

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0721-04

• 实验研究 •

西红花酸对高血脂家兔血管舒张功能的影响及其机制

唐富天, 钱之玉, 郑书国

(中国药科大学药理学教研室, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 药理学; 西红花酸; 高血脂; 血管舒张功能; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[摘要] 目的 观察西红花酸对高血脂家兔血管舒张功能的影响并探讨其作用机制。方法 用高脂饲料复制家兔高血脂模型, 分别于第 0、2、4、6、8 周测定血清一氧化氮含量。8 周末测定血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平。分离胸主动脉, 测定其对乙酰胆碱和硝普钠舒血管作用的反应及血管壁一氧化氮合酶活性和 mRNA 表达水平, 观察高、低剂量(30、15 mg/kg) 西红花酸对上述指标的影响。结果 高血脂家兔胸主动脉对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张作用明显减弱, 最大舒张度为正常对照组的 54%; 高、低剂量西红花酸能显著改善其血管内功能, 最大舒张度分别为正常对照组的 80% 和 68%; 各组家兔血管对硝普钠诱导的非内皮依赖性舒张功能无明显变化; 高剂量西红花酸能降低血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇, 两者分别降低了 21.6% 和 20.2% ($P < 0.05$), 而低剂量西红花酸对此没有影响。和高血脂组相比, 高、低剂量西红花酸能时间依赖地增加血清一氧化氮含量, 第 8 周时一氧化氮分别增加了 72.4% 和 36.1%。西红花酸能够显著提高血管壁内皮型一氧化氮合酶活性和 mRNA 表达水平, 高、低剂量组内皮型一氧化氮合酶活性分别增加了 76.1% 和 47.8%, 内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达水平分别提高了 54.2% 和 29.8%; 而西红花酸对诱导型一氧化氮合酶活性无明显影响。结论 西红花酸能显著增加高血脂家兔血清一氧化氮含量, 改善血管舒张功能, 其机制与提高血管壁内皮型一氧化氮合酶基因表达水平有关。

[中图分类号] R97

[文献标识码] A

Effect of Crocetin on Relaxation Function of Thoracic Aorta Isolated from Hyperlipidemic Rabbit and its Mechanism

TANG Fu-Tian, QIAN Zhi-Yu, and ZHENG Shu-Guo

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Crocetin; Hyperlipidemia; Vascular Relaxation Function; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** The effect of crocetin on relaxation function of thoracic aorta isolated from hyperlipidemic rabbits was examined and the potential mechanism was explored. **Methods** Hyperlipidemic rabbit model was established by feeding high lipid diet (HLD) to rabbit. Blood was collected at week 0, 2, 4, 6, 8 respectively and serum was used for measurement of nitric oxide (NO) content. At the end of 8th week, serum total cholesterol (TC) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) contents were assayed and thoracic aorta isolated from the rabbit was mounted in an organ bath to measure the endothelium dependent and -independent relaxations evoked by acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) respectively. NO synthase (NOS) activities and mRNA expression of endothelial NO synthase (eNOS) of aorta was determined. **Results** Endothelium dependent relaxation of thoracic aorta evoked by ACh was found significantly impaired in merely HLD-treated rabbits with the maximal relaxation of 54% of the control. This impairment was significantly improved by co-treatment with CCT (15, 30 mg/kg), with a maximal relaxation of 68% and 80% of the control respectively. Endothelium independent relaxation induced by SNP maintained comparable in all groups. Compared with HLD group, serum levels of TC and LDLC were decreased in CCT (30 mg/kg) group by 21.6% and 20.2% respectively rather than in CCT (15 mg/kg) group. CCT (15, 30 mg/kg) could increase serum NO content by 36.1% and 72.4% respectively at the end of 8th week. Endthelial NOS activity was significantly increased by CCT (30, 15 mg/kg) by 76.1% and 47.8% respectively and mRNA expression of eNOS increased by 54.2% and 29.8% respectively. Inducible NOS (iNOS) activity remained unchangeable in all groups. **Conclusion** CCT could significantly increase the serum NO content and restore endothelium dependent relaxation in thoracic aorta isolated from hyperlipidemic rabbit. The mechanism under which might be related to increased mRNA expression of vessel eNOS

血管舒张功能障碍是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)

的重要病理特征, 其主要机制为血管内皮损伤及一氧化氮(nitric oxide, NO)生成减少^[1]。NO 不仅能维持血管舒张功能, 而且抑制血管平滑肌细胞迁移、增殖, 抑制单核细胞与内皮粘附及炎症因子的合成, 从而发挥抗 As 作用^[2]。高脂血症或 As 动物血管对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张功能明显

[收稿日期] 2005-02-26

[修回日期] 2005-10-29

[作者简介] 唐富天, 博士, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制和新药开发, 现为中山大学药学院博士后。通讯作者钱之玉, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病机制和新药开发, 联系电话 025-83271322, E-mail 为 tangft@163.com。郑书国, 博士。

减弱,而对硝普钠等 NO 供体诱导的非内皮依赖性舒张功能无明显影响^[3],说明 As 血管舒张功能减退主要原因是内皮细胞 NO 生成减少,其中由高血脂所致的内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)活性下降和表达减少是血管舒张功能障碍的主要机制^[4]。西红花酸(croctin, CCT)为类胡萝卜素类化合物,具有抗氧化、抗 As 等多种药理作用^[5-7],但对其能否改善高血脂家兔血管舒张功能,至今未见报道。为此,本研究探讨西红花酸对高血脂家兔血管舒张功能的影响及其可能的机制,从而为西红花酸的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂和仪器

西红花酸(CCT)由本实验室自制,HPLC法测定纯度>90%。胆固醇购自南京新百药业有限公司。苯氧肾上腺素(PE)和氯化乙酰胆碱(Ach)购自上海三爱思试剂有限公司。硝普钠购自北京双鹤现代医药技术有限公司。NO、NOS、TC、LDLC试剂盒购自南京建成生物工程公司。Tripul购自Roche公司。M-MLV逆转录酶、RNA酶抑制剂和Tag DNA聚合酶等均购自上海生物工程公司。多功能张力换能器(Hugo Sachs)购自德国,张力记录仪(Linearcoder WR 3320)购自日本;紫外分光光度计系北京第二光学仪器厂生产。

1.2 家兔高血脂模型建立与血管舒张功能测定

雄性新西兰白兔(2.0~2.5 kg,购自金陵种兔场)随机分为4组:对照组、高脂饲料(HLD)组、CCT高、低剂量[CCT(H)和CCT(L)]组,每组6只。除对照组给予基础饲料外,其余3组均喂饲高脂饲料(1.2%的胆固醇、4%猪油和94.8%基础饲料),120 g/d。CCT(H)和CCT(L)组在饲料中分别加入相应浓度的CCT(30 mg/kg和15 mg/kg)。8周末静脉注射戊巴比妥钠后处死动物,分离胸主动脉,置于冰浴的Krebs液(mmol/L: NaCl 118.3; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; 葡萄糖 11.1; NaHCO₃ 24.9; EDTA 0.026; pH 7.4)中,小心去除血管外膜的连接组织后将其横切为3 mm长的血管条。将血管条垂直置于20 mL恒温水浴槽中,一端与小钩相连,另一端挂于张力换能器的小钩上。保持Krebs液温度为37℃并通入95% O₂和5% CO₂混合气。待血管条自然舒张至静息张力为2 g后再平衡45 min。实验中水浴槽加入10 μmol/L 吲哚美辛以抑制前列环素的生成。

加入1 μmol/L PE,待血管收缩达到平台后,加

入浓度累计增加的Ach或硝普钠舒张血管。血管舒张功能用舒张度表示,即相对于PE收缩血管达最大值时的百分比(%)。

1.3 总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量测定

于8周末自耳缘静脉取血,分离血清用试剂盒测定总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)。

1.4 一氧化氮含量和一氧化氮合酶活性测定

分别于实验第0、2、4、6、8周耳缘静脉取血,分离血清,硝酸还原酶法测定NO含量;实验结束时取腹主动脉加PBS制成10%匀浆,10 000g离心10 min,取上清测eNOS和iNOS活性,并取同体积上清测蛋白含量,NOS活性以kU/g蛋白表示。

1.5 血管内皮型一氧化氮合酶基因表达测定

1.5.1 总RNA抽提 取胸主动脉约80 mg,加1 mL Tripule RNA试剂匀浆抽提总mRNA,测量A260和A280值。所有样品A260/A280>1.8,以1A260=40 μg计算RNA的产率,取RNA1 μg进行RT-PCR。

1.5.2 引物合成 引物由上海Sangon合成,HAP纯化,纯度大于99%。eNOS同义链为5'-GAG CCA CAG AGC AGA CGG AG-3'; eNOS反义链为5'-CAC TCT CTC GGA GGT GGA TG-3',扩增产物长度为455 bp。GAPDH同义链为5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG CG-3',GAPDH反义链为5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3',扩增产物长度为584 bp。

1.5.3 逆转录聚合酶链反应 取1 μg总RNA加入5 μg dT18,70℃加热10 min后,立即置0℃水浴中,5 min后在25 μL体系中进行逆转录反应。PCR反应条件:94℃预变性30 s后,以94℃30 s→62℃30 s→72℃30 s,30个循环后再72℃延伸10 min。1.5琼脂糖100 V电泳1 h,溴化乙锭染色观察结果并通过Biorad数码凝胶图像处理系统对照片扫描定量。计算eNOS与内标GAPDH积分光密度的比值。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用t检验,多组间比较用One Way ANOVA分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西红花酸对血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量的影响

高脂饲料饲喂家兔能够明显增加血清TC和LDLC含量,与正常组相比分别增加了12倍和23倍;与HLD组相比,CCT(30 mg/kg)能够降低TC和LDLC(P<0.05),而CCT(15 mg/kg)对TC和LDLC

没有明显影响($P > 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 西红花酸对家兔血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1. Effect of CCT on serum TC and LDLC of rabbit

分 组	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
对照组	1.45 ± 0.20	0.63 ± 0.12
HLD	17.8 ± 2.6 ^a	14.7 ± 2.8 ^a
CCT(L)	16.6 ± 2.6 ^a	13.6 ± 2.5 ^a
CCT(H)	14.0 ± 2.3 ^{ab}	11.7 ± 2.1 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 HLD 组相比。

2.2 西红花酸对乙酰胆碱诱导的血管内皮依赖性舒张功能的影响

乙酰胆碱(Ach) ($10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L) 呈浓度依赖地舒张各组血管。但 HLD 组血管对 Ach 的舒血管作用明显减弱, 其最大舒张度为对照组的 54%。CCT(15 和 30 mg/kg) 能够显著改善血管舒张功能, 其最大舒张度分别达到对照组的 68% 和 80% (图 1, Figure 1)。

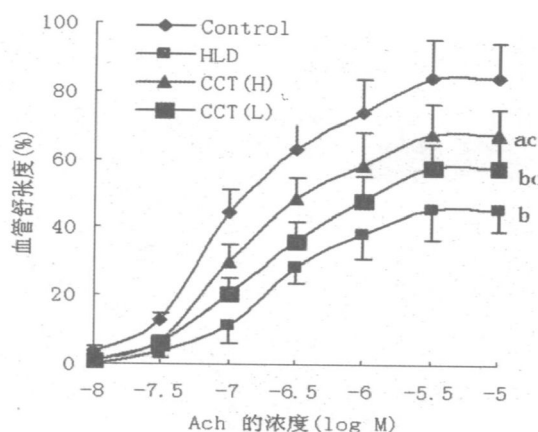


图 1. 西红花酸对 Ach 诱导的血管内皮依赖性舒张功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$). a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$, 与 HLD 组相比。

Figure 1. Effect of CCT on endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta evoked by Ach

2.3 西红花酸对硝普钠诱导的血管内皮非依赖性舒张功能的影响

硝普钠 ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L) 呈浓度依赖地舒张各组血管。高胆固醇或 CCT 对血管舒张作用没有明显影响(图 2, Figure 2)。

2.4 西红花酸对血清一氧化氮含量的影响

给予家兔高胆固醇饲料能够呈时间依赖性地减少血清中 NO 含量, 8 周末 NO 含量为正常对照组的 47%。CCT(15, 30mg/kg) 能够显著增加高胆固醇血

症家兔血清 NO 含量, 8 周末其含量分别达到正常对照组的 63% 和 80% (表 2, Table 2)。

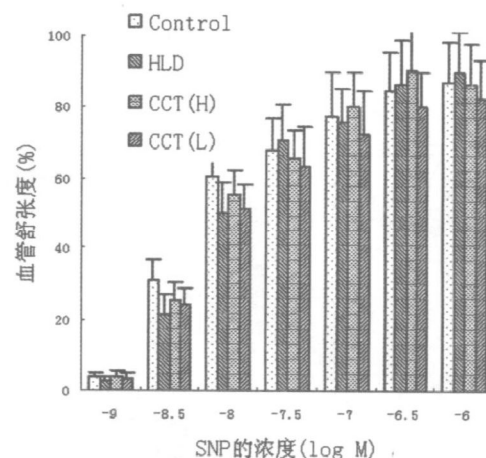


图 2. 西红花酸对硝普钠诱导的血管非内皮依赖性舒张功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Figure 2. Effect of CCT on endothelium-independent relaxation of thoracic aorta evoked by SNP

表 2. 西红花酸对血清一氧化氮含量的影响 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. Effect of CCT on serum NO content

分 组	0 w	2 w	4 w	6 w	8 w
对照组	90.4 ± 20.7	85.5 ± 16.9	88.7 ± 21.7	84.9 ± 21.0	87.5 ± 17.0
HLD	86.7 ± 28.0	77.4 ± 21.4	66.9 ± 14.6 ^a	51.4 ± 11.0 ^b	40.7 ± 10.3 ^b
CCT(L)	89.0 ± 17.4	83.9 ± 19.3	76.2 ± 16.6	67.6 ± 13.9 ^c	55.4 ± 10.5 ^{ac}
CCT(H)	86.0 ± 19.8	87.6 ± 17.0	82.9 ± 14.2 ^c	75.4 ± 15.4 ^c	70.2 ± 13.8 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 HLD 组相比。

2.5 西红花酸对血管一氧化氮合酶活性和内皮型一氧化氮合酶基因表达的影响

高血脂家兔血管 eNOS 活性明显降低 ($P < 0.01$)。CCT(15, 30 mg/kg) 能够显著提高 eNOS 活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。高胆固醇和 CCT 对 iNOS 活性无明显影响。高血脂家兔血管中 eNOS mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.01$)。CCT(15, 30 mg/kg) 能够显著提高 eNOS mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(表 3, Table 3; 图 3, Figure 3)。

3 讨论

血管内皮损伤是 As 形成和发展的始动环节, 内皮源性舒张因子(NO)生成减少是 As 血管舒张功能障碍的主要原因^[8]。高脂血症动物血管对 Ach 引起

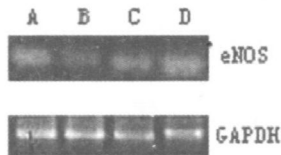


图 3. 西红花酸对血管内皮型一氧化氮合酶基因表达的影响

A 为对照组, B 为 HLD 组, C 和 D 分别为 CCT 15 mg/kg 和 30 mg/kg 组

Figure 3. Effect of CCT on eNOS mRNA expression of thoracic aorta in atherosclerotic rabbit

表 3. 西红花酸对血管一氧化氮合酶活性和内皮型一氧化氮合酶基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of CCT on NOS activities and eNOS mRNA expression of thoracic aorta in atherosclerotic rabbit

分 组	eNOS 活性 (kU/g 蛋白)	iNOS 活性 (kU/g 蛋白)	eNOS/GAPDH
对照组	2.04 ± 0.49	0.38 ± 0.11	0.83 ± 0.11
HLD	0.92 ± 0.25 ^b	0.35 ± 0.09	0.47 ± 0.08 ^b
CCT(L)	1.36 ± 0.39 ^{ac}	0.41 ± 0.06	0.61 ± 0.12 ^{ac}
CCT(H)	1.62 ± 0.41 ^d	0.42 ± 0.08	0.72 ± 0.14 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 HLD 组相比。

的内皮依赖性舒张反应显著减弱, 而对硝普钠引起的舒张反应无明显影响^[3], 也说明高脂血症动物血管舒张功能障碍主要是内皮细胞 NO 生成减少所致。NO 供体硝酸甘油能显著改善高脂饮食诱发的 As 血管舒张功能, 而长期给予 eNOS 抑制剂硝基精氨酸甲酯抑制内源性 NO 生成后, 可明显损害血管内皮依赖性舒张功能, 促进 As 发展, 进一步证明了 NO 在维持血管正常舒张功能中的重要性^[9]。

本研究表明, 用含 1.2% 胆固醇的高脂饲料饲养家兔 8 周后血清 TC 和 LDLC 分别升高了 12 倍和 23 倍, 表明家兔已形成明显的高胆固醇血症。病理结果发现家兔有了明显的 As 病变(另文发表)。高脂饲料还能够显著降低血清 NO 含量, 严重损伤血管内皮依赖性舒张功能, 其最大舒张度只有对照组的 54%; CCT(15 或 30 mg/kg) 能显著改善血管舒张功能, 其最大舒张度分别达到对照组的 68% 和 80%, 这一结果与 CCT 对血清 NO 含量的影响一致, 提示 CCT 可通过增加 NO 生成而改善 As 血管舒张功能。实验还发现尽管只有 30 mg/kg 的 CCT 明显降低血清 TC 和 LDLC, 但两个剂量的 CCT(15 或 30

mg/kg) 都能够明显改善血管舒张功能, 表明 CCT 改善血管舒张功能的作用与其降低血脂作用无关。一氧化氮合酶(NOS)有三种亚型, 存在于血管内皮细胞的主要为 eNOS, 由其催化产生的 NO 在维持血管舒张功能和抗 As 中起着重要的作用^[10]。本研究表明, 高胆固醇血症可引起血管壁 eNOS 活性和基因表达水平显著下降, CCT 可明显逆转这种作用。高胆固醇血症和 CCT 都对 iNOS 活性无明显影响, 提示血清 NO 含量的变化主要来源于 eNOS 活性和基因表达水平的改变, 这也是西红花酸提高 NO 含量、改善高脂血症家兔舒张功能的主要机制之一。

血管舒张功能障碍既可源于内皮细胞损伤, 也可由于血管平滑肌细胞 cGMP 信号传导通路发生障碍^[11]。CCT 只改善 Ach 诱导的舒张反应, 而对硝普钠诱导的舒张反应无明显影响, 表明 CCT 对血管平滑肌既无直接舒张作用, 也不影响血管平滑肌的 cGMP 通路, 其改善高脂血症家兔血管舒张功能的主要机制为提高血管 eNOS 基因表达水平, 增加 NO 生成。

[参考文献]

- Guerra RJ, Brotherton AF, Goodwin PJ, Clark CR, Armstrong ML, Harrison DG. Mechanisms of abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in atherosclerosis: implications for altered autocrine and paracrine functions of E-DRF. *Blood Vessel*. 1989, **26** (5): 300-314
- 牟 娇, 何作云, 王晓兵. 血红素氧合酶 1 ——一氧化碳和一氧化氮合酶 1 ——一氧化氮系统在动脉粥样硬化中的作用及其相关性研究. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 401-405
- 赵 刚, 周京敏, 李双杰, 卜丽萍, 章朝霞, 张新刚, 等. 普罗布考对高脂家兔胸主动脉内皮储备功能的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 333-335
- Mehta JL, Li DY, Chen HJ, Joseph J, Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **289** (4): 857-861
- Tseng TH, Chu CY, Huang JM, Shioh SJ, Wang CJ. Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Cancer Lett*. 1995, **97** (1): 61-67
- 龚国清, 刘同征, 李立文, 钱之玉. 西红花酸的体外抗氧化作用的研究. *中国药科大学学报*, 2001, **32** (4): 306-309
- Deng YX, Qian ZY, Tang FT. Effects of crocetin on experimental atherosclerosis in rats. *Chin Trad Her Drug*, 2004, **35** (7): 777-781
- Candipan RC, Wang BY, Buitrago R, Tsao PS, Cooke JP. Regression or progression dependency on vascular nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (1): 44-50
- Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointimal formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (5): 753-759
- Cook JP, Singer AH, Tsao PS. Antiatherosclerosis effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest*, 1992, **90** (1): 168-172
- Verburen TJ, Jordens FH, Zonnekyn LL, VanHove CE, Coene MC, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res*, 1986, **58** (4): 552-564

(此文编辑 胡必利)