

消斑肽对 C57BL/ 6J 小鼠动脉粥样硬化斑块的影响

袁中华 杨永宗 杨小毅 谭健苗 万载阳

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

主题词 消斑肽; 小鼠; 动脉粥样硬化; 治疗; 胆固醇; 甘油三酯; 中华眼镜蛇毒素; Roberts & Thompson 评分

摘要 已发现从中华眼镜蛇毒素中提取的一种多肽(暂命名为消斑肽)能抑制血管平滑肌细胞增殖,并在一定范围内杀伤快速增殖的平滑肌细胞。为验证消斑肽是否具有消除动脉粥样硬化斑块和预防再狭窄的药物效应,选用动脉粥样硬化敏感株近交系 C57BL/ 6J 小鼠,经致动脉粥样硬化饮食饲喂 17 周。使用消斑肽腹腔注射 3.2 $\mu\text{g/g}$ 治疗 4 周,在主动脉窦部连续切片,油红 O 染色并在显微镜下观察,使用 Roberts & Thompson 评分判定斑块消退情况。结果发现致动脉粥样硬化饮食饲喂 17 周后,主动脉窦形成典型的动脉粥样硬化斑块,且血清总胆固醇和甘油三酯大幅度升高,约高于对照组三倍。经消斑肽治疗后小鼠斑块明显少于和小于非治疗组,两组的 Roberts & Thompson 评分分别为 4.1 ± 2.2 和 8.0 ± 1.2 ($n = 10, P < 0.05$);而且血清总胆固醇和甘油三酯均下降,接近对照组,非治疗组则下降不明显。此结果提示消斑肽对于小鼠动脉粥样硬化斑块的形成有一定的阻抑作用,且对已形成的斑块有消退作用;同时能使血清总胆固醇和甘油三酯下降。

XBP- 01 Eliminates Atherosclerotic Plaques on C57BL/ 6J Mice Fed with Atherogenic Diets

YUAN Zhong- Hua, YANG Yong- Zong, YANG Xiao- Yi, TAN Jian- Miao and WAN Zai- Yang

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

MeSH XBP- 01; Mice; Atherosclerosis; Therapy; Cholesterol; Triglyceride; Chinese Cobra Venom (Naja Naja Atra); Roberts & Thompson Score

ABSTRACT **Aim** Previous studies performed in vitro indicated that XBP- 01, a polypeptide which was refined from Chinese cobra venom (Naja naja atra), could inhibited the cultured vascular smooth muscle cell proliferation. To observe the eliminating atherosclerotic plaques effect of XBP- 01 in vivo. **Methods** After fed with the atherogenic diets for 17 weeks, the atherosclerotic sensitive inbred strain C57BL/ 6J mice have typical atherosclerotic plaques formed near the aorta sinus, accompanied with the serum total cholesterol and triglyceride significant rise. Then the mice were injected with XBP- 01 of 3.2 $\mu\text{g/g}$ weight body per day for 4 weeks. Cryostat frozen sections, 10 μm thick, were cut from heart to aorta, stained with Red oil O. The sections were examined microscopically and scored according to the method of Roberts and Thompson. The serum total cholesterol and triglyceride also were assayed. **Results** The mice have typical atherosclerotic plaques formed near the aorta sinus, accompanied with the serum total cholesterol and triglyceride significant rise after fed with the atherogenic diets for 17 weeks. The plaques are fewer and less than that of the non- treating with XBP- 01 group, the Roberts & Thompson score is 8.0 ± 1.2 , 4.1 ± 2.2 , respectively, and has a statistical significance. The serum total cholesterol and triglyceride descends to normal level. **Conclusions** XBP- 01 possesses the potential antiatherosclerotic effect in vivo.

蛇毒中含有大量作用特异而活性强的酶类和毒素,是自然界中资源最集中的天然药物宝库。为了寻找和开发能够抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用的药物,本实验室使用交换柱层析和凝胶过滤方法从湖南产中华眼镜蛇毒中提取到一个组分,用反相 HPLC 分析,其纯度达 91%,经光电二极管矩阵同步光谱分析,在 210 nm 和 278 nm 有最大吸收峰,表明其化学性质为肽,电泳分析表明相对分子质量约为 7 000。同时发现,它能抑制培养的猪主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖,在一定范围内能杀伤快速增殖的 SMC(资料待发表),暂命名为消斑肽(XBP- 01)。

我们以前的实验已发现,在离体状态下,消斑肽

(XBP- 01)能逆转平滑肌源性的泡沫细胞,使泡沫细胞内的胆固醇酯下降到正常水平^[1]。本文采用近交系 C57BL/ 6J 小鼠复制 As 模型,然后使用消斑肽(XBP- 01)进行治疗,以观察消斑肽(XBP- 01)的抗 As 作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

近交系 9 周龄 C57BL/ 6J 小鼠(购自中国科学院实验动物繁育场)共 36 只,雌雄各半,平均体重 21.7 ± 2.9 g。每只小鼠 4.0 g/d 分别供给普通饲料和致动脉粥样硬化饲料(2.0% 胆固醇,10.0% 脂肪),按二级动物标准饲养。

1.2 试剂

消斑肽(XBP-01)由本实验室制备。戊二醛为Sigma公司产品。血清总胆固醇试剂盒、血清甘油三酯试剂盒购自北京化工试剂分厂。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 血脂测定

用固定架固定小鼠,二甲苯涂抹鼠尾,切割尾尖部的静脉,收集静脉血约0.2 mL,室温下静置2 h, 5 000 r/min 离心10 min,取上层血清,按试剂盒说明操作,测定血清总胆固醇及甘油三酯。

1.4 小鼠动脉粥样硬化模型的建立及评分方法

C57BL/6J小鼠,在第1周饲喂过渡期饲料,含普通和致动脉粥样硬化饲料各半,此后全部给予致动脉粥样硬化饲料,直至第17周。眼球放血处死小鼠,取出心脏及主动脉,剥离血管外组织,置于复合固定液(含2.0%焦性锑酸钾,2.0%戊二醛,2.5%甲醛,0.1%鞣酸,0.1 mol/L磷酸氢二钾,pH 7.6)中,4℃固定1周。然后从主动脉窦处取主动脉约1 mm,以20 μm厚度连续切片,然后油红O染色。

从连续切片的第5张开始,每间隔4张选一张,即第5、10、15、20、……第50张共10张切片,在显微镜下观察,按照Roberts & Thompson方法对选出的10张切片进行评分^[2],标准如下:

评价指数	定量标准	评分
斑块数	0~1	0
	2~4	1
	5~	2
斑块平均大小 与瓣膜之比	< 1/8	1
	1/8~ 1/4	2
	> 1/4	3
斑块中泡沫细胞 最多数目	1~5	1
	6~15	2
	16~	3
中膜损伤	-	0
	+	1
内皮突起	-	0
	+	1

1.5 实验分组及治疗

36只小鼠随机均分为对照组、模型组和治疗组。对照组喂普通饲料,模型组和治疗组喂致动脉粥样硬化饲料。至实验第17周,每组处死2只动物按以上方法鉴定是否形成As模型。从第17周开始全部动物换成普通饲料,腹腔注射下述溶液:对照组注射生理盐水;模型组注射生理盐水;治疗组注射200 mg/L消斑肽(XBP-01)生理盐水液,按3.2 μg/g体重调整注射体积,约0.4 mL。每日1次,每6日为一疗程,停用一日后开始第2个疗程,共计4个疗程。到第21周全部处死动物,按以上方法评价斑块

状况。每周测体重一次,在第0、17和第21周分别测血脂。

1.6 统计学方法

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据差异的统计学意义采用双侧 t 检验。

2 结果

2.1 消斑肽(XBP-01)作用前的斑块观察结果

C57BL/6J小鼠经致动脉粥样硬化饲料饲喂17周后,观察主动脉窦瓣膜部位的切片,可见血管内膜下有多处斑块,大小不等,斑块中可见数目不等的泡沫细胞,数目最多者可达20个以上,泡沫细胞被油红O染成红色。有的部位还可见到斑块近向或远离管腔发展,使内皮突起或中膜损伤。而普通饲料对照组小鼠则没有发现血管异常的表现。说明17周的致动脉粥样硬化饮食已成功地复制成小鼠As模型。图1(Figure 1)为第1张切片(瓣膜起始部)的镜下观(10×40倍)。

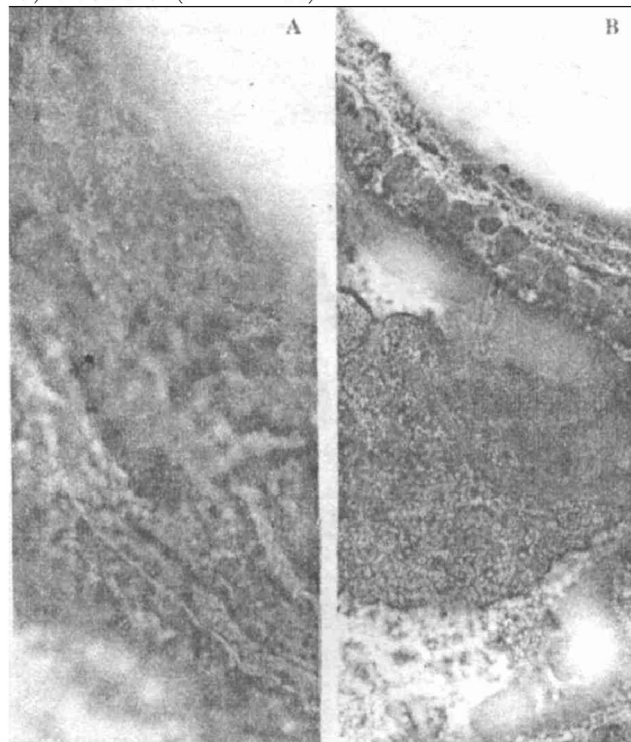


图1. 经正常饲料(A)和致动脉粥样硬化饲料(B)饲喂17周后,C57BL/6J小鼠主动脉窦切片经油红O染色的光学显微镜下观

Figure 1. Light micrographs showing the atherosclerotic plaque formation in section of aorta sinus stained with Red oil O from C57BL/6J mouse fed normal diet (A) or atherogenic diet (B) for 17 weeks. (×400)

2.2 消斑肽(XBP-01)治疗后的斑块观察结果

实验第21周处死动物后观察,对照组未见内膜

下动脉粥样硬化病变;模型组未用消斑肽(XBP-01)治疗,可见内膜下多处大小不等的斑块,其中有数目不等的泡沫细胞,中膜平滑肌层损伤或内膜向管腔隆起等表现。治疗组小鼠因腹腔内注射了消斑肽(XBP-01)4个疗程,则不同于对照组或模型组,其镜下表现介于两者之间,斑块数和泡沫细胞数少于模型组,中膜损伤和内皮突起少见。图2(Figure 2)为第1张切片(瓣膜起始部)的镜下观(10×40 倍)。

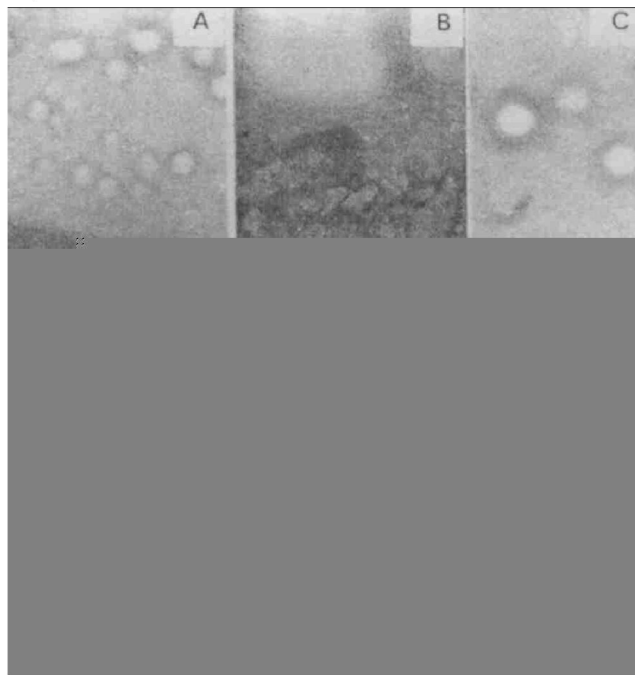


图2. 经致动脉粥样硬化饲料饲喂17周后,注射消斑肽(XBP-01)治疗4个疗程,各组小鼠主动脉窦第1张切片(瓣膜起始部)经油红O染色的光学显微镜下观

Figure 2. Light micrographs showing the eliminating plaques effect of XBP-01 in section of aorta sinus stained with Red oil O from C57BL/6J mouse, injected with XBP-01 of $3.2 \mu\text{g/g}$ body weight for 4 weeks or 0.9% sodium chloride after fed with or without atherogenic diet for 17 weeks. ($\times 400$)

A- Fed with control diet, injected with 0.9% sodium chloride. B- Fed with atherogenic diet, injected with 0.9% sodium chloride. C- Fed with atherogenic diet, injected with XBP-01.

2.3 消斑肽(XBP-01)治疗后的 Roberts & Thompson 评分

用消斑肽(XBP-01)治疗后(实验第21周),按前述方法对各小鼠的10张切片进行观察、评分和统计学处理,得各组小鼠的 Roberts & Thompson 评分(表1, Table 1)。发现治疗组的评分明显低于模型组,统计学处理两组的差别有显著性。模型组和治疗组与对照组相比,差别亦有显著性。

表1. 第21周小鼠主动脉损伤的评分

Table 1. Comparison of Roberts and Thompson scores at the 21st weeks.

Groups	n	scores
Control	10	0
Model	10	8.0 ± 1.2^a
Cure	10	4.1 ± 2.2^{ab}

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with model group

2.4 小鼠血清总胆固醇和甘油三酯的变化

如表2(Table 2)和表3(Table 3)所示,小鼠血清总胆固醇和甘油三酯在饲喂致动脉粥样硬化饮食前,即0周,水平比较接近,统计学处理,差别无显著性。经过17周的致动脉粥样硬化饮食饲喂,两者均有很大幅度的上升,高于对照组的三倍,而且差别有显著性。在第21周,已经撤去致动脉粥样硬化饮食4周,此时未经消斑肽(XBP-01)治疗的模型组血清总胆固醇和甘油三酯略有下降,但仍处于高水平,甘油三酯下降的幅度略大,两组与对照组相比,差别仍有显著性。治疗组血清总胆固醇和甘油三酯均有大幅度下降,虽然仍高于对照组,但统计学处理差别不显著。证明消斑肽(XBP-01)有使血清总胆固醇和甘油三酯降低的显著效果。

表2. 实验前、第17周和第21周时各组小鼠血清总胆固醇的比较

Table 2. Comparison of the serum total cholesterol at 0, 17th and 21st week ($\bar{x} \pm s$, g/L, $n = 10$)

Groups	0 week	17th weeks	21st weeks
Control	0.842 ± 0.147	1.086 ± 0.317	0.979 ± 0.125
Model	0.911 ± 0.195	3.694 ± 0.278^a	3.177 ± 0.311^a
Cure	0.977 ± 0.213	3.530 ± 0.163^a	1.223 ± 0.266

a: $P < 0.05$, compared with control group

表3. 实验前、第17周和第21周时各组小鼠血清甘油三酯的比较

Table 3. Comparison of the serum triglyceride at 0, 17th and 21st week ($\bar{x} \pm s$, g/L, $n = 10$)

Groups	0 week	17th weeks	21st weeks
Control	1.107 ± 0.346	1.248 ± 0.721	1.071 ± 0.411
Model	0.970 ± 0.295	3.071 ± 0.261^a	2.628 ± 0.300^a
Cure	1.093 ± 0.294	2.909 ± 0.132^a	1.389 ± 0.272

a: $P < 0.05$, compared with control group

3 讨论

C57BL/6J 小鼠是动脉粥样硬化敏感动物, 受 Ath- 1^[3]、Ath- 2^[4]、Ath- 3^[5] 等基因的调控, 是最易形成动脉粥样硬化的小鼠品系, 饲喂高胆固醇饮食的 10~20 周在主动脉窦瓣膜部位可形成典型的动脉粥样硬化斑块, 这种斑块与家兔、大鼠饲喂致动脉粥样硬化饮食后形成的斑块相似, 主要是充满泡沫细胞的脂质条纹(伴有高胆固醇血症和高甘油三酯血症)^[2,6]。Constantini 等^[7]把致动脉粥样硬化饮食逐渐换成正常饮食, 经长时间后, 这种脂质条纹会被纤维帽所覆盖, 与人的动脉粥样硬化病理变化很相似。我们实验室也曾使用该小鼠复制成 As 模型, 其优点是时间短, 所形成的斑块与人类冠心病接近, 所需治疗的药物少^[8]。在本实验中, 我们对 8 周龄 C57BL/6J 小鼠持续饲喂致动脉粥样硬化饮食 17 周后, 在主动脉窦部位可以观察到多个大小不等的动脉粥样硬化斑块, 同时血清总胆固醇和甘油三酯升高。

动脉粥样硬化的药物消斑是一个诱人的课题, 具有广阔的发展前景, 许多人已做过这方面的工作, 但尚未有满意的结果。生物毒素中有许多有药效的物质, 而且有些已用来治疗心脑血管疾病, 并且生物毒素抗动脉粥样硬化研究也有人作过尝试。Epstein 等^[9]和 Casscells 等^[10]用绿脓杆菌外毒素(Pseudomonas Exotoxin)、Saporin 毒素与 α 转化生长因子(TGF- α)或碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)交联后, 可以选择性地杀伤快速增殖的平滑肌细胞, 这些工作有助于抗动脉粥样硬化的进一步研究。

我们从 17 周开始对已形成 As 的小鼠使用消斑肽(XBP-01)进行治疗, 用量为 3.2 $\mu\text{g/g}$, 根据小鼠细胞外液的含量(约 20%), 可计算出消斑肽(XBP-01)在体液中的浓度约为 15 mg/L。在前后 4 周的用药实验中, 未发现小鼠因用药而中毒致死, 说明用该浓度可在较长时间内可持续用药。

药物治疗后, 我们从主动脉窦部位向主动脉做连续切片, 每间隔 100 μm 选择一张切片(共计 10 张)作 Roberts & Thompson 评分, 在具备可比性的条件下观察了消斑治疗组的动脉粥样硬化斑块与模型组的区别。形态学表现显示了治疗组在斑块数目、平均斑块大小、斑块中最多泡沫细胞数、中膜损伤和内皮突起等方面均明显小于模型组, 提示消斑肽(XBP-01)能有效地消除 C57BL/6J 小鼠既已形成

的动脉粥样硬化斑块, 或阻止新近斑块或泡沫细胞的形成。在复制成小鼠动脉粥样硬化模型后, 经消斑肽(XBP-01)治疗后, 血清总胆固醇和甘油三酯下降明显, 接近对照组, 差别无显著性。模型组则略有下降, 与对照组差别仍有显著性, 说明血脂下降的原因不单是因为把致动脉粥样硬化饲料换成普通饲料的缘故。消斑肽(XBP-01)在斑块消除过程中, 血胆固醇和甘油三酯下降有两大优点: 一是阻断了形成斑块的主要来源; 二是防止斑块进一步发展。这为将来应用到临床提供了极大的可能性。

与现在临床上所使用的血脂代谢调节剂、钙离子拮抗剂、抗氧化剂等抗动脉粥样硬化的药物不同, 消斑肽(XBP-01)是以消除斑块为主要作用机制并伴有降低血脂, 显示出显著的抗动脉粥样硬化效应。

参考文献

- 1 杨永宗, 杨小毅, 袁中华. 消斑肽能逆转平滑肌细胞源性泡沫细胞. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(4): 275-278
- 2 Stewart PJL, Lough J, Skamene E. Genetically determined susceptibility and resistance to diet-induced atherosclerosis in inbred strains of mice. J Lab Clin Med, 1988, 112: 36-42
- 3 Paigen B. Ath- 1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 3763-3767
- 4 Paigen B, Nesbitt MN, Metcalf D, et al. Ath- 2, a second gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. Genetics, 1989, 122: 163-168
- 5 Stewart-Phillips JL. Ath- 3, a new gene for susceptibility to atherosclerosis in mice. Clin Invest Med, 1989, 12: 121-126
- 6 Beverly P, Morrow A, Brandon C, et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. Atherosclerosis, 1985, 57: 65-73
- 7 Constantinides P, Booth J, Carlson G. Production of advanced cholesterol atherosclerosis in the rabbit. Arch Path, 1960, 70: 712-720
- 8 杨小毅, 杨永宗, 谭健苗, 等. 一种纯系小鼠动脉粥样硬化病理模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(1): 54-57
- 9 Epstein SE, Siegall CB, Biro S, et al. Cytotoxic effects of arecombinant chimeric toxin on rapidly proliferating vascular smooth muscle cells. Circulation, 1991, 84(2): 778-787
- 10 Casscells W, Wai C, Shrivastav S, et al. Smooth muscle proliferating in vessel injury is characterized by expression of fibroblast growth factor receptors and is inhibited by a toxin-fibroblast growth factor conjugate. Circulation, 1990, 82(4): 208

(此文 1998-06-26 收到, 1999-08-09 修回)

(此文编辑 胡必利)