

绞股蓝总皂甙对实验性动脉粥样硬化 家兔血清一氧化氮及过氧化脂质的影响*

廖端芳 尹卫东^① 陈剑雄 滕华^① 唐小卿 李波平^① 余麟

(衡阳医学院心肺药理研究室,^①心血管病研究所, 衡阳 421001)

Effect of Gypenosides on Nitric Oxide and Lipid Peroxidation in Blood-serum of Diet-induced Atherosclerotic Rabbit

LIAO Duan-Fang, YIN Wei-Dong^①, CHEN Jian-Xiong, TEN Hua^①, TAN Xiao-Qing, LI Bo-Ping^①
and YU Lin

(Department of Cardiopulmonary Pharmacology, ^① Institute
of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College,
Hengyang 421001, China)

ABSTRACT We reported the effects of gypenosides (GPS) on serum levels of nitric oxide (NO), lipid peroxidation (LPO) and superoxide dismutase (SOD) in atherosclerotic rabbit induced by high cholesterol diet. The results showed that GPS 60 mg · d⁻¹ fed in company with 1% cholesterol for 8 weeks and GPS 120 mg · d⁻¹ orally administrated for 4 weeks after development of aortic lesion could significantly protect the activity of NO and SOD, decrease the LPO content as well as lower the serum levels of total cholesterol and triglyceride.

KEY WORDS Gypenosides; Atherosclerosis; Nitric oxide; Lipid peroxidation; Rabbit

摘要 本实验在新西兰兔高脂饮食性动脉粥样硬化模型上,观察了绞股蓝总皂甙预防性给药和治疗性给药对血清一氧化氮、胆固醇及过氧化脂质的影响。发现绞股蓝总皂甙(60 mg · d⁻¹)与1%胆固醇同时喂养或喂胆固醇4周后以绞股蓝总皂甙(120 mg · d⁻¹)治疗4周均能有效抑制高脂所致的血清一氧化氮降低和过氧化

脂质升高,并能保护超氧化物歧化酶活性和降低血清总胆固醇及甘油三酯的水平。

关键词 绞股蓝总皂甙; 动脉粥样硬化; 一氧化氮; 脂质过氧化; 兔

绞股蓝总皂甙(gypenosides, GPS)系从葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum*, Thumb, makino)中提取的有效成份。文献报道高脂血症病人服用绞股蓝胶囊(120 mg · d⁻¹)1个月,其血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglycerides, TG)明显降低,高密度脂蛋白胆固醇明显增高^[1]。李林等^[2]发现绞股蓝总皂甙能抑制离体大鼠肝脏脂质过氧化。近年,我室在离体兔胸主动脉和脑基底动脉灌注模型、离体心乳头肌及大鼠脑动脉栓塞等不同层次的模型上,研究发现GPS具有抗内、外源性氧自由基(oxygen free radicals, OFR)损伤和抗膜脂质过氧化作用^[3,4]。但在高脂血症等病理条件下,能否维护机体抗氧化损伤系统的正常功能、防止或消除脂质在动脉壁沉积、保护血管壁和心肌组织免受过氧化损伤,尚不清楚。我们在食饵性动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)模型上,对此进行了系统探讨。本文观察了GPS预防性给药和治疗性给药对血清一氧化氮(nitric oxide, NO)和过氧化脂质(lipid peroxidation, LPO)含量、血清胆固醇水平及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

* 湖南省教委资助课题

GPS(湖南省医药工业研究所药理室赠送),硫代

巴比妥酸(Fluka),其余均为市售分析纯。

1.2 新西兰兔食饵性动脉粥样硬化模型

雄性新西兰白兔(上海实验动物中心引进)23只,体重 2.2 ± 0.3 kg,单笼喂养,饮水不限;观察1周,未见异常表现;即取空腹静脉血测TC和TG。按血脂均匀分配的原则进行分组(Table 1)。正常对照组5只,喂普通标准饲料;高胆固醇组8只,喂含1%胆固醇饲料;高胆固醇+GPS预防组5只,GPS($60 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)和1%胆固醇同时喂养;高胆固醇+GPS治疗组5只,实验前五周喂养同高胆固醇组,第6~9周每天加120 mg GPS。第5周末处死高胆固醇对照组2只动物,取出其主动脉组织用苏丹IV染色见其有早期As斑块后,遂开始用GPS治疗。

Table 1. Serum levels of total cholesterol(TC) and triglycerides(TG) in rabbits at base time ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Groups	n	TC	TG
control	5	97.5 ± 23.3	66.0 ± 30.7
HCD	8	77.3 ± 30.2	91.7 ± 76.8
GPS+HCD	5	81.3 ± 19.4	70.6 ± 35.3
HCD+GPS	5	74.8 ± 16.1	70.6 ± 37.3

HCD: high cholesterol diet; GPS+HCD: GPS($60 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) and 1% cholesterol were fed at the sametime; HCD+GPS: GPS($120 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) was administrated 4 weeks after fed 1% cholesterol.

1.3 血清胆固醇含量测定

分别于实验第1、5、7、9周末取动物展空腹耳缘静脉血,分离血清,用酶试剂(温州东鸥生化试剂厂)测TC、TG。

1.4 血清NO含量测定

血清NO微量测定参照文献[5,6]进行。取血清500 μl ,加入35%磺基水杨酸100 μl 沉淀蛋白,离心(-4°C , $10\,000 \times g$, 15 min),取上清液100 μl ,加Griess试剂和4 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ HCl各100 μl ,室温反应10 min,用酶联免疫仪在570 nm读光密度。同时以亚硝酸盐作标准曲线,结果以NO转变为亚硝酸盐 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

1.5 血清LPO及SOD测定

分离血清步骤同上。按文献[7]测定血清LPO含量,结果以 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙二醛表示。SOD测定参照文献[8,9]方法进行,结果以 $\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

2 结果

2.1 对血清胆固醇水平的影响

GPS($60 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)预防用药6周(实验的第7周)即可抑制血清TC升高,用药8周后,GPS预防组血清TC和TG水平明显低于高脂组。GPS($120 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)治疗用药4周亦降低血清TC和TG水平(Figure)。

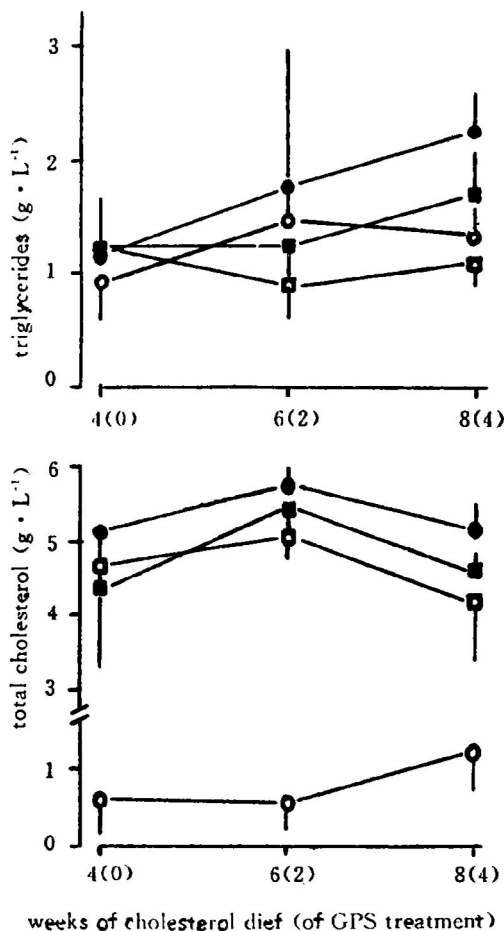


Figure. Effect of gypenoside (GPS) on serum levels of total cholesterol(TC) and triglycerides(TG) in rabbits.

—○—: control; —●—: HCD; —□—: GPS($60 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 8 weeks) + HCD; —■—: HCD + GPS($120 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 4 weeks).

* * $P < 0.05$ and # # $P < 0.01$ vs HCD.

Table 2. Effect of gypenosides(GPS) on serum levels of nitric oxide(NO), malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) in the atherosclerotic rabbits($\bar{x} \pm s$).

Groups	weeks of cholesterol diet (weeks of GPS treatment)		
	4(0)	6(2)	8(4)
NO($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			
control	13.58 $\pm$ 1.88	14.78 $\pm$ 1.66	16.88 $\pm$ 2.56
HCD	7.85 $\pm$ 0.21 ^b	11.10 $\pm$ 1.68 ^b	8.00 $\pm$ 0.71 ^b
GPS+HCD	13.28 $\pm$ 2.79	15.00 $\pm$ 2.36 ^c	15.95 $\pm$ 1.74 ^c
HCD+GPS	9.05 $\pm$ 1.06	10.32 $\pm$ 2.56	13.90 $\pm$ 4.40 ^c
MDA($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
control	7.25 $\pm$ 0.61	7.75 $\pm$ 0.33	8.55 $\pm$ 0.42
HCD	14.15 $\pm$ 0.21 ^b	15.60 $\pm$ 2.56 ^b	19.70 $\pm$ 0.071 ^b
GPS+HCD	11.40 $\pm$ 2.27 ^c	11.90 $\pm$ 1.80 ^c	12.28 $\pm$ 0.52 ^c
HCD+GPS	13.15 $\pm$ 0.49	14.08 $\pm$ 1.86	12.14 $\pm$ 1.20 ^c
SOD($\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$)			
control	358.5 $\pm$ 16.0	331.5 $\pm$ 7.6	327.8 $\pm$ 9.6
HCD	186.0 $\pm$ 8.5 ^b	154.8 $\pm$ 5.4 ^b	120.0 $\pm$ 21.2 ^b
GPS+HCD	306.0 $\pm$ 18.9 ^c	277.5 $\pm$ 7.9 ^c	254.2 $\pm$ 21.4 ^c
HCD+GPS	219.0 $\pm$ 46.7	183.6 $\pm$ 41.9	189.0 $\pm$ 12.0 ^c

HCD: high cholesterol diet; GPS+HCD: GPS (60 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) and 1% cholesterol were fed at the same time;HCD+GPS: GPS (120 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) was administrated 4 weeks after fed 1% cholesterol. b, $P < 0.01$ vs control;c, $P < 0.01$ vs HCD.

2.2 对血清 NO 含量的影响

Table 2 示,高胆固醇组,血清 NO 含量明显低于正常对照组,GPS 预防给药能维持血清 NO 接近正常水平;GPS 治疗给药 4 周后能有效对抗高脂所致的血清 NO 含量降低。

2.3 对血清 LPO 含量和 SOD 活性的影响

高胆固醇喂养 4 周后,兔血清过氧化脂质含量明显高于正常对照组,而 SOD 活性则显著降低,至第 9 周,LPO 进一步升高,SOD 进一步降低。GPS (60 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 预防给药能有效对抗高胆固醇喂养所致血清 LPO 及 SOD 改变;GPS (120 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 治疗给药 2 周即可保护 SOD 活性,但对 LPO 无影响;治疗给药 4 周,GPS 在保护 SOD 活性的同时可明显抑制 LPO 的升高(Table 2)。

3 讨论

高脂血症所致的血清过氧化脂质增加是导

致血管内皮损伤,促进白细胞与内皮细胞粘附,加速内皮细胞氧化修饰低密度脂蛋白,最终形成动脉粥样硬化斑块的重要原因之一^[10,11]。正常情况下,内皮细胞及红细胞中的 SOD 和内皮细胞释放的 NO、PGI₂ 等能有效地防止血清及细胞膜脂质过氧化。NO 既是一种舒血管物质,也是一种血小板聚集抑制剂和自由基清除剂。文献报道,在食饵性兔高脂血症模型,NO 的基础释放降低,血管内皮受损,中性粒细胞与冠脉内皮的粘附增加^[12],SOD 通过提高 NO 活性具有抗内皮损伤和抗动脉粥样硬化作用^[13]。我们在实验中发现:新西兰兔以 1% 胆固醇喂养 1 个月,随着 TC 和 TG 的升高,其血清 LPO 明显增加,NO 含量和 SOD 活性降低;胆固醇喂养至 2 个月时,上述指标变化更明显。

我们近年研究表明,GPS 具有抗膜脂质过氧化^[3,4]和保护血管内皮释放 NO 的作用。本实

验进一步发现:GPS (60 mg · d⁻¹)预防给药和大剂量(120 mg · d⁻¹)治疗给药1个月均能有效对抗高脂所致的血清NO含量和SOD活性降低,抑制过氧化脂质形成。此外,我们还观察到GPS对动脉粥样硬化消退及动脉壁Ca²⁺、K⁺、Na⁺变化有影响(另文发表)。

综上所述,GPS能有效对抗高脂所致血清NO、SOD、LPO、TC和TG的改变,为GPS临床应用治疗As提供了有价值的实验依据。

致谢 计算机教研室周怡副教授为本实验数据进行计算处理,本室研究生陈临溪同志及朱炳阳老师给予较多帮助。

参考文献

- 周宏研,谢秀梅,孙小明. 绞股蓝治疗高脂血症的疗效. 湖南医学, 1991, 8(6): 259~260.
- 李林,荆善田,周金黄. 绞股蓝总甙对离体大鼠肝脂质过氧化及膜流动性损伤的保护作用. 中国药理学通报, 1991, 7: 341~349.
- 廖端芳,邱立波,肖观莲, et al. 绞股蓝皂甙的抗氧化损伤作用 I、对自由基损伤心血管功能的影响. 衡阳医学院学报, 1993, 21: 1~6.
- 廖端芳,鹿宁,陈剑雄, et al. 绞股蓝皂甙的抗氧化损伤作用 II、对自由基损伤脑血管的影响. 衡阳医学院学报, 1993, 21: 239~242.
- Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sciences*, 1992, 51: 1621~1629.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, 126: 131~138.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351~358.
- Mardland S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, 74: 469~474.
- 季健平,吴再彬,刘波山, et al. 超氧化物歧化酶超微量快速测定法. 南京铁道医学院学报, 1991, 10: 27~30.
- 陈瑗,周玫,齐凤菊, et al. 实验性动脉粥样硬化家兔的脂质过氧化损伤. 中华心血管病杂志, 1991, 19: 382~384.
- Heinecke JW. Free radical modification of low density lipoprotein; Mechanism and biological consequence. *Free Radic Biol Med*, 1987, 3: 65.
- Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscl and Thromb*, 1993, 13: 771.
- Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, et al. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxation in cholesterol-fed rabbit. *Circ Res*, 1991, 69: 1293~1300.

(本文 1994-09-15 收到, 1994-10-21 修回)