大鼠 AS 病变的形成有显著的抑制作用。辛伐他汀作为调脂药,可通过抗炎及改善内皮功能以外的作用延缓 AS 的进程^[9]。本实验将辛伐他汀作为阳性对照药物比较发现:GP 中剂量组与辛伐他汀抗 AS 效应相似;而 GP 小剂量组病变程度较辛伐他汀组重。提示 GP 抗大鼠 AS 的作用具有一定的剂量依赖性。

ICAM-1 几乎参与单核细胞在血管内皮黏附、募集以及向内皮下迁移和泡沫化的全过程,由此引发了 AS 病变的形成与发展^[10]。据报道,ICAM-1 在 AS 患者的斑块中有高表达,在大鼠和兔的脂质条纹中亦有大量表达^[11]。MCP-1 是作用很强的单核细胞趋化因子,可在多种细胞尤其是构成 AS 病变的三种主要细胞:单核细胞、内皮细胞和平滑肌细胞中表达^[12]。它不仅特异性地招募血液中的单核细胞迁移至内皮下,吞噬脂质形成泡沫细胞,还能诱导超氧阴离子产生,对血管平滑肌细胞有促增殖作用,并促进组织因子的生成^[13],诱导内皮细胞凋亡^[14],从而直接或间接地参与了 AS 的形成。本实验免疫组化结果提示,GP 可抑制主动脉病变处导致 AS 发生的 ICAM-1、MCP-1 的表达。

NF-κB 是一种由 Rel 家族蛋白(包括 p50 和 p65)构成的同源或异源性二聚体转录因子,是参与机体免

疫和炎症分子表达调控的主要转录因子^[15]。静息细胞中 NF- κ B 以非活性形式存在于胞浆中,当受到氧化应激、ox-LDL、细胞因子等刺激时,NF- κ B p65-p50 异源二聚体活化进入核内,引起 NF- κ B 激活^[16],继而作用于靶基因,迅速诱导基因表达。目前已经证实的 NF- κ B 靶基因有 ICAM-1、MCP-1 及血管细胞间黏附分子等^[17]。为了进一步了解 GP 抑制炎症因子表达可能的机制,本实验检测了 GP 对 AS 大鼠主动脉壁 NF- κ B p65 表达的影响。结果表明其能有效下调 AS 大鼠主动脉壁 NF- κ B p65 的表达,提示 GP 抑制炎症分子 ICAM-1、MCP-1 的表达与其抑制 NF- κ B 的活化密切相关。

越来越多的事实说明,在 AS 的发生发展中,氧化应激起主要作用^[18]。T-AOC 是反映机体整体水平上抗氧化水平高低的重要指标。MDA 含量的增减代表着脂质过氧化作用的强弱,是反映氧化应激较好的指标^[19]。ox-LDL 是低密度脂蛋白的氧化修饰产物,它是致 AS 形成的关键因素。本实验中检测到大鼠经高脂饲养后血清 T-AOC 水平明显下降,而 MDA 及 ox-LDL 的水平明显增高,表明大鼠在高脂饮食的诱导下产生了大量的脂质过氧化物,抗氧化能力降低,机体有氧化应激表现。进一步证实血脂异常与氧化应激-炎症之间有密切关系。本实验观察到 GP 处理后,大鼠的 T-AOC 水平上升,MDA 及 ox-LDL 水平则降低,提示 GP 在 AS 大鼠体内起着抗氧化作用。

综合上述实验结果,GP 可下调 ICAM-1 及 MCP-1 的表达、抑制实验性大鼠 AS 病变的形成,其机制可能与其发挥抗氧化作用抑制高脂大鼠体内 ROS 的生成,抑制低密度脂蛋白氧化为 ox-LDL,进而抑制 NF- κ B 的激活有关。这些结果对认识 GP 的作用机理及拓宽临床应用有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease[J]. Circ Res, 2000, 8(6):494-501.
- [2] Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 2(4):85-97.
- [3] Madamanchi N, Vendrov A, Runge S. Oxidative stress and vascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(2):29-38.
- [4] 陈震. 北京引种的纹股蓝化学成分含量分析[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(10):597-599.
Chen Z. Beijing introduction of content analysis of chemical constituents of *Gynostemma pentaphyllum*[J]. Chin J Tradit Chin Med, 1996, 21(10):597-599.
- [5] Roberts EL, Sick TJ. Glucose enhances recovery of potassium homeostasis and synaptic excitability after anoxia in hippocampal slices[J]. Brain Res, 1992, 570(3):225-230.
- [6] 徐淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2002:202-204.
Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of pharmacological experiment[M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2002:202-204.
- [7] 黄红林,廖端芳,陈剑雄. 纹股蓝总皂甙对兔实验性动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(4):287-291.
Huang H L, Liao DF, Chen JX. Effect of gypenosides oil formation of atherosclerotic plaque of aorta in hypercholesterolemic rabbits[J]. Chin J Arterioscler, 1998, 6(4):287-291.
- [8] 史晓,朱亮,祁丽丽. 纹股蓝总苷对颈动脉粥样硬化的干预作用研究[J]. 中国基层医药, 2006, 13(7):1207.
Shi X, Zhu L, Qi LL. Study on intervention effect of gypenosides on carotid atherosclerosis[J]. Chin J Prim Med Pharm, 2006, 13(7):1207.
- [9] Masaru Y. Potential role of statin in inflammation and atherosclerosis[J]. Ather Thro, 2003, 10(3):140-144.
- [10] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulated mononuclear leukocyte adhesion molecule in rabbit aortic endothelium[J]. Atheroscler Thromb, 1993, 13(2):197-204.
- [11] Weber C, Erl W. Effect of oxidized low-density lipoprotein, lipid mediators statins on vascular interaction[J]. Clin Chem Lab Med, 1999, 37(3):243-251.
- [12] Reape T, Groot H. Chemokines and atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1999, 147(2):213-225.
- [13] Selzman CH, Miller SA, Zimmerman MA, et al. Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation[J]. Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(4):H1455-H1461.
- [14] 李琴山,刘洋,冯赞杰,等. 单核细胞趋化蛋白-1 能诱导人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(17):1682-1684.
Li QS, Liu Y, Feng ZJ, et al. Monocyte chemotactic protein-1 induces the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells[J]. Acta Acad Med Milit Tert, 2007, 29(17):1682-1684.
- [15] Rahman L, MacNee W. Role of transcription factor in inflammatory lung disease[J]. Thorax, 1998, 53(2):601-612.
- [16] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system[J]. Ann Rev Immunol, 1994, 12(4):141-179.
- [17] Baeuerle PA, Baltimore D. A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor[J]. Science, 1988, 242(2):540-546.
- [18] 陈瑗,周玫. 自由基-炎症与衰老性疾病[M]. 北京:科学出版社,2007:252-287.
Chen Y, Zhou M. Radical-inflammation and diseases of aging[M]. Beijing: Science Press, 2007:252-287.
- [19] 冯毅,王积慧,沈成兴,等. 急性冠状动脉综合征患者血浆蛋白氧化产物升高的机制及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(11):983-985.
Feng Y, Wang JH, Shen CX, et al. The role of advanced oxidation protein products in acute coronary syndrome[J]. Chin J Arterioscler, 2006, 14(11):983-985.

(收稿:2009-10-02 修回:2010-01-02)