

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0881-04

• 实验研究 •

西洋参茎叶总皂苷对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血脂及脂质代谢相关基因周脂素和 CD36 表达的影响

周明学¹, 徐浩², 史大卓³, 温见燕², 潘琳⁴, 郭艳茹⁴, 陈可冀^{2,3}

(1. 中国中医科学院 2005 级博士研究生班, 北京市 100700; 2. 中日友好医院全国中西医结合心血管中心, 北京市 100029; 3. 中国中医科学院西苑医院, 北京市 100091; 4. 中日友好医院临床研究所中心实验室, 北京市 100029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 西洋参茎叶总皂苷; Movat 五色套染法; 实时荧光定量 PCR 法; 脂质代谢; 动脉粥样硬化斑块稳定性; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠

[摘要] 目的 观察西洋参茎叶总皂苷对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠斑块成分及脂质代谢相关基因周脂素和清道夫受体 CD36 表达的影响, 探讨西洋参茎叶总皂苷稳定动脉粥样硬化斑块的作用及可能机制。方法 33 只 6~8 周龄小鼠载脂蛋白 E 基因敲除小鼠予高脂饮食喂养 13 周后, 待其形成成熟的动脉粥样硬化斑块后, 随机分为 3 组: 模型组、西洋参茎叶总皂苷组、辛伐他汀组(阳性对照组), 每组 11 只。继续高脂喂养, 并按体重比折算给予小鼠临床推荐剂量的相应药物治疗 13 周, 处死动物, 检测血脂, 取心脏和主动脉, 每只小鼠均取主动脉根部的 4 个切面, 分别行 HE 染色和 Movat 染色, 观察并计算各组小鼠主动脉粥样斑块内脂质核心大小, 脂质成分与胶原成分比值。实时荧光定量 PCR 法检测主动脉内周脂素和 CD36 mRNA 的表达。结果 给药 13 周后, 与模型组比较西洋参茎叶总皂苷组小鼠主动脉斑块内脂质核心面积以及脂质成分与胶原成分比值明显减小 ($P < 0.01$), 血清高密度脂蛋白显著升高 ($P < 0.01$)。而主动脉内周脂素和 CD36 mRNA 的表达与模型组比较均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 在临床推荐剂量上, 西洋参茎叶总皂苷可通过改善载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉斑块内部成分, 尤其是减少斑块内脂质含量来起到稳定动脉硬化斑块的作用, 其机制可能与抑制脂质代谢相关基因周脂素和清道夫受体 CD36 mRNA 的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Panax Quinquefolius Saponin on the Gene Expressions of Perilipin and CD36 Associated with Lipid Metabolism of Apolipoprotein E-Gene Knockout Mice

ZHOU Ming-Xue¹, XU Hao², SHI Da-Zhuo³, WEN Jian-Yan², PAN Lin⁴, GUO Yan-Ru⁴, and CHEN Ke-Ji^{2,3}

(1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Department of National Integrative Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 4. Central laboratory, Institution of Clinical Medical Sciences China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Panax Quinquefolius Saponin; Movat Staining; Real-Time Fluorescent Quantitative PCR Technology; Lipid Metabolism; Atherosclerosis; Plaque Stability

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of panax quinquefolius saponin on plaque content and the gene expressions of perilipin and scavenger receptor CD36 associated with lipid metabolism of ApoE-gene knockout mice and explore the effect of panax quinquefolius saponin on atherosclerotic plaque stability and its possible mechanism. **Methods** Thirty-three ApoE knockout mice had been fed with a high-fat diet for 13 weeks until the mature atherosclerotic plaques formed. Thereafter, they were randomized to three groups: control group, panax quinquefolius saponin group, simvastatin group (positive control group). Two drug-treated groups were treated with respective drug in clinical recommended doses for another 13 weeks accompanied by feeding high-fat diet. Then all the mice were sacrificed at the end of experiment, their blood was collected for determining the concentrations of blood lipids. The morphology and composition of atherosclerotic plaques in aortic roots were examined in tissue sections.

Four sections were choosed and stained with Movat and HE stains respectively. The lipid core in plaque as well as the ratio of lipid to collagen content in plaque in each mouse were measured and counted. The gene expressions of perilipin and CD36 were determined by Real-time fluorescent quantitative PCR technology. **Results** After treated drugs for 13 weeks, panax quinquefolius saponin group significantly reduced the lipid core as well as the ratio of lipid to collagen content in and the concentration of HDL in serum was significantly increased ($P < 0.01$). The gene expression of perilipin and CD36 in aorta were significantly

[收稿日期] 2007-10-16 [修回日期] 2007-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30572302)资助

[作者简介] 周明学, 博士, 研究方向为心血管疾病的中西医结合, 联系电话为 15810239504, E-mail 为 mingxue78@163.com。通讯作者徐浩, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管疾病的中西医结合, 联系电话为 010-84205137, E-mail 为 xuhao2005@yahoo.com.cn。史大卓, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的中西医结合。陈可冀, 中国科学院院士, 研究方向为心血管疾病的中西医结合。

downregulated compared with controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$). quifolius saponin may stabilize atherosclerotic plaque in aorta of ApoE⁻ gene knockout mice by improving plaque contents, especially lipid content in plaque, whose mechanism may be related to the inhibition on the gene expressions of perilipin and scavenger receptor CD36 associated with lipid metabolism.

脂质代谢紊乱是导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要机制,也是影响斑块稳定性的重要因素。周脂素可增加斑块内脂质的滞留,清道夫受体 CD36 可增加斑块内巨噬细胞对脂质的摄取,二者与脂质代谢及斑块稳定性关系密切。西洋参茎叶皂苷(panax quinquefolius saponin, PQS)是从西洋参茎叶中提取分离的有效组分,具有抗心肌缺血、抗休克、抗心律失常、抗氧化、调脂、抗 As、促血管新生等多方面心血管药理作用^[1],但其是否具有稳定 As 斑块的作用还没有相关报道。本研究即观察西洋参茎叶皂苷对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块成分及周脂素和 CD36 基因表达的影响,探讨其稳定斑块的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(品系 C57BL/6J, 北京大学实验动物中心自美国 Jackson 实验室引进并培育)33 只,均为雄性,体重 18~20 g,饲以含脂肪 21%,胆固醇 0.15% 的高脂饲料^[2](⁶⁰Co γ 灭菌照射处理),饲养条件为 2 级,室温保持在 22~24 °C 之间,相对湿度为 50%,光照时间为 7:00~19:00。

1.2 药物

西洋参茎叶总皂苷胶囊(即心悦胶囊)由吉林省集安益盛药业股份有限公司提供,批号为 20050330,辛伐他汀商品名舒降之,由杭州默沙东制药有限公司出品。批号为 P1196。

1.3 试剂与仪器

全自动生物化学测定仪(型号:RX-2000,美国 TECHNICON 公司生产);cDNA 合成试剂盒和荧光定量 RCR 试剂盒均由 TaKaRa 公司提供;CD36 及 perilipin 的上下游引物均由 invitrogen 公司提供;gene Amp PCR System 9700 由美国 ABI 公司提供;定量 PCR 仪(型号 Rotor gene 3000A,芬兰基因公司提供)。美国 Image-Pro Plus Version 5.0 (IPP) 图像分析软件。

1.4 分组及给药方法

小鼠喂养 13 周后,确定 As 斑块形成后,小鼠随机分为 3 组:辛伐他汀组、西洋参茎叶总皂苷组、模型组各 11 只。根据成人每日用药临床推荐的常用

Conclusions In a clinical recommended dose, panax quinquefolius saponin may stabilize atherosclerotic plaque in aorta of ApoE⁻ gene knockout mice by improving plaque contents, especially lipid content in plaque, whose mechanism may be related to the inhibition on the gene expressions of perilipin and scavenger receptor CD36 associated with lipid metabolism.

量,西洋参茎叶总皂苷组为 30 mg/kg、辛伐他汀组 1 mg/kg。按体重系数比折算成小鼠用量^[3]:西洋参茎叶总皂苷组为 270 mg/kg,辛伐他汀组 9.01 mg/kg。药物溶于蒸馏水,灌胃给药,每日一次,继续喂养 13 周。模型组给予同等剂量的生理盐水。取材前夜禁食,经小鼠眼眶静脉丛采血,离心分离血清,-80 °C 冻存,用作血脂测定。处死全部小鼠,无菌条件下取出心脏及主动脉,心脏用 10% 福尔马林固定。主动脉放在冻存管内液氮骤冷,-80 °C 保存。

1.5 病理染色

小鼠心底部横断面连续切片,每隔 50 μ m 连续取 4 张切片,切片厚 5 μ m。按文献[4]确立的方法,每只小鼠主动脉根部取 4 个相同切面,分别是:(1)升主动脉最近端横截面,切面形态呈圆形;(2)主动脉瓣附着部位,并有冠状动脉开口;(3)主动脉瓣起始横截面;(4)主动脉瓣完全出现并汇合在一起。改良的 Movat 五色套染法参考文献[5]并略加改进,最终的染色结果为:细胞核及弹力纤维为黑色;基质和粘蛋白为蓝色;胶原纤维为黄色;平滑肌为红色;泡沫细胞为淡紫色。最终采用 HE 染色和 Movat 染色,利用 IPP 软件分别测量并计算斑块内脂质核心占斑块面积的百分比以及斑块内脂质成分与胶原成分的比值。

1.6 血脂测定

总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)用酶法测定,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDL)用免疫比浊法,动脉粥样硬化指数(atherosclerotic, AI)以 TC-HDL/HDL 间接计算。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

先提取小鼠主动脉总 RNA,后取 4 μ L 总 RNA 经逆转录酶及随机引物等反应物混合配成 20 μ L 体系,42 °C 15 min,95 °C 2 min 反转录成 cDNA,随后进行实时荧光定量 PCR 反应,小鼠周脂素引物序列:上游 5'-GAT GAG AGC CAT GAC GAC CAG A-3',下游 5'-TG TGT ACC ACA CCA CCC AGG A-3',扩增片段 148 bp;小鼠 CD36 引物序列:上游 5'-GAT GAC GTG GCA AAG AAC AG-3';下游 5'-TCC TCG GGG TCC TGA GTT AT-3',扩增片段 107 bp;扩增条件是 95 °C 10 s \rightarrow 95 °C 5 s \rightarrow 60 °C 34 s,共 40 个循环。以小

鼠肌动蛋白 β -actin 为内参照,引物序列为:上游 5'-CAGAAGG AGATTACTGCTC TGG C T-3',下游 5'-GGAG CCAC CGATCCACACA-3',扩增片段 93 bp。最后与模型组比较得出相对浓度值。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件,单因素方差分析各组基因表达差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 模型组小鼠高脂喂养 26 周后主动脉粥样斑块病理结构的变化

HE 染色显示模型组主动脉根部可看到明显的 As 斑块,表面有大量泡沫细胞覆盖,胆固醇酯及胆固醇结晶明显增多,纤维帽较薄,脂质侵蚀,钙化,外膜有大量炎细胞浸润,显示出易损斑块特征。Movat 染色显示模型组斑块内胶原成分明显减少,可见大量的卵圆形的巨噬细胞源性泡沫细胞,部分斑块纤维帽被泡沫细胞埋藏,血管中膜结构严重破坏。血管扩张性重塑,主动脉内膜弥漫性增厚。

2.2 各给药组对动脉粥样硬化斑块稳定性的影响

按临床推荐剂量给药 13 周后,与模型组比较,斑块内脂质核心占斑块面积的百分比以及斑块内脂质成分与胶原成分比值,西洋参茎叶总皂苷组和辛

伐他汀组均显著降低($P < 0.01$,表 1,图 1)。

2.3 给药 13 周后各组小鼠血脂测定结果的比较

给药 13 周后,与模型组比较,西洋参茎叶总皂苷组小鼠 HDL 浓度明显升高($P < 0.01$),TC、TG、VLDL、TC-HDL/HDL 指标与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$)。辛伐他汀组小鼠血清 TC、TG 和 TC-HDL/HDL 均明显降低($P < 0.01$,表 2)。

表 1. 给药 13 周后各组对小鼠主动脉粥样斑块内成分的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 11$)

分 组	脂核占斑块面积百分比	脂质成分与胶原成分比值
模型组	32.14% \pm 13.89%	6.32 \pm 3.29
辛伐他汀组	15.69% \pm 7.51% ^a	1.86 \pm 0.96 ^a
西洋参茎叶总皂苷组	21.04% \pm 11.98% ^a	1.65 \pm 1.05 ^a

a 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

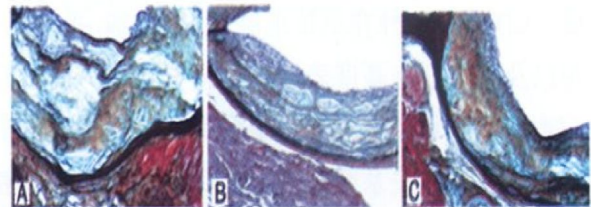


图 1. 给药 13 周后各组小鼠主动脉斑块内部成分改善情况 (Movat 染色 $\times 100$) A 为模型组, B 为辛伐他汀组, C 为西洋参茎叶总皂苷组。

表 2. 给药 13 周各组载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血脂的比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TC	TG	HDL	VLDL	TC-HDL/HDL
模型组	11	25.58 \pm 2.28	2.58 \pm 0.31	3.83 \pm 0.42	1.33 \pm 0.32	5.68 \pm 0.25
辛伐他汀组	11	13.72 \pm 2.40 ^a	1.31 \pm 0.20 ^a	3.57 \pm 0.29	1.30 \pm 0.34	2.90 \pm 0.37 ^a
西洋参茎叶总皂苷组	11	23.76 \pm 3.05	2.87 \pm 0.53	4.94 \pm 0.89 ^a	1.30 \pm 0.35	3.73 \pm 0.82

a 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

2.4 给药 13 周后各组小鼠主动脉斑块内周脂素和 CD36 mRNA 表达的比较

与模型组相比,给药 13 周后西洋参茎叶总皂苷组和辛伐他汀组主动脉斑块内的周脂素和清道夫受体 CD36 mRNA 的相对浓度均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$,表 3)。

3 讨论

脂质代谢紊乱是导致 As 发病的主要机制之一。巨噬细胞吞噬脂质后转化成泡沫细胞,而巨噬细胞源性泡沫细胞的不断聚集、坏死可使斑块内细胞外脂质不断增多,脂质核心变大,使斑块稳定性降低。

表 3. 给药后各组小鼠主动脉内周脂素和 CD36 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	周脂素 (相对浓度)	CD36 (相对浓度)
模型组	11	1.0 \pm 0.03	1.0 \pm 0.02
辛伐他汀组	11	0.20 \pm 2.40 ^a	0.33 \pm 0.08 ^a
西洋参茎叶总皂苷组	11	0.68 \pm 0.43 ^b	0.43 \pm 0.09 ^a

a 为 $P < 0.01$,与模型组比较; b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

降脂治疗可通过减少斑块内脂质沉积,促进胆固醇的逆向转运,减少斑块内胆固醇酯浓度,增加斑块稳定性^[6,7]。本研究结果表明西洋参茎叶总皂苷在临床推荐剂量上具有明显改善载脂蛋白 E 基因敲除

小鼠主动脉粥样硬化斑块内脂质成分(包括减少脂核面积和改善脂质成分与胶原成分比例),从而起到稳定斑块的作用。HDL 具有防止动脉内膜脂质堆积,抑制 As 病变形成的作用。在动脉粥样硬化疾病中 HDL 降低与 LDL 升高同样危险^[8]。提高血清 HDL 水平可以减少胆固醇在血管壁的沉积,缩小斑块脂质核心并且可以阻止易损斑块的形成。它还具有抗血栓、抗炎、抗氧化及增加内皮细胞抗低密度脂蛋白的毒性作用等功能^[9],因此,提高高密度脂蛋白浓度能从多方面稳定粥样斑块,预防斑块破裂。本研究结果表明西洋参茎叶总皂苷在临床推荐剂量上虽然没有明显降低 TC、TG,但可以提高载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清 HDL 浓度,并可能由此促进胆固醇的逆向转运,使斑块内细胞外脂质含量降低,有助于稳定斑块。

巨噬细胞通过清道夫受体对修饰氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的摄取是泡沫细胞形成和 As 进展的关键。CD36 是一种在单核细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞以及脂肪细胞高度表达的清道夫受体,是修饰 ox-LDL 的主要清道夫受体^[10]。研究^[11,12]提示,CD36 与脂质代谢紊乱关系密切,并可能因增加斑块内脂质成分而影响到斑块稳定性。本研究结果表明西洋参茎叶总皂苷和辛伐他汀在临床推荐剂量上均可明显抑制小鼠主动脉斑块内清道夫受体 CD36 mRNA 的表达,这可能是二者减少斑块内脂质成分,稳定斑块的机制之一。

Han 等^[13]证实, HDL 增加巨噬细胞过氧化物激活受体 γ (PPAR γ) 表达、转录和磷酸化,抑制巨噬细胞 CD36 的表达,抑制细胞脂质蓄积,并呈一种剂量依赖效应。本研究也表明西洋参茎叶总皂苷可提高载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清 HDL 浓度,减少小鼠主动脉斑块内清道夫受体 CD36 mRNA 的表达,与上述研究结果是一致的。

蛋白周脂素包被在细胞内油滴的表面,调控油滴和脂质的生成、转运、积累和脂肪分解。细胞内油滴过度聚集也是 As 斑块的泡沫细胞形成的前提,并可能参与诱发斑块破裂。研究表明,周脂素的大量表达,可以保护胆固醇酯免受中性的胆固醇酯水解酶的水解作用^[14],促进斑块内胆固醇酯不断聚集,进而影响到斑块的稳定性。另有研究表明,采用减少抑制杂交技术发现在人的 As 斑块中基因周脂素

只在破裂斑块内表达,而在稳定的斑块内没有表达^[15]。本研究结果表明西洋参茎叶总皂苷和辛伐他汀均可明显降低脂质代谢相关基因周脂素的表达,并且可能因此减少斑块内脂质沉积,起到稳定 As 斑块的作用。

综上所述,在临床推荐剂量上,西洋参茎叶总皂苷可通过改善小鼠主动脉斑块内部成分,尤其是减少斑块内脂质含量起到稳定 As 斑块的作用,其机制可能与增加血清 HDL 浓度,抑制脂质代谢相关基因周脂素和清道夫受体 CD36 mRNA 的表达有关。

[参考文献]

- [1] 王承龙, 殷惠军, 史大卓, 陈可冀. 西洋参茎叶皂苷心血管药理研究概述[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17 (1): 76-78.
- [2] Johnson J, Carson K, Williams H, Karanam S, Newby A, Angelini G. Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment [J]. *Circulation*, 2005, 111 (23): 1 422-430.
- [3] 许淑云, 卞如灏, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002; 202-204.
- [4] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection [J]. *Nature*, 1997, 386 (6 622): 292-296.
- [5] 李莉, 翟同均, 陈融, 胡维诚. Movat 五色套染法的改进及应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18 (6): 660-662.
- [6] Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Glavey V. Apolipoprotein A $\text{\textcircled{C}}$ HDL metabolism and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 164 (1): 1-13.
- [7] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BC, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial [J]. *J Am Med Assoc*, 2004, 291 (9): 1 071-080.
- [8] 董劭壮, 赵水平. 胆固醇酯转运蛋白抑制剂研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (6): 550-552.
- [9] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004; 585.
- [10] 刘浩, 刘秉文. 动脉壁脂蛋白受体与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (2): 171-174.
- [11] Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 286 (122): 191-205.
- [12] Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, et al. CD36, a novel receptor for oxidized low density lipoproteins, is highly expressed on lipid laden macrophages in human atherosclerotic aorta [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19 (5): 1 333-339.
- [13] Han J, Hajjar DP, TaurAs JM, Nicholson AC. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36 [J]. *J Lipid Res*, 1999, 40 (5): 830-838.
- [14] Fabien Forcheron, Liliana Legedz, Guiletta Chinetti, Patrick Feugier, Dominique Letexier, Giampiero Bricca. Overexpression of Perilipin and Genes Promoting Cholesterol Storage and Repression of ABCA1 Expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (5): 1 711-717.
- [15] Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL, Aarts PL, Boon Wendy, Greenberg AS. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 2001, 9 (89): 547-554.

(此文编辑 李小玲)