

刺梨汁对金黄地鼠的抗动脉粥样硬化作用

汪俊军, 刘小传, 刘效林, 庄一义, 李露言

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 动脉粥样硬化; 脂蛋白, 低密度; 抗氧化剂; 刺梨汁; 维生素 C; 金黄地鼠

[摘要] 为寻找有效抗脂蛋白氧化剂防治动脉粥样硬化, 在建立金黄地鼠的动脉粥样硬化模型过程中, 分别补充维生素 C、维生素 E 及刺梨汁, 分析血浆脂质、抗氧化剂水平, 低密度脂蛋白氧化易感性及动脉粥样硬化发生程度的变化。结果发现, 高胆固醇饲料喂养 10 周后, 各组实验动物血脂水平均升高, 且伴有主动粥样硬化斑块的形成; 各抗氧化干预组血浆中相应的抗氧化剂水平均显著升高, 低密度脂蛋白氧化性增强 (维生素 C 组、维生素 E 组、刺梨汁组和对照组的低密度脂蛋白氧化延迟时间分别为 221 ± 56 min、 222 ± 60 min、 248 ± 48 min 和 181 ± 47 min, 组间比较 $P < 0.05$), 动脉粥样硬化斑块面积均显著减少 (维生素 C 组、维生素 E 组、刺梨汁组和对照组粥样硬化斑块程度分别为 $2.63\% \pm 1.35\%$ 、 $2.44\% \pm 1.47\%$ 、 $1.43\% \pm 0.92\%$ 和 $5.62\% \pm 1.28\%$, 组间比较 $P < 0.001$), 以刺梨汁组减少最明显。相关分析表明, 主动粥样硬化面积程度与低密度脂蛋白氧化延迟时间呈显著负相关 ($r = -0.42$, $P < 0.05$), 低密度脂蛋白氧化延迟时间与血浆维生素 E 水平呈正相关 ($r = 0.36$, $P < 0.05$)。结果提示, 抗氧化剂改善低密度脂蛋白氧化易感性, 降低动脉粥样硬化的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Rose Roxburghii Tratt Juice on Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Hamsters

WANG Jun- Jun, LIU Xiao- Zhuan, LIU Xiao- Lin, ZHUANG Yi- Yi, and LI Lu- Yan

(Department of Medical Examination, Jingling Hospital, Nanjing 210002, China)

MeSH Atherosclerosis; Lipoproteins, LDL; Antioxidant; Rose Roxburghii Tratt; Vitamin C; Hamsters

ABSTRACT **Aim** To look for effective antioxidant to reduce risk of atherosclerosis. **Methods** The golden hamsters were fed for 10 weeks on a hypercholesterolemic diet. The animals received either vitamin C, vitamin E or juice of rose roxburghii tratt (JRRT) supplement in their diet except control animals. **Results** The level of corresponding antioxidants in various antioxidant-supplemented animals were increased compared to controls. The antioxidants induced the prolongation of lag time in low density lipoprotein (LDL) oxidation in vitamin C, vitamin E, JRRT groups compared with controls (221 ± 56 min, 222 ± 60 min, 248 ± 48 min, and 181 ± 47 min, compared between groups, $P < 0.05$, respectively) and decreased the area of atherosclerosis lesion ($2.63\% \pm 1.35\%$, $2.44\% \pm 1.47\%$, $1.43\% \pm 0.92\%$, and $5.62\% \pm 1.28\%$, compared between groups, $P < 0.001$, respectively). Regression analysis showed that there was a negative relationship between the area of atherosclerosis lesion and LDL susceptibility. LDL susceptibility was also correlated with the plasma level of vitamin E. **Conclusions** Antioxidants decrease extent of atherosclerosis lesion, and this may be caused by change in susceptibility of LDL oxidation. JRRT is a strong antioxidant for reducing risk of atherosclerosis.

低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 被氧化修饰在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成中起着重要作用, LDL 氧化易感性与动脉粥样硬化的发生及其程度相关^[1,2]。As 患者血浆维生素 E 和 C 浓度下降, 补充维生素能增加 LDL 抗氧化性。动

物试验表明, 摄入高浓度的抗氧化剂能降低动脉粥样斑块的形成^[3,4]。抗氧化剂防治 As 是当前研究的热点, 补充过高浓度维生素可能对人体有害, 选择有效、无毒性抗氧化剂将有助于 As 防治。天然刺梨汁 (juice of rose roxburghii tratt, JRRT) 具高效抗氧化作用^[5], 本文在建立金黄地鼠的 As 模型过程中进行抗氧化观察, 分析血浆脂质、抗氧化剂水平, LDL 氧化易感性及 As 发生程度的变化, 为 JRRT 防治 As 提供理论基础和实验依据。

[基金项目] 江苏省应用基础研究基金 (BJ97111) 资助

[作者简介] 汪俊军, 男, 1966 年出生, 硕士研究生。主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究, 在国内外发表有关研究论文 50 多篇。

1 材料与方法

1.1 饲料

普通饲料配方: 玉米 24.5%、麸皮 24.5%、大麦 21%、豆饼 12%、鱼粉 6.0% 和其它 12%, 含适量复合维生素。高胆固醇饲料在普通饲料中加入 0.2% 胆固醇、10% 植物油。抗氧化剂饲料为高胆固醇饲料中分别添加 0.2% 维生素 C、0.25% 维生素 E 或 5% 新鲜刺梨汁(含维生素 C 120 mmol/L)。各种饲料每四周配置一次, -20℃ 避光保存备用, 以防抗氧化剂氧化破坏。

1.2 实验动物及分组

金黄地鼠, 雄性, 75~85 g, 随机分为四组, 每组 15 只。对照组喂高胆固醇饲料; 维生素 C 组、维生素 E 组、刺梨汁组分别喂维生素 C、维生素 E 或刺梨汁抗氧化剂饲料。自由饮食 10 周后, 收集空腹血浆, EDTA-Na₂ (1 g/L) 抗凝, 处死动物并剥离主动脉。为观察 As 发生程度, 在实验的不同阶段每组有 3 只动物已分别被处死, 资料分析中未包括。

1.3 血脂及抗氧化剂测定

酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG), 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 用自动化分析仪一步直接测定法。Lowry 法测定蛋白质 (protein) 含量, 标准品为牛血清白蛋白。维生素 C 和 E 测定试剂由南京建成生物工程研究所提供。硫代巴比妥酸法测定血浆脂质过氧化, 硫代巴比妥酸反应物质 (thiobarbitric acid reactive substance, TBARS) 值以丙二醛含量表示。

1.4 低密度脂蛋白氧化易感性^[2]

序列超速离心提取血浆 LDL (d=1.025~1.055 g/ml), 4℃ 保存 (含 EDTA-Na₂ 1 g/L)。在透析去除 EDTA-Na₂ 的 LDL (0.05 g/L) 中加入 CuSO₄ 溶液 (终浓度 10 μmol/L), 37℃, 每 5 min 于波长 234 nm 测吸光度值。脂蛋白内多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 被氧化形成共轭双烯 (CD), 在 234 nm 处有最大吸收峰。根据 LDL 氧化产生的共轭双烯量随时间变化绘制氧化曲线, 分为三个阶段: 延迟阶段、增殖阶段及降解阶段。延迟阶段以延迟时间 (lag time) 表示, 反映 LDL 抗氧化能力。

1.5 动脉粥样斑块测量

将剥离干净的主动脉上至左心室半月瓣, 下至胸主动脉终端, 沿前壁中线纵行剖开, 冲洗, 平铺在载玻片上, 苏丹 Ⅲ 染色, 体视显微镜摄影, 经计算机

分析处理, 以红染部位面积占动脉内膜总面积的百分比表示动脉粥样硬化程度。

1.6 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据处理采用方差分析及单、多因素相关分析。

2 结果

2.1 血脂水平变化

胆固醇饲料喂养 10 周后, 各组动物体重、血糖水平无显著性差别, 且均具有高浓度血脂水平。方差分析发现, 组间 TC 和 TG 无显著性差别, 而 HDLC 浓度组间有显著性差别。两两比较发现, 刺梨汁组 HDLC 较维生素 C 组和 E 组均升高, 表明刺梨汁有提高血浆 HDLC 效果 (表 1, Table 1)。

表 1 各组动物血脂水平

Table 1 Serum lipids level in hamsters ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Groups	TC	TG	HDLC
Control	17.32 ± 9.55	14.39 ± 5.46	2.22 ± 0.65*
Vit C	15.10 ± 5.64	16.12 ± 5.19	1.81 ± 0.39*
Vit E	11.79 ± 4.32	12.53 ± 4.58	1.88 ± 0.39*
JRRT	17.55 ± 4.32	17.19 ± 4.40	2.36 ± 0.61* ^a

* $P < 0.05$, significant difference between the groups, a: $P < 0.05$, compared with Vit C, and E

2.2 血浆抗氧化剂水平、LDL 氧化易感性及动脉粥样硬化程度

各组间维生素 C 和维生素 E 水平均有显著差别, 维生素 C 组、维生素 E 组和刺梨汁组三组血浆中相应的抗氧化剂水平较对照组均显著升高; 各组间 LDL 氧化延迟时间亦具显著差别, 刺梨汁组较对照组显著加大; 血浆 TBARS 水平有降低趋势, 但无统计学差别。各组动物主动脉内膜均出现斑块, 用药三组斑块面积均显著下降, 刺梨汁组下降最明显 (表 2, Table 2)。

2.3 相关分析

单因素分析结果表明, 动脉粥样硬化形成的程度仅与 LDL 氧化延迟时间呈负相关 ($r = -0.42$, $P < 0.05$); LDL 氧化延迟时间与血浆中维生素 E 水平正相关 ($r = 0.36$, $P < 0.05$) (图 1, Figure 1)。

多元逐步回归检验结果发现, 仅 LDL 氧化延迟时间对动脉粥样硬化形成有影响 ($\beta = -0.41$, $P < 0.01$)。

表 2 各组动物血浆抗氧化剂水平、低密度脂蛋白氧化易感性及动脉粥样硬化斑块面积的比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 2 The level of antioxidant, the lag time of LDL oxidation and the area of atherosclerosis lesion in hamsters

Groups	Vit C (mg/L)	Vit E (mg/L)	TBARS (nmol/L)	Lag- Time (min)	Area (%)
Control	8.0 \pm 5.0 ^{* *}	32.1 \pm 30.1 ^{* *}	6.94 \pm 3.32	181.0 \pm 46.8 [*]	5.62 \pm 1.28 ^{* *}
Vit C	15.5 \pm 5.1 ^{* * a}	32.9 \pm 26.7 ^{* *}	5.96 \pm 1.81	220.6 \pm 55.7 [*]	2.63 \pm 1.35 ^{* * c}
Vit E	8.9 \pm 4.4 ^{* *}	60.0 \pm 26.7 ^{* * b}	6.08 \pm 1.82	222.1 \pm 60.4 [*]	2.44 \pm 1.47 ^{* * c}
JRRT	20.6 \pm 10.0 ^{* * c}	38.4 \pm 17.9 ^{* *}	5.53 \pm 1.60	247.8 \pm 48.2 ^{* b}	1.43 \pm 0.92 ^{* * c}

* $P < 0.05$, * * $P < 0.001$, significant difference between the groups. a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$; c: $P < 0.001$, Compared with control group.

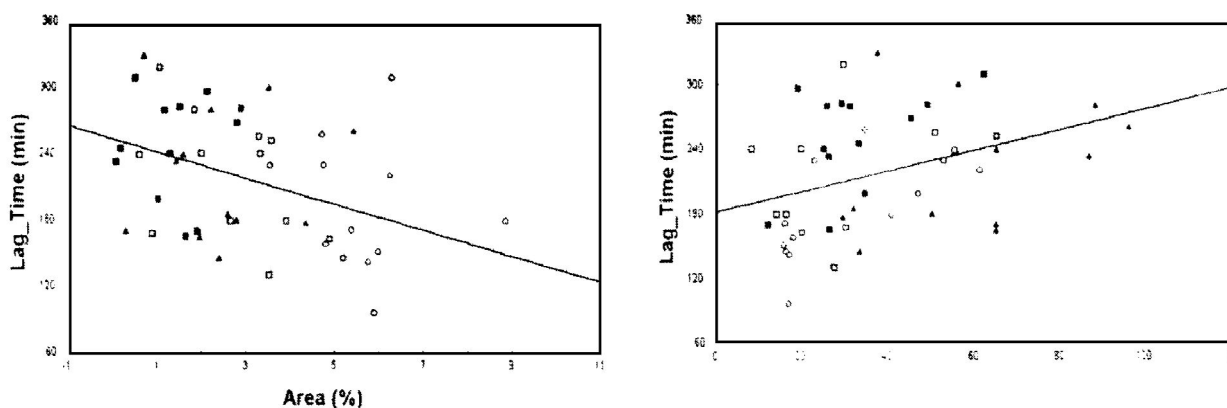


图 1 低密度脂蛋白氧化延迟时间与动脉粥样硬化程度及血浆维生素 E 水平相关分析

Figure 1 The relations between lag time of LDL oxidation and the area of atherosclerosis lesion, plasma Vit E level. ○ Control, □ Vit C, △ Vit E, ■ JRRT

3 讨论

以往国内多采用高胆固醇血症家兔为动脉粥样硬化研究模型,但家兔以 β -VLDL为主要的致病脂蛋白不经氧化修饰就可被巨噬细胞大量吞噬,不同于人体内LDL的致病作用,只有被氧化修饰才易被巨噬细胞经清道夫受体识别和大量摄取,导致细胞内胆固醇酯的蓄积,促进泡沫细胞的形成,参与As的发生^[6]。故本文选用高胆固醇饲料喂养金黄地鼠导致高血脂水平及主动脉内膜动脉粥样硬化斑块的形成,结果发现动脉粥样硬化发生程度仅与LDL氧化延迟时间显著相关,表明本模型适合于氧化型LDL致As作用研究,这也是目前国外学者进行该领域研究常采用的模型之一。鉴于从正常饮食中可摄入一定量抗氧化剂,我们设计实验时在各组饲料中均添加了正常剂量的复合维生素,可能是本组实验动物动脉粥样硬化程度相对较轻的缘故。

经抗氧化干预,维生素C、维生素E和刺梨汁均显著降低动脉粥样硬化斑块形成,尤以刺梨汁效果明显。补充脂溶性维生素E,可增加血浆及LDL中维生素E含量,增强LDL抗氧化性,降低动脉粥样硬化程度,众多的动物实验证实了这一点。文献报道维生素E同时具有降脂效果,本文中维生素E组

TC和TG亦有下降趋势。水溶性维生素C具有双重抗氧化功能,一方面对水溶性自由基有直接消除功能,阻断LDL氧化的自由基链式反应过程;另一方面可通过对维生素E衍生的 α -生育酚基起保护作用使维生素E再循环,间接起到抗氧化作用^[5,7],本实验亦表明其抗动脉粥样硬化作用。我们以往的研究表明天然刺梨汁同维生素C和维生素E相似,具有极强的抗氧化作用,细胞或铜离子氧化LDL体系中加入刺梨汁,均能抑制LDL氧化作用,导致脂蛋白电泳迁移率及氧化产物(TBARS值)降低;LDL抗氧化性亦增强。刺梨汁除富含维生素C外,还含黄酮类、维生素E等其他多种维生素及具有对自由基清除作用的超氧化物歧化酶,它的高效抗氧化作用可能是多种成份协同作用的结果^[5];与维生素相比较,刺梨汁可能还有升高HDL水平的优点,说明刺梨汁具高效抗动脉粥样硬化作用。

小颗粒致密的B型LDL因易于氧化被确认为As发生的强危险因素^[8],抗氧化剂改善LDL氧化易感性,降低动脉粥样硬化的发生^[3,4]。本文各干预组血浆中相应的抗氧化剂水平均显著升高,LDL氧化延迟时间增加,相关分析表明动脉粥样硬化程度与LDL氧化的延迟显著相关,而常用的血浆TBARS值并无变化,LDL氧化易感性被认为是评价氧化型

LDL 与 As 关系的理想指标。LDL 氧化的延迟阶段长短主要由其核心的脂溶性维生素 E 水平决定。本文资料亦显示 LDL 氧化延迟时间同血浆维生素 E 浓度相关,与之相符。我们既往的研究还表明,冠心病患者口服刺梨汁后血浆维生素 C 和维生素 E 水平显著升高,LDL 氧化延迟时间亦明显延长,血浆氧化 LDL 水平及 LDL 氧化程度均显著降低,且具有降低血浆 TG 的作用^[9]。

刺梨汁是一种富含多种抗氧化剂的天然果汁,体外实验、动物实验及临床观察均表明它具有高效的抗 As 作用,有良好的应用前景。本试验同时建立了适于氧化 LDL 致 As 作用研究的动物模型,为寻找有效抗氧化剂,防治 As 提供理论基础和途径。

参考文献

- [1] Paul H, Desire C. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **137**: S33- 38
- [2] 汪俊军, 刘小传, 庄一义, 等. 冠心病患者低密度脂蛋白亚组分的分布及氧化易感性 [J]. *中华医学杂志*, 1998, **78** (11): 833- 834
- [3] Todd S, Woodward M, Bolton SC. An investigation of the relationship between antioxidant vitamin intake and coronary heart disease in men and women using logistic regression analysis [J]. *J Clin Epidemiol*, 1995, **48**: 307- 316
- [4] Xu R, Yokoyama WH, Irving D, et al. Effect of dietary catechin and vitamin E on aortic fatty streak accumulation in hypercholesterolemic hamsters [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **137**: 29- 36
- [5] 张春妮, 庄一义, 汪俊军, 等. 维生素 C、刺梨汁对脂蛋白氧化修饰的抑制作用 [J]. *南京大学学报*, 1997, **33**: 142- 145
- [6] Tijburg LBM, Wiseman SA, Meijer GW, et al. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **135**: 37- 47
- [7] Viana M, Barbas C, Bonet B, et al. In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **123**: 83- 91
- [8] Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, et al. Predominance of dense low density lipoprotein particles predicts angiographic benefit therapy in Stanford coronary risk intervention project [J]. *Circulation*, 1996, **24**: 2 146- 153
- [9] 汪俊军, 刘小传, 刘效林, 等. 冠心病患者口服刺梨汁抗低密度脂蛋白氧化作用的研究 [J]. *江苏医药*, 1999, **25** (10): 18- 20

(此文 2000- 08- 31 收到, 2000- 12- 08 修回)

(此文编辑 文玉珊, 胡必利)