

海洋贝类综合提取物对实验性动脉粥样硬化的治疗作用

刘占涛¹, 刘 赛¹, 王守兰², 张 健¹, 仲伟珍¹

(1. 青岛大学医学院药理学教研室, 山东省青岛市 266021;

2. 青岛大学医学院护理系, 山东省青岛市 266012)

[关键词] 药理学; 海洋贝类提取物对动脉粥样硬化的治疗作用; 酶法; 海洋贝类提取物; 动脉粥样硬化; 高脂血症; 鹌鹑

[摘要] 目的 研究海洋贝类综合提取物对实验性动脉粥样硬化的治疗作用。方法 先建立高脂食饵性鹌鹑动脉粥样硬化模型, 然后经口服连续给予 5、10 及 20 g/kg 海洋贝类综合提取物, 于用药第 2、4 周末测定血清及主动脉和心肌中脂质含量, 并对主动脉、冠状动脉和肝脏进行肉眼及光镜组织学检查。结果 用药 2 周后 5、10 及 20 g/kg 海洋贝类综合提取物均可显著降低血清甘油三酯水平 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 20 g/kg 海洋贝类综合提取物组血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平明显降低, 高密度脂蛋白胆固醇水平明显升高 ($P < 0.05$); 用药 4 周后, 5、10 及 20 g/kg 海洋贝类综合提取物组血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平明显降低 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$), 高密度脂蛋白胆固醇水平明显升高 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$); 主动脉壁及心肌组织中总胆固醇、甘油三酯含量也明显降低 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$)。病理检测结果发现鹌鹑冠状动脉、主动脉内膜粥样硬化斑块的病变程度较模型组明显减轻。结论 海洋贝类综合提取物治疗用药具有降低高血脂, 促进动脉粥样硬化消退作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Comprehensive Extract from Maritime Shellfish Experimental Atherosclerosis in Quails

LIU Zhan-Tao¹, LIU Sai¹, WANG Shou-Lan², ZHANG Jian¹, and ZHONG Wei-Zhen¹

(1. Department of Pharmacology, the Medicine College of Qingdao University, Qingdao 266021; 2. Faculty of Nursing, the Medicine College of Qingdao University, Qingdao 266012, China)

[KEY WORDS] Extract from Maritime Shellfish; Atherosclerosis; Hyperlipidemia; Quail; Total Cholesterol; Triglyceride

[ABSTRACT] **Aim** To study the therapeutic action of extract of maritime shellfish (EMS) on experimental atherosclerosis in quails. **Methods** The experimental atherosclerosis model in quails was induced exogenously by hyperlipidic feed for 8 weeks. Then EMS was orally given. The influence of EMS on lipid level in serum was detected with enzyme at the second and fourth weekend after administration. The effects of EMS on the atherogenic plaque in artery and fatty liver were observed by histopathological methods. **Results** At the second weekend after administration EMS 5, 10 and 20 g/kg significantly reduced the level of triglyceride (TG) in serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). EMS 20 g/kg evidently lowered the serum total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC). The high density lipoprotein cholesterol (HDL) concentration was raised ($P < 0.05$). In therapeutic oral administration for 4 weeks EMS 5, 10 and 20 g/(kg·d) markedly reduced the volume of TG, TC, LDLC in serum. At the same time, TC and TG in the myocardial and aortic wall were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The serum HDLC was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, the degree of atherosclerotic lesion in aorta and coronary artery and fatty degeneration of liver in EMS group was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** EMS shows action of the regression for atherosclerotic lesion and the regulation of hyperlipidemia in therapeutic administration.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是缺血性心脑血管病的重要病理基础, 防止 As 的发生及促使 As 的消退是降低心脑血管病发病率及死亡率的根本措施。海洋贝类综合提取物 (extract from maritime shellfish, EMS) 是海洋软体动物扇贝、牡蛎、贻贝有效成

份的综合提取物, 经实验研究发现该提取物预防用药对高血脂及实验性 As 的形成有一定阻抑作用^[1,2]。为了研究 EMS 对已形成的 As 病灶是否具有促消退作用, 本文采用先建立鹌鹑 As 病理模型, 然后以给药的方法, 观察 EMS 对 As 的治疗作用。

[收稿日期] 2004-06-04 [修回日期] 2004-11-09

[基金项目] 山东省科委课题 (981164805) 资助

[作者简介] 刘占涛, 讲师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 qdzliu@yahoo.com.cn。刘赛, 教授, 研究方向为心血管药理及海洋药物。王守兰, 讲师。

1 材料与方法

1.1 材料

朝鲜鹌鹑, 体重 90~110 g, 雄性, 由青岛大学医

学院动物管理科提供。海洋贝类提取物鲜贝含量为 2 kg/L 的混悬液,由青大医学院药理学教研室 EMS 课题组提供;烟酸肌醇脂 (inositol hexaniconate, IH) 由济南制药厂生产;胆固醇为进口分装,由上海化学试剂公司提供;血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 为澳斯邦生物工程有限公司生产。

1.2 动脉粥样硬化模型的建立及给药

取雄性鹌鹑 120 只,随机分为 6 组:正常对照组、模型组、阳性对照组 (IH 0.15 mg/kg) 和 5、10 及 20 g/kg EMS 组。除正常对照组喂基础饲料外,其余五组均参照文献[3]方法建立高脂饮食性 As 模型。自实验第 9 周起,改喂普通饲料,各用药组同时给药,将药物与饲料混匀后服用,每日一次,连续用药 4 周。于用药后第 2、4 周末,每组取 12 只动物测定其血清脂质。于实验结束时对存活的鹌鹑进行病理学检测。

1.3 血清脂质含量测定

各组于用药后第 2、4 周末,禁食 12 h 后经颈静脉取血 2 mL,分离血清,采用酶法测定血清 TC、TG、HDLC、LDLC 水平。

1.4 主动脉及心肌中脂质含量测定

于用药后第 4 周末将动物处死,取出主动脉及心脏,经匀浆、离心、脂质提取液抽提,采用酶法测定主动脉和心肌中 TC、TG 含量。

1.5 病理形态学检查

于实验结束时,将动物全部处死,取出胸、腹主动脉,肉眼观察主动脉内膜粥样斑块的分布特点;取出肝脏,肉眼观察肝脏表面颜色,称重计算肝脏系数;取出心脏,将冠状沟以下部分切下,制作标本。将主动脉、心肌、肝脏标本经常规固定、包埋、切片、HE 及苏丹 III 染色,光镜下进行病理形态学观察,比较各组主动脉、冠状动脉的 As 病变的程度及肝脏脂肪变程度,按文献[4]中关于病变定量分级的标准和方法进行分级。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组均数间比较采用单因素方差分析,病理学检测数据采用等级序值法检验。

2 结果

2.1 血清脂质含量

停用高脂饲料 2 周后模型组血清 TC、TG、LDLC 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),呈现典型高

脂血症;EMS 各剂量组及阳性对照组血清 TG 含量低于模型组 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$),TC 及 LDLC 也呈下降趋势,其中 20 g/kg EMS 组与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。20 g/kg EMS 组及阳性对照组 HDLC 则高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1 (Table 1)。

停用高脂饲料 4 周后,模型组血清 TC、TG、LDLC 已开始下降,但仍高于正常对照组 ($P < 0.05$)。用药第 4 周末 5、10 及 20 g/kg EMS 组血清 TG、TC 及 LDLC 均低于模型组 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$),尤其 TG 降低明显 ($P < 0.05$),而 HDLC 则高于模型组 ($P < 0.05$),阳性对照组血脂与 EMS 各组接近 ($P > 0.05$),见表 2 (Table 2)。

表 1. 药物对血清脂质的影响

Table 1. The effects of EMS and IH on serum TC, TG, LDLC and HDLC ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	TC	TG	LDLC	HDLC
正常对照组	5.68 ± 0.82	0.70 ± 0.14	2.42 ± 0.58	2.23 ± 0.27
模型组	22.75 ± 5.37 ^c	4.65 ± 1.72 ^c	15.14 ± 2.20 ^c	2.22 ± 0.34
阳性对照组	15.99 ± 3.43 ^a	1.92 ± 0.54 ^b	9.45 ± 3.13 ^b	2.89 ± 0.56 ^a
20 g/kg EMS	14.88 ± 4.39 ^a	1.92 ± 0.36 ^b	10.77 ± 3.05 ^a	2.70 ± 0.35 ^a
10 g/kg EMS	16.93 ± 5.54	1.91 ± 0.48 ^b	12.37 ± 3.27	2.63 ± 0.65
5 g/kg EMS	17.01 ± 5.00	2.43 ± 0.57 ^a	9.48 ± 2.63 ^a	2.28 ± 0.43

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较; c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 药物对血清脂质含量的影响

Table 2. The effects of EMS and IH on serum TC, TG, LDLC and HDLC ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	TC	TG	LDLC	HDLC
正常对照组	5.41 ± 0.71	0.95 ± 0.28	2.69 ± 0.66	1.65 ± 0.18
模型组	9.86 ± 3.51 ^c	3.35 ± 0.76 ^c	5.20 ± 2.13 ^c	1.51 ± 0.41
阳性对照组	7.28 ± 2.08	1.86 ± 0.35 ^b	3.84 ± 1.83	2.04 ± 0.37 ^a
20 g/kg EMS	6.06 ± 1.47 ^a	1.87 ± 0.57 ^b	2.99 ± 0.90 ^a	2.32 ± 0.51 ^b
10 g/kg EMS	6.77 ± 1.19	1.99 ± 0.59 ^b	3.43 ± 0.93	2.16 ± 0.42 ^a
5 g/kg EMS	6.59 ± 1.39	2.11 ± 0.58 ^b	3.56 ± 0.79	2.04 ± 0.42 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较; c: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 主动脉壁及心肌中脂质含量

停止喂饲高脂饲料 4 周后,模型组心肌及主动脉壁 TC 及 TG 含量与正常对照组相比仍然较高,表明仍有较大量脂质沉积于主动脉及冠状动脉内膜。用药 4 周后 EMS 各剂量组及阳性对照组主动脉壁 TC、TG 含量及心肌 TG 含量均明显降低,与模型组差异明显 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$),EMS 各剂量组心肌中 TC 含量低于模型组,但无统计学意义 (表 3, Table 3)。

表 3. 药物对主动脉和心肌中脂质含量的影响

Table 3. The effects of EMS and IH on TC and TG of cardiac muscle and aortas ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分组	心肌		主动脉	
	TC	TG	TC	TG
正常对照组	8.62 ± 2.82	4.54 ± 1.75	4.22 ± 1.82	2.86 ± 1.02
模型组	14.08 ± 3.90	16.29 ± 4.66 ^c	12.74 ± 3.17 ^c	9.97 ± 3.36 ^c
阳性对照组	13.44 ± 2.95	8.65 ± 2.27 ^b	8.37 ± 2.16 ^b	4.60 ± 1.59 ^b
20 g/kg EMS	10.26 ± 3.14	7.58 ± 1.91 ^b	6.00 ± 2.20 ^b	4.82 ± 2.20 ^b
10 g/kg EMS	12.16 ± 2.65	9.15 ± 3.42 ^b	7.60 ± 2.27 ^b	5.12 ± 2.65 ^a
5 g/kg EMS	12.05 ± 3.56	10.51 ± 1.48 ^a	8.26 ± 2.53 ^a	5.88 ± 2.27 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较; c: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 肝脏脂肪变

模型组肝脏无论肉眼还是显微镜下观察均可看到明显的脂肪变,触之有油腻感,镜下可见肝细胞内含有大量脂肪滴,肝脏系数高于正常对照组($P < 0.01$),EMS 各剂量组脂肪变明显较轻,肝脏脂肪变的分级标准明显低于模型组,肝脏系数也小于模型组($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$),见表 4(Table 4)。

表 4. 药物对肝脏脂肪变分级及肝脏系数的影响

Table 4. Effects of EMS and IH on liver fatty degeneration grade and liver coefficient

分 组	肝脏脂肪变分级					肝脏系数
	0	1	2	3	total	
正常对照组	11	4	0	0	4	1.99 ± 0.29
模型组	5	8	2	0	12 ^c	2.99 ± 0.58 ^c
阳性对照组	7	8	3	0	14	2.27 ± 0.58 ^a
20 g/kg EMS	14	1	0	0	1 ^b	2.08 ± 0.32 ^b
10 g/kg EMS	13	5	0	0	5	2.33 ± 0.46 ^a
5 g/kg EMS	11	4	0	0	4 ^a	2.28 ± 0.33 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较; c: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 主动脉粥样硬化病变

模型组多数主动脉有明显的 As 病变,在主动脉内膜表面可见形状大小不等的灰黄色脂质斑块。病变严重的主动脉内膜面的大部分为融合的脂质斑块,苏丹Ⅲ染色后显示鲜红色 As 病灶,重者动脉内膜的表面几乎全为融合的斑块所覆盖。镜下可见内膜增厚,内膜下层间隙增大,脂质斑块处含大量泡沫细胞。多数 As 病变在 2 级以上,EMS 各剂量组及阳性对照组主动脉壁也有粥样病灶,但病变程度较轻,多在 1~2 级以下(表 5, Table 5)。镜下可见多数动脉内膜完整,部分有轻度脂质浸润,内含散在泡沫细胞(图 1, Figure 1)。

2.5 冠状动脉病变

除正常对照组外,各组均有程度不等的血管病变,以模型组最为明显,多数内膜增厚、管腔狭窄、有斑块凸出。与其比较 EMS 各剂量组多数冠状动脉 As 病变程度较轻(表 5 和图 2, Table 5 and Figure 2)。

表 5. 药物对主动脉、冠状动脉粥样病变的影响

Table 5. Effects of EMS and IH on atherosclerotic plaque of aortic and coronary artery in quail

分 组	主动脉分级						冠状动脉分级						
	0	1	2	3	4	total	0	0.5	1	2	3	4	total
正常对照组	4	12	0	0	0	12	8	7	1	0	0	0	4.5
模型组	0	4	2	2	8	46 ^c	4	7	5	0	0	0	8.5 ^c
阳性对照组	0	2	10	4	0	34	5	10	1	0	0	0	6
20 g/kg EMS	7	2	4	3	0	19 ^b	11	5	0	0	0	0	2.5 ^b
10 g/kg EMS	2	5	6	3	0	26 ^b	9	7	0	0	0	0	3.5 ^a
5 g/kg EMS	3	4	5	4	0	26 ^b	5	8	3	0	0	0	7

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型组比较; c: $P < 0.05$, 与对照组比较。



图 1. 主动脉内膜光学显微镜图像(HE × 200) A 为正常组, B 为模型组, C 为阳性组, D 为 20 g/kg 海洋贝类提取物组, E 为 10 g/kg 海洋贝类提取物组, F 为 5 g/kg 海洋贝类提取物组。

Figure 1. Microscope graph of aortic intima

3 讨论

先建立 As 模型,然后给予药物,常用以观察药物对 As 的促消退作用。在本实验中,经 EMS 连续

用药 4 周后,动物的 As 病变程度与模型组相比明显减轻,多在 1 级以下。表明 EMS 在一定程度上可促使已形成的 As 病变有所消退^[5],提示 EMS 治疗用药与预防用药同样有一定抗 As 作用。

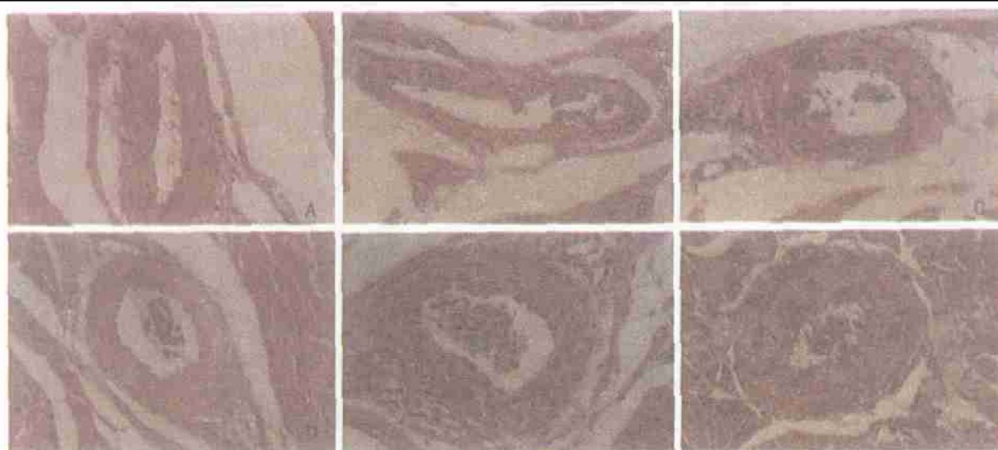


图 2. 冠状动脉内膜光学显微镜图像 (HE × 400) A 为正常组, B 为模型组, C 为阳性组, D 为 20 g/kg 海洋贝类提取物组, E 为 10 g/kg 海洋贝类提取物组, F 为 5 g/kg 海洋贝类提取物组。

Figure 2. Microscope graph of coronary artery intima

根据 As 发生机制的脂源性学说, 脂代谢紊乱是形成 As 的多种原因的重要危险因素, 已知血清 TC、TG、LDLC 水平持续升高与 As 发病率呈正相关。现已确认, 高胆固醇血症可引起血管内皮细胞损伤, 氧自由基生成增多, 促使 LDLC 氧化修饰, 并能刺激内皮细胞产生大量的生长因子, 促使血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖, 还能促进单核细胞粘附于内皮细胞以及内膜下泡沫细胞的形成和脂肪条的发展^[6]。过高的 TG 也可促使氧自由基的产生, 加速 LDLC 的氧化及对内皮的损伤, 增强粘附因子的表达及泡沫细胞的形成。富含 TG 的 VLDLC 可被蛋白酯酶转化 LDLC, 后者被氧化修饰为氧化 LDLC (oxLDLC), oxLDLC 为损伤因子, 能直接损伤动脉内膜, 并趋化单核细胞进入内膜。oxLDLC 被巨噬细胞吞噬后导致大量脂质蓄积, 形成泡沫细胞, 逐渐汇集成脂质条纹, 最终形成 As 斑块^[7]。而 HDLC 则是抗 As 因素, 可促使细胞内的 TC 的清除, 与 LDLC 受体竞争, 从而抑制内皮细胞和平滑肌细胞对 LDLC 的摄取, 抑制 LDLC 的氧化修饰, 减少泡沫细胞的形成, 防止 As 的发生发展, 因此, 降低 TC、TG、LDLC, 升高 HDLC 是药物防治 As 的重要途径。

在本实验中, 模型组鹌鹑经喂饲高脂饲料 8 周后血清 TC、TG、LDLC 升高, HDLC 降低, 停用高脂饲料 2 周和 4 周后, 各项血脂水平与对照组比较仍有明显异常, 显示典型的高脂血症。病理形态学观察发现, 主动脉及冠状动脉内均有程度不等的 As 斑块形成, 进一步说明高脂血症是 As 发生发展的重要因素。三种剂量的 EMS 治疗用药, 可使升高的血清 TC、TG、LDLC 水平降低, 减少 oxLDLC 的形成, 尤以 TG 降低最为明显, 同时升高血清 HDLC。表明 EMS

降低血脂、调节脂质代谢紊乱的作用是多方面的, 既可降低多种致 As 因素的损害, 又可增强抗 As 因子的作用, 因此, 这种综合作用在一定程度上抑制了 As 的发展或减轻 As 病变, 有利于促使 As 病变的消退, 这可能是其抗 As 作用的主要机制之一。

海洋贝类综合提取物 (EMS) 的抗 As、降血脂作用与其制剂中含有的多烯脂肪酸、牛磺酸、磷脂、多糖及非胆固醇甾醇等成分有关。已知多烯脂肪酸具有降血脂、抑制血小板聚集和释放功能、减少血小板源生长因子和血栓素 A₂ 的合成、抑制血管平滑肌细胞增殖的作用。牛磺酸、磷脂、多糖及非胆固醇甾醇等也有降血脂、抗 As 的活性^[8,9]。这些成份的综合作用有利于阻止 As 病变发展并促使其消退。

[参考文献]

- [1] 刘赛, 刘占涛, 仲卫珍, 张健, 王春波. 海洋贝类提取物对实验性高脂血症预防作用的研究. 中国海洋药物, 2002, 21 (2): 31-33
- [2] 刘赛, 仲卫珍, 张健, 刘占涛. 牡蛎提取物对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用及机制. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (2): 97-100
- [3] 刘兆平, 吴保杰. 动脉粥样硬化模型的复制. 见: 张均田 (主编). 现代药理实验方法. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998; 1 259
- [4] 张岫美, 魏欣冰. 动脉粥样硬化模型的病理形态学观察. 见: 张均田 (主编). 现代药理实验方法. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998; 1 263
- [5] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999, 340 (2): 115
- [6] Masuda J, Ross R. Atherogenesis during low-level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. Arteriosclerosis, 1990, 10 (2): 178-187
- [7] Hitunen TP. Expression of LDL receptor in rabbit atherosclerotic lesion. Circulation, 1998, 97: 1 079
- [8] 谭桂利, 李瑞声. 牡蛎的化学成分和药用价值. 中国海洋药物, 1993, 12 (4): 26-29
- [9] 石彦荣, 牛大地, 王述, 高霖, 齐永芬, 庞永正, 等. 同型半胱氨酸抑制培养的大鼠血管平滑肌细胞牛磺酸转运. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (3): 203-205

(此文编辑 文玉珊)