

绞股蓝总皂甙对兔实验性动脉粥样硬化斑块形成的影响

黄红林 尹卫东^① 廖端芳 陈剑雄 唐小脚 李波平^① 曹建国 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 Formation of Atherosclerotic Plaque of Aorta in Hypercholesterolemic Rabbits

HUANG Hong-Lin, YIN Wei-Dong^①, LIAO Duan-Fang, CHEN Jian-Xiong, TANG Xiao-Qing, LI Bo-Ping^①, CAO Jian-Guo and YU Lin

(Division of Cardiopulmonary Pharmacology, ^①Institute of Cardiovascular Diseases, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effects and mechanisms of Gypenosides on the atherosclerotic plaque formation in rabbit with hypercholesterolemia.

Methods 23 male New Zealand white rabbits were assigned to four groups: 5 rabbits in control group were fed with a normal diet; 8 rabbits in hypercholesterolemic group were fed with 1% cholesterol diet for 9 weeks; In gypenosides and vitamine E (Vit E) treat groups, 5 weeks after fed with 1% cholesterol diet the animals were fed with 1% cholesterol diet containing gypenosides or Vit E for another 4 weeks.

Sudan IV stain was used to show the relative area of atherosclerotic plaque. Lipid peroxides of aorta were estimated by the thiobarbituric acid method. Nitrite, the metabolic product of nitric oxide, was determined according to a modified Griess' method. The Ca²⁺, K⁺ and Na⁺ content of aorta were measured in means of atom absorption.

Results Gypenosides treatment (120 mg/d, 4 weeks) inhibited formation of atherosclerotic plaque as shown by 37% reduction of plaque areas comparing to 1% cholesterol treatment along. Gypenosides also

decreased lipoperoxidation of aorta by 33%. In addition, gypenosides protected nitric oxide release of aorta against hypercholesterolemia damage and reduced Ca²⁺ content of aorta by 50%. However, both hypercholesterolemia and gypenosides had no influence on K⁺ and Na⁺ content of aorta. Vit E showed the same effect as gypenosides did.

Conclusion Gypenosides attenuates the formation of atherosclerotic plaque and lipoperoxidation of aorta induced by hypercholesterolemin in rabbit. The mechanisms of antiatherogenic effects of gypenosides might include its protection on nitric oxide and its inhibition on calcium overload.

KEY WORDS Gypenosides; Atherosclerosis; Lipid peroxidation; Nitric oxide; Vitamin E

摘要 为了探讨绞股蓝总皂甙防止动脉粥样硬化的作用及其机制, 在新西兰兔食饵性动脉粥样硬化模型上, 观察了绞股蓝总皂甙治疗性给药对主动脉壁粥样硬化斑块形成及脂质过氧化的影响。发现绞股蓝总皂甙(120 mg/d)治疗四周能减少主动脉壁斑块形成, 苏丹IV染色及形态计量学分析显示绞股蓝总皂甙治疗组的斑块面积较之高脂组减少了37%; 主动脉壁脂质过氧化程度也明显减轻, 丙二醛含量仅为高脂组的67%。此外, 还观察到绞股蓝总皂甙在减少主动脉壁斑块形成和脂质过氧化的同时, 还能保护血管壁释放或合成一氧化氮的能力, 并防止因长期高胆固醇血症引起的主动脉壁Ca²⁺超载。绞股蓝总皂甙的作用与抗氧化剂维生素E相似。

关键词 绞股蓝总皂甙; 动脉粥样硬化; 脂质过氧化; 一氧化氮; 维生素E。

绞股蓝总皂甙(gypenosides, GPS)为葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝[Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino]的主要有效成份。早期研究发现绞股蓝总皂甙能抑制离体大鼠肝

脏脂质过氧化,维持细胞膜的流动性^[1]。高脂血症病人服用绞股蓝胶囊(120 mg/d)一个月,有明显的降低血清总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)的疗效,而患者高密度脂蛋白胆固醇明显增高^[2]。近年来,我室分别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具有抗氧自由基损伤、防止脑血管痉挛和抗膜脂质过氧化作用^[3,4]。此外,我们还观察到GPS对抗内毒素休克,预防继发性弥散性血管内凝血的作用^[5]。最近赵颖等^[6]报道GPS还有阻抑Ca²⁺通道的作用。上述结果提示GPS可能成为有效的防治动脉粥样硬化药物。为了探讨GPS的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用和机理,我们在食饵性兔动脉粥样硬化模型上,观察了GPS对血清一氧化氮(Nitric oxide, NO)和脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)含量、血清胆固醇水平及超氧化物歧化酶活性的影响^[7],本文主要研究GPS对动脉粥样硬化斑块形成和脂质过氧化的抑制作用,同时探讨GPS对动脉壁NO和Ca²⁺、K⁺和Na⁺等含量变化的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

绞股蓝总皂甙(湖南省医药工业研究所药理室赠送),硫代巴比妥酸(Fluka产品),维生素E(Sigma产品),其余均为市售分析纯。

1.2 新西兰白兔食饵性动脉粥样硬化模型的制备

雄性新西兰白兔(New Zealand white rabbit,上海实验动物中心引进)23只,体重2.0±0.3 kg,单笼喂养,饮水不限,观察一周,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:正常对照组5只,喂普通标准饲料;高胆固醇模型组8只,上述饲料中加入1%的胆固醇;高胆固醇+GPS治疗组和高胆固醇+维生素E治疗组各5只,前五周喂养同高胆固醇组,第6~9周每天加120 mg GPS或每天加400 mg维生素E。第五周末处死高胆固醇模型组2只动物,取出其主动脉组织用苏丹IV染色见其有早期动脉粥样硬化斑块后,遂开始用GPS和维生素E治疗。

1.3 标本制备与主动脉粥样硬化斑块面积的测量

第九周末,用空气栓塞法处死各组动物,取出整条主动脉,剥离附着组织,生理盐水冲洗后除留出部分腹主动脉段作动脉壁脂过氧化物测定、一氧化氮测定及Ca²⁺、K⁺和Na⁺测定外,剩余的主动脉弓及胸主动脉段部分纵向剪开按文献^[8]的方法用苏丹IV染色,拍照后计算病变面积,求得各组动脉粥样硬化面积占总面积的百分比。

1.4 主动脉壁脂过氧化物的测定

每只兔取腹主动脉段约100 mg于冰浴中制成10%匀浆,离心(4℃, 7 000 r/min; 30 min),保留上清液并按BioRad Bradford生产的药盒所提供的方法测定上清液中的蛋白质浓度。上清液中脂过氧化物含量按硫代巴比妥酸法测定^[9],结果以蛋白质中丙二醛含量(μmol/g)表示。

1.5 主动脉壁组织一氧化氮产物亚硝酸盐含量的测定

参照文献^[10,11]进行,取上清液100 μL加入等量Griess试剂(1%对氨基苯磺酰胺,0.1% N-萘基乙二胺,5%磷酸)。室温放置15 min,显色后,用酶联免疫仪在570 nm波长下测定样品的吸光度,同时以亚硝酸钠作为标准曲线。结果以NO转变为亚硝酸盐的含量(mg/g)表示。

1.6 主动脉壁中Na⁺、K⁺和Ca²⁺含量测定

取约100~500 mg主动脉段血管称取湿重,用浓硝酸湿化法消化血管组织,原子吸收光谱法^[12]测定Na⁺、K⁺和Ca²⁺含量,结果以μg/g表示。

1.7 统计学处理

所有数据在计算机上用SAS软件经方差分析后进行 q 检验,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 绞股蓝总皂甙对新西兰白兔动脉粥样硬化斑块形成的影响

主动脉弓及部分胸主动脉段用苏丹IV染色后可见,正常对照组主动脉壁平坦、光滑,未见明显病变。GPS及维生素E治疗组的主动脉组织未见有明显的As斑块,仅观察到一些散在的轻微红染或几乎没有红染,而高胆固醇模型组主动脉壁表面粗糙,有较多被苏丹IV红染的区域,在黑白照片上苏丹IV红染的区域颜色较浅,

而这些浅色的病灶有些地方连成大块,质地较硬,高出于主动脉内膜面(图 1, Figure 1)。



Figure 1. Effect of GPS on the formation of atherosclerotic plaque of aortae in hypercholesterolemic rabbits (Sudan IV stain). A: control group (normal diet). B: HC group (high cholesterol diet). C: HC + GPS group. GPS (120 mg/d) was administered for 4 weeks after fed 1% cholesterol. D: HC + Vit E group. high cholesterol diet plus vitamine E (400 mg/d).

计算 As 病变面积后,求得的各组 As 病变

面积与所测量的总面积比值如表 1 (Table 1) 所示,高胆固醇模型组和 GPS 治疗组 As 斑块面积占主动脉内表面积百分比分别为 32.4% 和 20.2%,维生素 E 组为 17.1%,高胆固醇 (hypercholesterol, HC) 加 GPS 治疗组比高胆固醇模型组 As 斑块面积减少 37% ($P < 0.05$),而 HC 加维生素 E 组比高胆固醇模型组 As 斑块面积减少 47% ($P < 0.01$)。结果说明,GPS 有减轻主动脉粥样硬化斑块形成的作用。

Table 1. Effect of GPS on the formation of atherosclerotic plaque of aortae in hypercholesterolemic rabbits (relative area of plaque) ($\bar{x} \pm s$).

Groups	Aortic arch lesion involvement (%)
Control	0
HC	32.4 ± 2.4
HC + GPS	20.2 ± 2.7 ^a
HC + Vit E	17.1 ± 3.6 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; compared with HC group.

HC: high cholesterol diet. HC + GPS: GPS (120 mg/d) was administered 4 weeks after fed 1% cholesterol. HC + Vit E: high cholesterol diet plus vitamine E (400 mg/d).

2.2 绞股蓝总皂甙对主动脉壁组织脂过氧化物含量的影响

硫代巴比妥酸法测得高胆固醇模型组兔主动脉壁组织 LPO 的代谢产物丙二醛含量明显高于正常对照组 ($4.56 \pm 0.93 \mu\text{mol/g}$ 对 $2.23 \pm 0.36 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$), 而经 GPS 治疗四周后,主动脉壁组织丙二醛含量比高胆固醇模型组下降 33% ($3.03 \pm 0.54 \mu\text{mol/g}$ 对 $4.56 \pm 0.93 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), 但仍高于正常组 ($3.03 \pm 0.54 \mu\text{mol/g}$ 对 $2.23 \pm 0.36 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), 说明 GPS 能减轻高胆固醇饮食家兔主动脉壁脂质过氧化。具有与维生素 E 相似的抗氧化作用(图 2, Figure 2)。

2.3 绞股蓝总皂甙对主动脉壁组织 NO₂ 含量的影响

从图 3 (Figure 3) 可见,高胆固醇模型组主动脉组织 NO₂ 含量明显低于对照组 ($1.52 \pm 0.59 \text{ mg/g}$ 对 $3.38 \pm 0.41 \text{ mg/g}$, $P < 0.01$), GPS

或维生素 E 治疗给药 4 周后均能有效对抗高胆固醇所致的主动脉壁组织 NO₂ 含量降低:前者为 2.94±0.27 mg/g 对 1.52±0.59 mg/g (P<0.01); 后者为 3.29±1.03 mg/g 对 1.52±0.59 mg/g (P<0.01)。

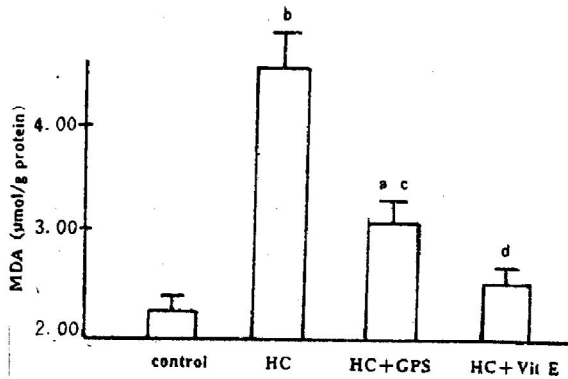


Figure 2 effect of gypenosides (GPS) on MDA level of aorta in the atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$). a: P<0.05, b: P<0.01, compared with control group; c: P<0.05, d: P<0.01, compared with HC group.

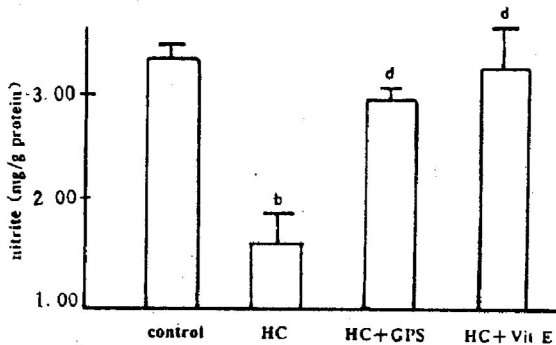


Figure 3. Effect of GPS on Nitrite(NO₂) level of thoracic aorta in the atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$).

b: P<0.01, compared with control group; d: P<0.01, compared with HC group.

2.4 绞股蓝总皂甙对实验性动脉粥样硬化家兔血管壁 Ca²⁺、K⁺和 Na⁺含量的影响

用原子吸收分光光度法测得高胆固醇模型组血管壁组织 Ca²⁺ 含量为对照组 Ca²⁺ 含量的 2.28 倍, GPS 治疗组 Ca²⁺ 含量接近正常组; 维生素 E 治疗组 Ca²⁺ 含量绝对值低于高胆固醇模型组, 但统计处理无差异。各组间 Na⁺、K⁺ 含量无明显变化(表 2, Table 2)。

Table 2. Effect of GPS on thoracic aorta contents of Ca²⁺, K⁺ and Na⁺ in the atherosclerotic rabbits ($\bar{x}\pm s$, μg/g protein).

Groups	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺
Control	71.9±38.2	1124±149	527.7±31.5
HC	164±32 ^b	1087±155	543.9±86.5
HC+GPS	85.2±17.1 ^c	1082±149	564.0±85.7
HC+Vit E	99.8±52.4	963±150	568.1±54.1

b: P<0.01, compared with control group; c: P<0.05, compared with HC group.

3 讨论

动脉粥样硬化是心、脑血管病的主要病理基础, 主要发生在大、中动脉, 呈现不同程度的内膜增厚、脂质沉着、纤维组织增生、形成脂质条纹及斑块, 导致血管腔的狭窄及阻塞, 最终引起心肌或脑组织等重要器官供血不足, 因此, 粥样斑块的出现是构成动脉粥样硬化的病理学基础, 对于斑块所致的狭窄仍以血管再通术为主, 但手术后再狭窄率很高, 若能以药物来消除或延缓斑块的形成, 减轻狭窄乃是治疗动脉粥样硬化较为理想的途径之一。

本研究结果发现, 大剂量 GPS(120 mg/d) 可阻止或延缓由饲高胆固醇所引起的家兔实验性动脉粥样硬化斑块的发展, 使动脉壁 LPO 含量降低, 并与维生素 E(400 mg/d) 的疗效相当。维生素 E 是传统的抗氧化剂, 文献[13]亦报道它能防止 LDL 的氧化修饰保护膜完整性、减少高胆固醇导致的内皮功能失常。维生素 E 处理的家兔(每天 0.04 mg/kg) 能降低动脉壁脂过氧化物和胆固醇含量, 并有消除斑块的作用[14]。在治疗动脉粥样硬化的功效上 GPS 有与维生素 E 类似的作用。

动物实验和临床资料证明[15], 高脂血症时, 动脉血管内皮氧自由基增多, 这些氧自由基又使得 NO 快速氧化分解导致 NO 减少而使得血管内皮舒张功能受到损害, 内皮细胞粘附性增加, 血小板聚集, 促进平滑肌收缩, 抗氧化作用降低, 导致 LDL 的氧化修饰, 促进斑块的形成。我们发现 GPS 在抑制斑块形成的同时, 还

能增加血管壁组织中的 NO 含量,因而推测 NO 可能参与 GPS 的抗 As 作用。

有趣的是,本工作还发现,高脂血症时动脉壁 Ca^{2+} 含量增高,并且与 As 斑块面积及主动脉 LPO 的变化一致。文献报道高脂时产生的自由基引起血管内皮损伤,促进血管壁细胞从血浆中摄取 Ca^{2+} ,细胞内 Ca^{2+} 增加,将会加快细胞内各种 Ca^{2+} 依赖反应^[16];如调节内皮细胞膜通透性,刺激血管平滑肌细胞增殖和移行,活化血小板,增加细胞外基质分泌以及动脉退行性改变和坏死,从而易引起动脉粥样硬化斑块的形成。GPS 在抑制斑块的形成的同时,减轻主动脉壁 Ca^{2+} 超载,其机理可能与 GPS 通过增加血管壁 NO 的含量、激活平滑肌细胞内的鸟苷酸环化酶、使 cGMP 水平升高、抑制细胞外钙内流和内钙释放有关。赵颖等^[6]报道在心肌细胞 GPS 通过抑制 Ca^{2+} 内流,从而减轻“钙超载”,降低缺血心肌的异常兴奋性,保护氧自由基对心脏的损伤,改善心肌缺血时的心舒张功能。与我们在血管壁上观察到的结果相类似。

综上所述,GPS 可能通过维持血管壁 NO 含量、减少脂质过氧化和减轻主动脉壁 Ca^{2+} 超负荷而具有抑制或延缓动脉粥样硬化斑块形成的作用。

参考文献

- 1 李林,邢善田,周金黄. 绞股蓝总皂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(5): 341~349.
- 2 周宏研,谢秀梅,孙小明. 绞股蓝总皂甙治疗高脂血症的疗效. 湖南医学, 1991, 8(6): 259~260.
- 3 肖观莲,廖端芳,陈剑雄,等. 绞股蓝总皂甙对自由基损伤兔主动脉舒张功能的保护作用. 中国药理学通报, 1994, 10(2): 136~138.
- 4 邱立波,胡弼,廖端芳. 绞股蓝总皂甙对豚鼠心肌氧自由基损伤的保护作用. 中国药理学通报, 1993, 9(4): 287~290.
- 5 雷建华,胡弼,唐朝克,等. 绞股蓝总皂甙对内毒素休克继发 DIC 的预防作用. 衡阳医学院学报, 1994, 22(2): 131~133.
- 6 赵颖,胡大一. 绞股蓝总皂甙对单个豚鼠心肌细胞的钙、钠、钾电流及动作电位的影响. 中国药理学通报, 1998, 14(1): 60~62.
- 7 廖端芳,尹卫东,陈剑雄,等. 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脂过氧化物的影响. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(4): 149~152.
- 8 焦鸿丽,刘易林,万腊香,等. L-精氨酸对高脂血症兔主动脉和冠状动脉粥样硬化斑块面积的影响. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(3): 199~204.
- 9 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351~358.
- 10 Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sci*, 1992, 51: 1621~629.
- 11 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, 126: 131~138.
- 12 Yanagihara T. Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci*, 1982, 30: 1927.
- 13 Metz J, Andersson TLG, Ferns GAA, et al. Dietary vitamin E increases the resistance to lipoprotein oxidation and attenuates endothelial dysfunction in the cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 1994, 110: 241.
- 14 Prasad K, Jawahar K. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J*, 1993, 125: 958~973.
- 15 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increase endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, 1993, 91: 2546~551.
- 16 Metcalfe TC, Meore JP, Smith CA, et al. Calcium and cell proliferation. *Br Med Bull*, 1986, 42: 405~412.

(此文 1998-09-22 收到, 1998-11-17 修回)

(此文编辑:胡必利)