

## n-3 多不饱和脂肪酸改善高胆固醇血症 内皮依赖性舒张\*

赵斌 赵培真 杨方 叶刚 韩晓男

(中国协和医科大学 中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)

### n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Improve Endothelium-Dependent-Relaxtion in Rat's Hypercholesterolemia

ZHAO Bin, ZHAO Pei-Zhen, YANG Fang, YE Gang and HAN Xiao-Nan

(Department of Pathology, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

**Aim** To investigate the protective role of n-3 polyunsaturated fatty acids on endothelial function.

**Methods** The endothelium-dependent-relaxation (EDR) experiment is investigated in thoracic aorta ring of rat's hypercholesterolemia. Functional tests of nitric oxide synthase (NOS) and smooth muscle cell were done to illustrate the mechanism.

**Results** Results indicate that, the impaired EDR under hypercholesterolemia is due to the incapable of NOS, n-3 polyunsaturated fatty acid can greatly improves the relaxation through recover the function of NOS.

**Conclusions** One of the mechanism of beneficial role of n-3 polyunsaturated fatty acids on atherosclerosis is its protective function on endothelium.

**KEY WORDS** n-3 polyunsaturated fatty acids; Endothelium-dependent-relaxation; Rats; Hypercholesterolemia

**摘要** 为研究 n-3 多不饱和脂肪酸对内皮的保护功能,本文在血管环内皮依赖性舒张、内皮细胞一氧化氮合成酶和平滑肌细胞功能等三个方面进行了研究。结

果表明高胆固醇血症下的内皮依赖性舒张明显减弱是由于一氧化氮合成酶受损,n-3 多不饱和脂肪酸通过恢复一氧化氮合成酶功能,大幅度改善内皮依赖性舒张。说明 n-3 多不饱和脂肪酸对动脉粥样硬化的有益作用机制之一是保护内皮功能。

**关键词** n-3 多不饱和脂肪酸; 内皮细胞; 内皮依赖性舒张; 大鼠; 高胆固醇血症

我们在对动脉粥样硬化高低发区的病理流行病学调查中发现渔区居民冠状动脉粥样硬化病变检出率明显低于高发区北京<sup>[1,2]</sup>。结合文献报道富含 n-3 多不饱和脂肪酸的鱼油对心血管系统有保护作用<sup>[3]</sup>,笔者推测其作用机制可能是保护内皮。本研究以内皮依赖性舒张、内皮细胞一氧化氮合成酶和平滑肌细胞功能等三个方面作指标,旨在探讨 n-3 多不饱和脂肪酸保护内皮的作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

正常雄性 Wister 大鼠 15 只,体重 174±14 g,购自首都医科大学实验动物中心。n-3 多不饱和脂肪酸(n-3 polyunsaturated fatty acids, n-3 PUFA)由百慧生物化学制药厂提供,含量 70%以上。高脂饲料配方:100 ml 猪油,20 g 胆固醇,1 g 甲基硫氧嘧啶。FR-4 型四导打印记录仪,生物压力传感器(航天医学工程研究所),CS501 型超级恒温器(重庆实验设备厂)。苯肾上腺素、L-硝基精氨酸为 Sigma 公司产品。胆固醇、硝普钠、乙酰胆碱均购自北京化学试剂公司。

#### 1.2 高胆固醇血症模型

大鼠适应一周后称重,剪尾取血 2 ml,室温放置 30~60 min,2 000 r/min 4℃离心 10 min,分离血清。取血清于 Beckman 全自动生物化学分析仪酶法测定甘油

\* 本文为“八五”攻关项目(85-915-03-04)内容

三酯 (triglyceride, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC), 磷钨酸-镁沉淀法测定高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。测定试剂盒购自北京中生物生物工程高技术公司。所得体重、TC、TG 和 HDLC 四项数据单独排序, 四个秩次的和再行排序得综合秩次。以综合秩次将动物随机分为高胆固醇 (hypercholesterol, HC)、治疗 (HC+n-3 PUFA) 和对照 (control) 共三组, 每组五只。前两组大鼠每天给予高脂饲料 4 ml/kg 体重灌胃。治疗组加 n-3 PUFA 2 g/kg 体重灌胃。三组大鼠自由进食商品饲料及饮水。第 21 天进行内皮依赖性舒张实验, 同时取血清按前述方法测定实验末的 TC、TG 和 HDLC。低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 根据 Friedewald 公式计算:  $LDLC = TC - (HDLC + TG/5)$ 。动脉粥样硬化指数 (atherosclerotic index, AsI) 按下式计算:  $AsI = (TC - HDLC) / HDLC$ 。

### 1.3 内皮依赖性舒张实验

1.3.1 血管环准备 断头处死动物, 迅速分离胸主动脉置预冷的 Kerb's 液中。剥去周围脂肪, 制备 3~4 mm 血管环, 用两个不锈钢三角钢钩上下撑开。下钩固定, 上钩接压力传感器。血管环置恒温浴槽中, 37℃, 通以 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> 混合气体, 间隔 15 min 换液。预置前负荷 1 g。恒温浴槽中稳定 1 h。60 mmol/L KCl 预激一次, 稳定后换液, 冲洗浴槽。10 μmol/L 苯肾上腺素第二次预激, 稳定回基线后冲洗, 进行以下实验。

1.3.2 乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张实验 10 μmol/L 苯肾上腺素刺激, 张力达平台时记录由基线到平台的垂直距离为 A。然后加入 10 μmol/L 乙酰胆碱, 观察舒张幅度, 记录由平台到稳定后的垂直距离为 B。乙酰胆碱舒张率等于 B 除 A 再乘以 100%。

1.3.3 一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthetase, NOS) 及平滑肌细胞功能实验 每组选两例血管环在乙酰胆碱舒张稳定后加入 100 μmol/L L-硝基精氨酸, 待张力稳定时再加入 100 μmol/L 硝普钠, 以观察血管环舒缩反应。

### 1.4 统计

数据用 SPSS 统计软件包行方差分析和 *t* 检验, 显著性水平为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 血脂

实验第 21 天, 三组大鼠血脂测定结果及动脉粥样硬化指数见 Table 1。可见高胆固醇组除

HDLC 外, 其它血脂指标均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 高胆固醇加 n-3 PUFA 预防组的血清 TC、HDLC 和 LDLC 水平与高胆固醇组的差异亦有显著性意义。这一方面说明实验所用高胆固醇血症大鼠模型是成功的; 另一方面, n-3 PUFA 确有降低高胆固醇所致的血脂升高, 尤其是血清总胆固醇水平。对照组 As I 是  $0.75 \pm 0.29$ 。高脂组和治疗组分别是  $1.43 \pm 0.49$  和  $1.27 \pm 0.55$ , 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但两组间无差异 ( $P > 0.05$ )。

Table 1. The serum lipid level at the end of experiment in three groups ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

Index	control	HC	HC+n-3 PUFA
TC	$1.25 \pm 0.29$	$2.09 \pm 0.69^a$	$1.47 \pm 0.37^b$
TG	$0.43 \pm 0.22$	$0.77 \pm 0.56^a$	$0.77 \pm 0.38^a$
LDLC	$0.73 \pm 0.22$	$0.86 \pm 0.22^a$	$0.66 \pm 0.14^b$
LDL	$0.32 \pm 0.13$	$0.88 \pm 0.61^a$	$0.46 \pm 0.30^b$
AsI	$0.75 \pm 0.29$	$1.43 \pm 0.49^a$	$1.27 \pm 0.55$

a: compared with control group,  $P < 0.001$ ; b: compared with HC group,  $P < 0.01$ .

### 2.2 乙酰胆碱舒张率

先用苯肾上腺素使血管环收缩, 再加入乙酰胆碱使其舒张, 观察高脂及 n-3 PUFA 对乙酰胆碱舒张反应的影响, 结果见 Table 2。

Table 2. Effect of n-3 PUFA on relaxant response to acetylcholine of aorta ring

Group	n	relaxant rate (%)
control	5	$94.80 \pm 4.76$
HC	5	$19.65 \pm 17.85^a$
HC+n-3 PUFA	5	$61.88 \pm 10.25^b$

a: vs control group,  $P < 0.001$ ; b: vs HC group,  $P < 0.01$ .

### 2.3 一氧化氮合成酶及平滑肌细胞功能

对照组加入 L-硝基精氨酸后血管环张力迅速上升, 两例均超过苯肾上腺素刺激收缩的水平。治疗组反应相同。唯有高胆固醇组张力不发生变化。三组对硝普钠的反应一致, 均是血管环张力骤然下降, 并低于静息水平 (Figure)。

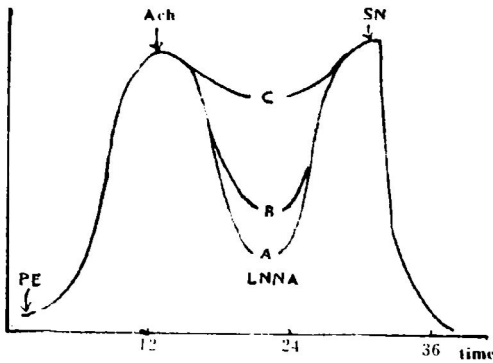


Figure. Tensional curve of rat's aorta. A: control group; B: HC + n-3 PUFA group; C: HC group. PE: phenylephrine; Ach: Acetylcholine; LNNA: N-nitro-L-arginine; SN: sodium nitroprusside.

### 3 讨论

自从 70 年代的流行病学调查发现富含 n-3 多不饱和脂肪酸的鱼油与低心血管病发病率有关以来, n-3 PUFA 对 As 的治疗预防作用一直是人们关注的热点<sup>[4,5]</sup>。本文从保护内皮的角度探讨其作用机制。内皮细胞(endothelial cell, EC)是在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展中起重要作用的细胞成分<sup>[6]</sup>, 其功能之一为调节血管壁的张力。这一功能是通过内皮细胞产生一些因子作用于血管平滑肌细胞来完成的。使平滑肌舒张的因子统称为内皮细胞来源的血管舒张因子。一氧化氮(nitric oxide, NO)是最重要的内皮细胞来源的血管舒张因子。它是由内皮细胞的 NOS 分解精氨酸产生的, 在局部发挥短暂而强力的舒张平滑肌细胞作用<sup>[7]</sup>。已有大量的临床和动物实验表明高胆固醇血症或动脉粥样硬化血管的内皮依赖性舒张受损<sup>[8]</sup>。

研究者首先给大鼠饲养以高脂饮食, 血脂测定结果可见高脂组 TC、LDL 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), TG 由于个体差异较大与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), HDLC 无变化 ( $P > 0.05$ )。表明高胆固醇血症模型复制成功。治疗组 TG、LDLC 均显著低于高脂组 ( $P < 0.05$ ), 与对照组无差异 ( $P > 0.05$ )。虽然 TG 显

著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), HDLC 显著低于高脂组 ( $P < 0.05$ ), 但从 As I 结果可见治疗组的 As I 低于高脂组, 表明 n-3 PUFA 治疗降低了 As 的危险性。

内皮依赖性舒张实验结果显示, 高胆固醇组血管环由乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张仅为 19%, 是对照组的 20%, 提示 NOS 功能障碍, NO 产生不足。进一步验证了已往的研究结果<sup>[9,10]</sup>。治疗组舒张 61%, 较高胆固醇组有很大改善 ( $P < 0.01$ )。但较对照组 95% 仍有差距 ( $P < 0.001$ )。表明 n-3 多不饱和脂肪酸可部分改善高胆固醇血症的内皮依赖性舒张。

使用 NOS 的特异性酶抑制剂 L-硝基精氨酸后, 对照组由于舒张因子 NO 不再合成, 导致平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的收缩, 表现为张力上升。高胆固醇组张力不变进一步证明原因是 NOS 功能障碍。治疗组有与对照组相同的反应仍表明 n-3 PUFA 可部分改善高胆固醇血症的 NOS 功能。但在高胆固醇血症下是否存在 SMC 功能障碍丧失舒张能力的情形呢?

硝普钠是一种直接作用在平滑肌细胞, 使血管舒张的药物, 它不依赖内皮功能。血管环对硝普钠的反应标志血管 SMC 正常与否<sup>[11]</sup>。结果显示三组 SMC 均正常。这强力提示高胆固醇血症内皮依赖性舒张障碍的原因是内皮 NOS 受损。

总之, 本文从血管环内皮依赖性舒张、一氧化氮合成酶和平滑肌功能等三个方面的研究, 表明高胆固醇血症下的内皮依赖性舒张明显减弱是由于一氧化氮合成酶受损, n-3 多不饱和脂肪酸通过恢复一氧化氮合成酶功能, 大幅度改善内皮依赖性舒张。

### 参考文献

- 1 杨方, 赵培真, 王爱忠, 等. 动脉粥样硬化高低发区青年人冠状动脉粥样硬化病变的比较性研究. 中国循环杂志, 1996, 11(4): 195~199.
- 2 杨方, 赵培真, 张英珊, 等. 北京地区青年人冠状动脉粥样硬化的研究. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(1): 24~32.
- 3 冯丽媛, 刘力生, 赵培真, 等. 鱼油对卒中易感型自发性高

- 血压大鼠高血压发展过程的影响. 中国高血压杂志, 1994, 2 (4): 216~220.
- 4 David P Katz, Susan Schwartz, Jeffrey Askanazi. Biochemical and cellular basis for potential therapeutic value of n-3 fatty acids derived from fish oil. *Nutrition*, 1993, 9 (2): 113~118.
  - 5 Dong Nack Kim, Allison Eastman, James E Baker, et al. Fish oil, atherogenesis, and thrombogenesis. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 478: 471~479.
  - 6 Michael A Gimbrone Jr, Myron I Cybulsky, Noriaki Kume, et al. Vascular endothelium an integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 478: 122~131.
  - 7 Richard Schulz, Chris R Triggie. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *TIPS*, 1994, 15 (4): 255~259.
  - 8 Luscher FT, Noll G. Endothelium dysfunction in the coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmac*, 1994, 24 (Supple 3): S16~S26.
  - 9 Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1993, 91 (1): 29~37.
  - 10 Robert S Meidell. Southwestern internal medicine conference: endothelial dysfunction and vascular disease. *Am J Med Sci*, 1994, 307 (5): 378~389.
  - 11 Hisao Taguchi, Frank M Faraci, Takamair Kitazono, et al. Relaxation of the carotid artery to hypoxia is impaired in watanabe beritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15 (10): 1 641~645.
- (1995-12-25 收到, 1996-03-01 修回)

## 名词术语的汉英对照及缩写 (VI)

过氧化酶	peroxidase, POase
光密度	optical density
光谱分析	spectrum analysis
吸收带	absorption band
吸收光谱	absorption spectrum
早期抗原	early antigen, EAg
同种白细胞抗体	homologous leucocytic antibody, HLAB
同种白细胞抗原	homologous leucocytic antigen, HLAg
异种抗原免疫球蛋白	alloantigenic immunoglobulin
回归方程	regression equation
回归系数	regression coefficient
曲张静脉硬化法	varicosclerosis
血小板计数	platelet count
血小板生成	thrombocytopoiesis
血小板因子	platelet factor, PF
血小板抗体	platelet antibody, PAb
血小板抗原	platelet antigen, PAg
血小板变性	thrombocyte degeneration
血小板粘附	platelet adhesiveness
血小板聚集	platelet aggregation
血小板母细胞(巨核细胞)	thromboplast
血小板凝集素	platelet agglutinin
血小板生长因子	platelet growth factor, PGF

(胡必利编写)