

普罗布考对高脂家兔胸主动脉内皮 储备功能的保护作用

赵 刚, 周京敏, 李双杰¹, 卜丽萍, 章朝霞, 张新刚, 李高平, 葛均波

(上海市心血管病研究所, 复旦大学附属中山医院, 上海市 200032; 1. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 高胆固醇血症; 普罗布考; 内皮储备功能; 兔胸主动脉

[摘要] 为观察口服普罗布考对高胆固醇血症和动脉粥样硬化兔主动脉的内皮储备功能的影响, 并探讨其可能作用机制。将 26 只新西兰白兔(体重 1.5~2.5 kg)随机分为 3 组: 正常饮食组(普通饮食, $n=6$)、高脂饮食组(高脂饮食, $n=10$)、普罗布考治疗组(高脂饮食+普罗布考 200 mg/kg, $n=10$)。在高脂饲养前和饲养后第 12 周, 抽血测血清总胆固醇浓度。第 12 周后处死动物, 取胸主动脉, 检测离体胸主动脉环对乙酰胆碱与硝普钠的反应。结果发现, ①普罗布考有降血脂作用(39.1%); ②与正常饮食组相比, 高脂血症兔胸主动脉对乙酰胆碱引起的最大的内皮依赖性舒张反应明显降低(0.65 ± 0.14 比 0.16 ± 0.04 , $P < 0.05$), 普罗布考能明显保护高胆固醇血症所损伤的内皮依赖性舒张反应(两组最大血管舒张度分别为 0.60 ± 0.10 比 0.16 ± 0.04 , $P < 0.05$); ③3 组对硝普钠所致的非内皮依赖性舒张反应均没有差别。结果提示普罗布考主要是通过降血脂和抗氧化两个途径来保护高脂家兔胸主动脉内皮储备功能。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Protection of probucol on endothelial dysfunction of HCHF-diet rabbits

ZHAO Gang, ZHOU Jing-Ming, LI Shuang-Jie², BU Li-Ping, ZHANG Zhao-Xia, ZHANG Xing-Gang,

LI Gao-Ping, and GE Jun-Bo

(Institute of Shanghai Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032; 1. Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Hypercholesterolemia; Probucol; Endothelial Function; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of probucol on endothelium-dependent vasodilator activity in high cholesterol plus high fat diet (HCHF) rabbits. **Methods** 26 New Zealand white rabbits (1.5~2.5 kg) were randomly divided into three groups, that is, control group ($n=6$, normal diet); hyperlipidemic group ($n=10$, HCHF-diet); probucol group ($n=10$, HCHF-diet plus probucol 200 mg/kg everyday). There blood was drawn from the central ear artery to analyze plasma total cholesterol (TC) at the pre-experiment and in the 12th week of post experiment. Then all rabbits were killed in the 12th week and thoracic aortas were isolated to analyze vascular endothelial function. **Results** Probucol could remarkably lower plasma TC level, compared to hyperlipidemic group, TC level decreased 39.1% in probucol group ($P < 0.01$). The HCHF diet significantly attenuated endothelium-dependent relaxation (EDR) of rabbit aortic rings to acetylcholine (Ach), but probucol could significantly protected against HCHF diet-injured EDR of rabbit aortic rings. The HCHF diet and probucol did not significantly influence the endothelium-independent relaxation of the rabbit artery elicited by sodium nitroprusside (SNP). **Conclusion** Probucol can protect against injuries of vascular endothelial function induced by hypercholesterolemia through lowering plasma TC and anti-oxidant.

血管内皮损伤是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的始动环节, 而血管内皮依赖性舒张(endothelium-dependent relaxation, EDR)反应的减弱是 As 的一个重要特征^[1]。普罗布考(probucol)从 1997 年在国内首次上市以来, 主要作为降血脂及抗氧化

剂, 近年的研究发现其有内皮储备功能保护的作用^[2,4]。本研究旨在进一步探讨口服普罗布考能否改善高胆固醇血症和动脉粥样硬化兔胸主动脉的内皮储备功能。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)动物: 26 只新西兰白兔由复旦大学上海医学院实验动物部提供。(2)试剂及药物: 乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)和苯肾上腺素; 硝普钠(nitroprus-

[收稿日期] 2003-09-29

[修回日期] 2004-05-18

[作者简介] 赵刚, 硕士, 研究方向为冠心病诊断和治疗。葛均波, 教授, 长江特聘学者, 博士研究生导师, 上海市心血管病研究所副所长, 心内科主任, 导管室主任, 国外发表论文 200 余篇, 其中 1/3 以第一作者身份被 SCI 收录。

side, SNP)。普罗布考由山东齐鲁药厂提供。

1.2 动物模型的制备

24只新西兰大白兔随机分为3组:正常饮食组6只,普通饲料饲养;高脂饮食组10只,高脂饲料喂养;普罗布考组10只,高脂饲料+普罗布考(200 mg/kg)。高脂饲料配方为1%胆固醇、7.5%蛋黄粉、8%猪油和83.5%普通饲料。所有动物单笼饲养,饮水不限,共喂养12周。

1.3 血清总胆固醇浓度测定

取血前兔禁食1晚,次日晨自兔耳中央动脉取血2 mL,用商品药盒(日本产)按药盒说明采用酶标法测TC浓度。

1.4 血管内皮功能的检测

12周后所有家兔均经气体栓塞法处死,迅速取其胸主动脉作离体实验,观察对ACh的血管舒张活动的程度,藉以判断内皮储备功能。具体实验步骤如下:胸主动脉置于通以95%O₂+5%CO₂混合气体的37℃克氏液(mmol/L)(NaCl 118, KCl 4.8, MgSO₄ 1.2, NaCO₃ 24, 葡萄糖 11, 依地酸 0.03)中。清除血管周围组织,冲洗血管内血液,剪成长4~5 mm血管环,冲洗血管内血液,用不锈钢钩固定于含克氏液的浴槽,并通过张力换能器将血管收缩与舒张反应记录于二道生理记录仪。静息张力为3 g,平衡120 min后,用苯肾上腺素(10⁻⁷ mol/L)预收缩血管环,达坪值后分别用10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L ACh累加剂量舒张血管环,观察ACh引起的EDR反应。血管环冲洗后平衡15 min,再用苯肾上腺素收缩血管环,达坪值后分别用累加剂量的硝普钠(10⁻⁸~10⁻⁶ mol/L)舒张血管,观察硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应。在二道生理仪的记录纸上测量苯肾上腺素收缩坪值的水平线与初始稳定状态的水平线之间的距离(记为A),以及每一剂量的ACh或硝普钠干预后血管舒张水平线与苯肾上腺素收缩坪值的水平线之间的距离(记为B),血管舒张度则以公式B/A表示。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS11.0软件包,经方差齐性检验后,多组间比较用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 血清总胆固醇浓度

实验结束后,以高脂饲料喂养的两组动物TC较正常饮食组均显著升高。普罗布考组血脂明显低于高脂组(表1, Table 1)。

表1. 实验前后血清总胆固醇水平的变化

Table 1. The changes of plasma TC between pre-experiment and post-experiment

分 组	n	实验前	实验第12周
正常饮食组	6	46.3 ± 14.3	47.5 ± 7.3
高脂饮食组	10	49.7 ± 7.9	841 ± 53 ^{ac}
普罗布考组	10	43.6 ± 6.0	512 ± 87 ^{bc}

a: $P<0.05$,与正常饮食组比较;b: $P<0.05$,与高脂饮食组比较;c: $P<0.001$,与实验前比较。

2.2 普罗布考对高脂饮食致内皮依赖性舒张降低的保护作用

高脂饮食使兔胸主动脉内皮依赖性舒张明显减弱,普罗布考治疗可以对抗高脂血症所致的EDR减弱(图1, Figure 1)。内皮依赖性舒张量效曲线显示,普罗布考治疗的量效曲线接近正常组,而高脂饮食曲线明显右移。ACh (10⁻⁵ mol/L)引起EDR的血管最大舒张度,高脂饮食组(0.16 ± 0.04)与正常饮食组(0.65 ± 0.14)比较差异有显著性($P<0.05$),普罗布考干预组(0.60 ± 0.10)与正常饮食组比较差异无显著性($P>0.05$),而与高脂饮食组比较差异有显著性($P<0.01$)。

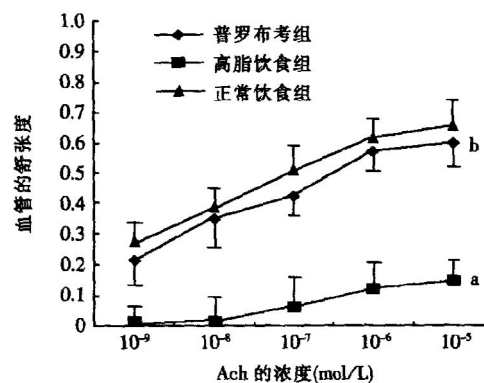


图1. 各组兔胸主动脉对乙酰胆碱引起舒张反应的量效曲线

a: $P<0.05$,与正常饮食组比较;b: $P<0.05$,与高脂饮食组相比较。

Figure 1. The curve of dose-response of aortic rings induced by ACh in different diet rabbits

2.3 普罗布考对兔胸主动脉环非内皮依赖性血管舒张反应的影响

三组兔胸主动脉环对硝普钠(10⁻⁸~10⁻⁶ mol/L)所致的非内皮依赖性血管舒张反应的量效曲线非常接近(图2, Figure 2),10⁻⁶ mol/L的硝普钠引起三组最大的血管舒张度均达到100%,即完全舒张状态,三组间比较无明显差别。

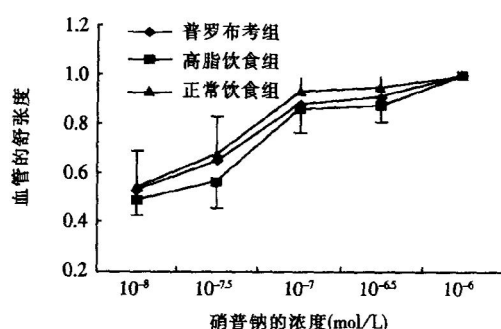


图 2. 各组兔对硝普钠引起非内皮依赖舒张反应的量效曲线
Figure 2. The curve of dose-response of aortic rings induced by SNP in different diet rabbits

3 讨论

内皮储备功能降低是 As 发生的始动环节,保护内皮储备功能对于防治 As 的发生有着重要的意义。所谓内皮储备功能^[5]是指血管内皮细胞在受到应激性刺激—包括物理性刺激(如反应性充血、冷物质刺激等)和化学性刺激(如药物 Ach、缓激肽等)时作出反应的能力,其反应能力代表血管内皮细胞功能的变化。在本实验中作者把血管内皮细胞在受到 Ach 刺激后释放一氧化氮(nitrous oxide, NO)引起血管舒张的程度作为测定内皮储备功能的指标。实验结果表明,实验性高胆固醇血症兔主动脉对内皮依赖性扩血管药物 Ach 的扩张作用明显减弱,普罗布考可改善高胆固醇血症兔主动脉对 Ach 的舒张程度。而高胆固醇血症不影响非内皮依赖性扩血管药硝普钠(提供外源性 NO)的扩血管作用。这些提示普罗布考的作用主要是阻滞了高胆固醇血症对内皮依赖性舒张功能的损害机制。

高胆固醇血症时动脉内皮依赖的舒张反应受损,其机制目前认为是 NO 灭活过多所致^[6],而不是 NO 生成减少、精氨酸底物不足或 NO 合成酶活性降低^[7]。高脂血症时高浓度的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)可灭活 NO^[8],使 EDR 减轻。本实验利用高脂饲料喂养兔 12 周,实验后高脂组总胆固醇较正常饮食组升高了 20 余倍,成功建立兔高胆固醇血症模型;普罗布考治疗组 TC 浓度较高脂组比较降低了 39.1%,亦即降低了 LDL,实现对 EDR 的保护作用。

另一方面,亦有研究表明粥样硬化性动脉的活性自由基包括氧自由基产生过多^[8],这些自由基既

可直接灭活 NO,又可使 LDL 氧化成氧化型 LDL(oxidized-LDL, ox-LDL),间接地灭活 NO。普罗布考除了是一种调脂药外,还是一强氧化剂(其抗氧化作用是维生素 E 的 5~6 倍^[9])。普罗布考具有断链抗氧化剂的活性,使自由基还原,形成相对稳定的化学基团,有效地阻止 LDL 氧化修饰^[10],阻断 ox-LDL 对 NO 灭活的间接途径,从而可以保护血管内皮储备功能。Anderson 等研究了普罗布考与降脂药物洛伐他汀联用对高脂血症患者冠状动脉内皮依赖性舒张反应的影响,发现单用洛伐他汀者冠状动脉对 Ach 的反应性无明显改善,而与普罗布考联用者冠状动脉内皮依赖性舒张功能显著改善,亦说明普罗布考可能与抑制体内 ox-LDL 的生成有关^[11]。临床观察,长期服用普罗布考可阻滞 As 病变发展,还可减少支架植入术后再狭窄 20% 的发生率^[12]。

综上所述,普罗布考通过其调血脂和抗氧化作用的综合效应实现对高脂家兔胸主动脉内皮储备功能的保护,表明普罗布考在保护血管内皮储备功能和预防动脉粥样硬化方面是有着广泛应用前景的药物。

[参考文献]

- [1] Simon BC, Cunningham LD, Cohen RA. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium-dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest*, 1990, 86 (1): 75-79
- [2] 张园园, 张运, 张梅, 高月花, 李秀昌, 李贵华, 等. 舒降之、普罗布考、开搏通和祛瘀消斑胶囊对食饵性兔动脉粥样硬化血管内皮舒张功能的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (2): 118-122
- [3] 黄虔, Grafe M, Grafe K, Fleck E. 普罗布考和抗氧化维生素不影响体外实验条件下内皮细胞的白细胞粘附. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (2): 115-118
- [4] 沈成兴, 罗俊, 刘乃丰, 陈日新. 丙丁酚对氧化型低密度脂蛋白损伤内皮的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 1997, 5 (1): 52-54
- [5] Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*, 2003, 8 (1): 71-86
- [6] Andrews TC, Raby K, Barry J, Naimi CL, Allred E, Ganz P, et al. Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. *Circulation*, 1997, 95 (2): 324-328
- [7] Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med*, 1988, 4 (2): 107-120
- [8] Henry PD, Cabello OA, Chen CH. Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol*, 1995, 6 (4): 190-195
- [9] Naito M, Hayashi T, Iguchi A. New approaches to the prevention of atherosclerosis. *Drugs*, 1995, 50 (3): 440-453
- [10] Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*, 1997, 337 (6): 408-416
- [11] Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med*, 1995, 332 (8): 488-493
- [12] Yokoi H, Daiba H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, et al. Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Probucol Angioplasty Restenosis Trial. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 30 (4): 855-862

(此文编辑 胡必利)