

# 葡萄籽原花青素降低动脉粥样硬化兔血清 C 反应蛋白水平

马亚兵, 高海青, 伊永亮, 冯孟林, 靖百谦, 于 洋

(山东大学齐鲁医院老年病科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 内科学; 葡萄籽原花青素预防动脉粥样硬化; 酶免疫测定法; 葡萄籽原花青素; 动脉粥样硬化; C 反应蛋白; 兔

[摘要] 探讨葡萄籽原花青素对动脉粥样硬化兔血清 C 反应蛋白的作用。15 只雄性新西兰大白兔随机分为正常对照组(喂饲标准颗粒饲料)、高脂模型组(喂饲含 1% 胆固醇的颗粒饲料)和葡萄籽原花青素组(喂饲含 1% 胆固醇和 1% 葡萄籽原花青素的颗粒饲料)。于实验开始前 1 天和实验后第 1、2、4、8、12 周末取空腹血, 检测血清 C 反应蛋白水平。在 12 周末, 所有大白兔经空腹取血后处死, 取其主动脉进行病理学分析。结果发现, 与高脂模型组比较, 葡萄籽原花青素组血清 C 反应蛋白水平在 1 周末即明显降低( $P < 0.001$ ), 并维持至实验结束。高脂模型组和葡萄籽原花青素组血清 C 反应蛋白水平与时间均呈现高度相关性( $r = 0.99047$ ,  $P < 0.001$  和  $r = 0.74777$ ,  $P < 0.001$ )。病理学分析发现, 葡萄籽原花青素组主动脉粥样硬化病变程度(主动脉壁厚度和泡沫细胞数量)比高脂模型组明显降低( $P < 0.01$ )。结果提示, 葡萄籽原花青素具有抗动脉粥样硬化作用, 其机制可能与降低血清 C 反应蛋白水平有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Serum C-reactive protein in Rabbits

MA Ya-Bing, GAO Hai-Qing, YI Yong-Liang, FENG Meng-Lin, JING Bai-Qian, and YU Yang

(Department of Geriatrics, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Grape Seed Proanthocyanidin; Atherosclerosis; C-Reactive Protein; Rabbits; Risk Factor

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on serum C-reactive protein (CRP) in rabbits. **Methods** 15 New Zealand male rabbits were randomized into three groups with 5 rabbits in each group.

The control group was fed with standard diet. The cholesterol group was fed with standard diet containing 1% cholesterol. The GSPE group was fed with standard diet containing 1% GSPE plus 1% cholesterol. All the rabbits were fed for twelve weeks. Blood samples were drawn from ear middle arteries of rabbits just before the experiment and at the first, the second, the fourth, the eighth and the twelfth weekend of the experiment. All the rabbits were fasted for at least eight hours before the blood was drawn.

Serum CRP was determined using a commercially available CRP EIA kit. All the rabbits were sacrificed at the twelfth weekend and aortas of the rabbits were excised for the morphological observation. Aorta samples were observed through optical microscope.

**Results** Compared with the cholesterol group, the serum CRP contents were lowered markedly by dietary GSPE ( $P < 0.001$ ) at the first weekend and lasted to the end of the experiment. Both the cholesterol group and the GSPE group showed high correlation of the treat and time ( $r = 0.99047$ ,  $P < 0.001$  and  $r = 0.74777$ ,  $P < 0.001$ ). The extent and severity of atherosclerosis (the thick of aortas and the number of foam cells) of the GSPE group were less than those of the cholesterol group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions** GSPE had the efficacy of anti-atherogenesis, one mechanism of which was that it can inhibit the CRP.

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidin extract, GSPE)是从葡萄籽中提取的多酚类混合物, 其原花青素含量超过 95%。原花青素具有多种生物学活性, 我们前期研究发现它可通过抗低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)氧化修饰<sup>[1]</sup>和调节血脂<sup>[2]</sup>而具有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作

用。C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是在某些疾病时出现于血清中的一种特殊蛋白质, 因其能沉淀肺炎球菌菌体的 C 多糖而得名。近年研究认为 CRP 是 As 发生的独立危险因素<sup>[3-11]</sup>, 并与 As 病变程度呈正相关<sup>[12]</sup>。为深入研究 GSPE 抗 As 的作用机制, 我们采用含 1% 胆固醇颗粒饲料喂养建立新西兰大白兔 As 模型, 在建立模型的同时用含 1% GSPE 颗粒饲料进行预防干预实验, 观察 GSPE 对血清 CRP 的影响。

## 1 材料与方

[收稿日期] 2003-08-13

[修回日期] 2004-03-14

[作者简介] 马亚兵, 医学硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的免疫学研究, E-mail 为 mayab@sdu.edu.cn。高海青, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为老年冠心病的病因学研究, 本文通讯作者。伊永亮, 老年医学硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的治疗。

### 1.1 材料

GSPE 中原花青素含量 96.08%, 购于天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 批号 20020525。胆固醇购于上海新兴化工试剂研究所, 批号 020628。兔 CRP 酶免疫试剂盒购于 Lifekey BioMediech Corporation, 批号 8070306, 灵敏度 1  $\mu\text{g/L}$ 。

### 1.2 动物分组与处理

雄性新西兰大白兔 15 只, 购自山东齐鲁制药厂 (合格证号为鲁动质字 D20020613 号), 6 月龄, 体重  $2.62 \pm 0.21 \text{ kg}$ 。分笼喂养, 自由饮水, 饲料量为每只每天 100~120 g。适应性喂养 1 周后, 随机分为 3 组, 每组 5 只。正常对照组每日给予标准颗粒饲料, 高脂模型组每日给予含 1% 胆固醇的颗粒饲料, GSPE 组给予含 1% GSPE 和 1% 胆固醇的颗粒饲料, 各组兔均喂饲 12 周。

### 1.3 标本获取

各组兔均于实验前 1 天及实验后第 1、2、4、8 及 12 周末获取血液标本。清晨空腹称量体重后, 经耳中动脉采血, 待自凝后, 4 000 r/min 离心 10 min, 留取血清用于测定 CRP。所有血样均保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱待测。

实验后第 12 周末, 先经耳中动脉采取空腹血 4 mL 待测, 然后用气栓法处死动物。剪取主动脉弓以下主动脉 3 cm 放入 10% 福尔马林内浸泡固定, 作肉眼观察、HE 染色检查。

### 1.4 血清 C 反应蛋白水平测定

血清 CRP 水平按试剂盒说明书进行测定。

### 1.5 主动脉病理学观察

主动脉切片用 HE 染色, 在 TD2000 图像分析仪下观察其形态学改变并摄像。根据斑块数目 (-、+) 的评分为 0、1, 血管壁增厚程度 ( $< 2.5 \mu\text{m}$ 、 $2.6 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 、 $3.6 \sim 4.5 \mu\text{m}$ 、 $> 4.6 \mu\text{m}$ ) 的评分为 0、1、2、3, 每高倍镜下泡沫细胞数 (0~1、2~4、 $> 5$ ) 的评分为 0、1、2, 中膜损伤 (-、+、++) 的评分为 0、1、2, 内膜突起 (-、+、++) 的评分为 0、1、2 等参数对兔主动脉损伤进行评分。

### 1.6 统计学分析

所有实验数据采用 SAS 8.2 软件进行统计分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间均数比较用混合式模型的变异数分析, 效应和时间回归分析用 Proc REG。

## 2 结果

### 2.1 血清 C 反应蛋白水平变化

预防干预前, 各组 CRP 水平均无显著性差异,

基线水平一致; 预防干预 1 周后, 高脂模型组 CRP 水平比对照组明显升高 ( $P < 0.001$ ), 直至实验结束; GSPE 组 CRP 水平比对照组明显升高 (1 周时  $P < 0.05$ , 2 周~8 周  $P < 0.01$ , 12 周时  $P < 0.001$ ); 但与高脂模型组相比 CRP 水平明显降低, 1 周时即有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 并直到实验结束。各组内 6 个时间点两两比较分析表明, 对照组均无显著性差异, 基线水平平稳。高脂模型组两两之间均有差异 (除了 1 周与 2 周、8 周与 12 周之间  $P < 0.01$ , 2 周与 4 周之间  $P < 0.001$  外, 其余  $P < 0.001$ ); GSPE 组除 0 周与 1~12 周 ( $P < 0.001$ )、1 周与 8 周 ( $P < 0.05$ )、1 周与 12 周 ( $P < 0.01$ ) 外, 其余各时间点无显著性差异 (表 1 和图 1, Table 1 and Figure 1)。以上结果表明, 高胆固醇饲料使 CRP 水平持续升高, 而 GSPE 虽不能使其恢复正常, 但可阻止其进一步升高, 表现出体内抗炎作用。

表 1. 各组血清 C 反应蛋白水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{g/L}$ )

Table 1. Serum C-reactive protein level in different groups

时间(周)	对照组	高脂模型组	葡萄籽原花青素组
0	282.4 $\pm$ 1.1	282.0 $\pm$ 3.1	281.9 $\pm$ 2.5
1	282.5 $\pm$ 1.2	336.6 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	286.7 $\pm$ 2.1 <sup>ad</sup>
2	282.4 $\pm$ 1.2	340.1 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	287.6 $\pm$ 2.0 <sup>bd</sup>
4	281.9 $\pm$ 1.3	344.1 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>	288.5 $\pm$ 2.6 <sup>bd</sup>
8	283.6 $\pm$ 4.1	349.0 $\pm$ 4.2 <sup>c</sup>	289.4 $\pm$ 2.8 <sup>bd</sup>
12	282.2 $\pm$ 5.1	352.3 $\pm$ 4.1 <sup>c</sup>	290.2 $\pm$ 3.1 <sup>cd</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.0001$ , 与对照组同时时间点比较;

d:  $P < 0.0001$ , 与高脂模型组同时时间点比较。

### 2.2 相关分析

高脂模型组效应与时间的自然对数高度相关 ( $r = 0.99047$ ,  $P < 0.001$ ), 回归方程为  $y = 336.52982 + 5.93797 \times \ln(t + 0.001)$ , ( $F = 1448.45$ ,  $R^2 = 0.9810$ ,  $P < 0.001$ ); GSPE 组效应与时间的自然对数也高度相关 ( $r = 0.74777$ ,  $P < 0.001$ ), 回归方程为  $y = 287.66084 + 0.65659 \times \ln(t + 0.001)$ , ( $F = 35.51$ ,  $R^2 = 0.5592$ ,  $P < 0.001$ )。由图 1 (Figure 1) 可以看出, 两组曲线明显不同, 表明由于 GSPE 的干预, 高胆固醇饮食兔血清中的 CRP 水平改变了其原有的变化趋势, 呈现低水平状态。

### 2.3 主动脉评分

根据评分标准, 高脂模型组和 GSPE 组主动脉均有损伤, 与对照组相比均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。但 GSPE 组损伤比高脂模型组明显减轻 ( $P < 0.01$ ; 表 2, Table 2)。

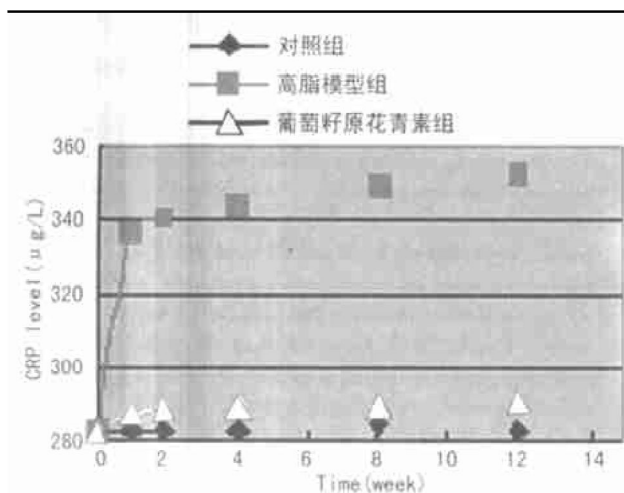


图 1. 各组血清 C 反应蛋白水平变化

Figure 1. Serum CRP level in different groups

表 2. 12 周时各组兔主动脉损伤评分 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Table 2. Rabbit aorta injury score at the 12 th weekend in different groups

分 组	损伤评分
对照组	0
高脂模型组	$7.6 \pm 1.9^a$
葡萄籽原花青素组	$5.6 \pm 1.5^{ab}$

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与高脂模型组比较。

## 2.4 病理学观察结果

正常对照组血管内膜薄且结构完整; 高脂模型组主动脉内膜增厚, 内皮不完整, 内膜下可见大量泡沫细胞浸润和脂质沉积, 表层可见明显纤维组织增生; GSPE 组主动脉内膜下有少量泡沫细胞浸润和脂质沉积(图 2, Figure 2)。

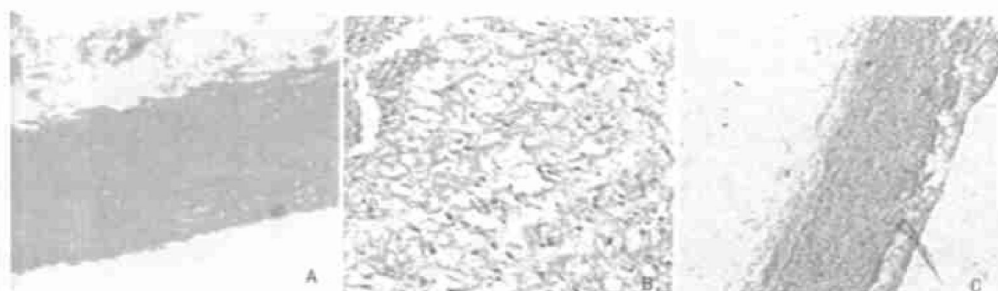


图 2. 实验 12 周兔主动脉形态(HE × 100) A 为正常对照组; B 为高脂模型组; C 为葡萄籽原花青素组。

Figure 2. The morphology of aorter in rabbit for 12 weeks

## 3 讨论

健康人 CRP 阴性, 而在感染、组织损伤或炎症时, CRP 可在数小时内急剧升高, 数天内达高峰, 病情改善后又下降, 是一种传统的炎症标志物, 其迅速合成及迅速降解的特性, 使之较血沉更能准确反应出病情改善或恶化情况, 成为反映病情及疗效的敏感指标。

最近研究表明 CRP 是 As 发生的独立危险因素, 并与 As 病变程度呈正相关。CRP 可通过以下途径促进 As 形成: CRP 活化内皮细胞表达细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1、选择素及趋化因子、单核细胞趋化蛋白 1<sup>[4,5]</sup>。④CRP 促使白细胞介素 6、内皮缩血管肽 1 的分泌, 下调人内皮细胞一氧化氮合酶的表达与生物利用率<sup>[4,68]</sup>。⑤CRP 活化巨噬细胞表达细胞活素与组织因子, 提高摄取 LDL<sup>[9]</sup>。

CRP 放大一些介质的促炎效果, 包括内毒素在内<sup>[10]</sup>。Saito 等<sup>[11]</sup>用酶联免疫吸附法测定了 30~79 岁 908 例血浆高敏 CRP(high sensitivity CRP, hsCRP)

水平, 评估其与传统心血管危险因素如年龄、血压、吸烟和血脂的关系。566 例健康人血浆 hsCRP 水平是  $0.54 \pm 0.02$  mg/L, 高血压( $0.74 \pm 0.06$  mg/L,  $P=0.002$ )、糖尿病( $0.77 \pm 0.09$  mg/L,  $P=0.016$ )及冠状动脉疾病( $0.99 \pm 0.16$  mg/L,  $P=0.008$ )患者均比健康人血浆 hsCRP 水平显著升高。在一元回归分析中, 566 例健康人血浆 hsCRP 与男性、吸烟、体质指数、收缩压、白细胞计数、血红蛋白、空腹血糖、 $\gamma$ -GTP、尿酸及甘油三酯呈正相关, 而与血清白蛋白和高密度脂蛋白胆固醇呈负相关。在多元回归分析中, 白细胞计数、体质指数、年龄和吸烟与血浆 hsCRP 独立相关。上述结果表明循环 hsCRP 的变化, 甚至在正常范围时, 参与了心血管危险因素相互作用, 例如年龄、吸烟、肥胖、高血压和异常脂血症, 促进 As 且激发心血管疾病, 例如冠状动脉疾病。

美国国立心肺血液研究所 Framingham 心脏研究领导者 Wang 等<sup>[12]</sup>观察了 CRP 与冠状动脉钙化之间的关系。Framingham 心脏研究共纳入 321 人, 平均年龄 60 岁。所有参试者均检测血浆 CRP 水

平,并采用电子束计算机断层(EBCT)扫描检测冠状动脉钙化情况。研究依据参试者的CRP水平将其分为5组,分别为CRP 0~0.04 mg/dL、0.1~0.8 mg/dL、0.9~2.3 mg/dL、2.4~6.5 mg/dL及6.7~48.2 mg/dL。所有参试者的平均冠状动脉钙化积分随CRP水平的增加而增加。即使在校正了年龄、传统的心血管危险因素及Framingham危险积分后,仍发现CRP水平越高,患者冠状动脉钙化的程度越高。

本研究发现,高胆固醇饲料使CRP水平持续升高,而GSPE虽不能使其恢复正常,但可阻止其进一步升高,表现出体内抗炎作用。由于GSPE的干预,高胆固醇饮食兔血清中的CRP水平改变了其原有的变化趋势,呈现低水平状态。因此,GSPE对CRP和抗As二者的作用有一定相关性,为进一步揭示As发病机制和GSPE的抗As机制提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 马亚兵,高海青,由倍安,冯孟林,靖百谦. 葡萄籽原花青素抗LDL氧化修饰作用的研究. 中华医药杂志, 2003, 3(11): 961-963
- [2] 马亚兵,高海青,由倍安,伊永亮,毕铁,刘相菊,等. 葡萄籽原花青素对兔动脉粥样硬化形成的实验研究. 山东大学学报(医学版), 2003, 41(6): 646-650

- [3] 叶平,王节,尚延忠,李云莲. C反应蛋白与动脉粥样硬化形成有关. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(2): 146-148
- [4] 陈学军,李建军. C反应蛋白与动脉粥样硬化. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(4): 355-357
- [5] Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein 1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, 2001, 103(21): 2531-534
- [6] Verma S, Li SH, Badierala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*, 2002, 105(16): 1890-896
- [7] Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badierala MV, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*, 2002, 106(8): 913-919
- [8] Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 2002, 106(12): 1439-441
- [9] Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*, 2001, 103(9): 1194-197
- [10] Yeh ET, Anderson HV, Pasceri V, Willerson JT. C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications. *Circulation*, 2001, 104(9): 974-975
- [11] Saito M, Ishimitsu T, Minami J, Ono H, Ohnri M, Matsuoka H. Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 2003, 167(1): 73-79
- [12] Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Kupka MJ, Manning WJ, et al. C-reactive protein is associated with subclinical epicardial coronary calcification in men and women: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2002, 106(10): 1189-191

(此文编辑 文玉珊)

#### •读者•作者•编者•

## 我刊对学术研究论文英文摘要的写作要求

国家标准GB7713-87规定:“为了国际交流,科学技术报告、学位论文和学术论文应附有外文(多用英文)摘要。”遵照这一规定,我刊从创刊号起,就十分注重英文摘要。1997年第5卷第1期起将概括式英文摘要改为四项结构式英文摘要后,给作者带来了写作上的方便,作者们认真撰写出了一些质量较高的英文摘要。然而,我刊的英文摘要距参与国际交流的目的还有一定差距,主要体现在以下几个方面:第一、英文摘要的要素虽全,但繁简失当;部分摘要方法写得详细,而结果简单;第二、有的英文摘要整篇只有五六个句子,二三十个单词,信息量有限;第三、部分英文摘要出现文法错误;如此等等。

英文摘要存在上述问题,说明质量有待提高。而提高质量需要编辑和作者共同努力,其中作者是关键。遵照中国科协学会学术部下发的《关于进一步提高期刊学术论文英文摘要写作质量的通知》精神,结合我刊实际,现就英文摘要的写作提出以下几点要求,请广大作者参照执行。

一、英文摘要应用符合英文语法的文字语言、以提供文献内容梗概为目的、不加评论和补充解释、简明确切地论述文献重要内容的短文,写作时必须符合“拥有与论文等量的主要信息”的原则。我刊的英文摘要(ABSTRACT)应按照目的(Aim)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions)四项要素来写,重点是结果(Results)和结论(Conclusions)。应有10个以上意义完整、语句通顺的句子,即目的(Aim)有2个以上句子,方法(Methods)有2个以上句子,结果(Results)有6个以上句子,结论(Conclusions)有1~2个句子。

二、英文摘要不应有引言中出现的内容,目的(Aim)不得简单重复文题中已有的信息;结果(Results)的叙述应详细,除了不能使用插图和表格外,正文结果中的所有信息都应得到表述,尤其是结果数据。在有些情况下,可包括研究工作的主要对象和范围,以及具有情报价值的其它信息。句型力求简单,少用从句;多用第三人称和被动语态,少用我(I)或我们(We)。描述结果时少用或不用显示(to display),多用被发现(be discovered)。应注意不用非公知公用的符号和术语。不用引文。对于缩写词、略语和代号,除了相邻专业的读者也能清楚理解(如ATP、RNA、DNA等)外,首次出现时必须写出全文。还应采用国际标准计量单位,正确使用语言文字和标点符号。要注意多义词在科技英语与文学中的用法差别。

以上是我刊对研究论文的英文摘要的写作要求,供广大作者参考。由于我刊对汉英两种文字的摘要采取了不同的格式,因此,我刊不要求汉英文摘要一致。