

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-01-0004-03

淫羊藿苷对高脂血症大鼠粘附分子基因表达的影响

王茜, 林煥冰, 程玉芳, 徐江平

(南方医科大学药学院药理学系, 广东省广州市 510515)

[关键词] 药理学; 淫羊藿苷; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 细胞间粘附分子 1; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 目的 研究淫羊藿苷对高脂血症大鼠粘附分子基因表达的影响。方法 健康雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为对照组、高脂饮食组、高脂饮食+低剂量淫羊藿苷组、高脂饮食+高剂量淫羊藿苷组, 检测各组大鼠血清脂质水平及观察主动脉病理学改变。并采用荧光实时聚合酶链反应法比较主动脉壁细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 基因的表达。结果 与高脂饮食组比较, 淫羊藿苷低剂量组和高剂量组总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平 ($P < 0.05$ 或 0.01) 降低, 细胞间粘附分子 1 mRNA 的表达显著减低 ($P < 0.01$), 而血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达没有显著改变 ($P > 0.05$)。结论 淫羊藿苷能降低高脂血症大鼠血脂并抑制细胞间粘附分子 1 mRNA 的表达。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Influence of Icariin on Adhesion Molecule Gene Expression in Hyperlipidemia Rats

WANG Qian, LIN Huan Bing, CHENG Yu Fang, and XU Jiang Ping

(Department of Pharmacology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[KEY WORDS] Icariin; Hyperlipidemia; Atherosclerosis; Intercellular Adhesion Molecule 1; Vascular Cell Adhesion Molecule 1

[ABSTRACT] Aim To investigate the influence of icariin on adhesion molecule gene expression in hyperlipidemia rats.

Methods 40 male healthy SD rats were randomly divided into four groups: control group, high cholesterol group, high cholesterol with low dose icariin (100 mg/kg) group, high cholesterol with high dose icariin (200 mg/kg) group. Serum lipid level of all rats was measured and the aorta was taken for pathologic analysis. The mRNA expression of both intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on the aorta was analyzed by realtime PCR. **Results** As compared with the high cholesterol group, the level of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) in high cholesterol with icariin was obviously lower ($P < 0.05$ or 0.01); the mRNA expression of ICAM-1 was significantly decreased ($P < 0.01$); but the mRNA expression of VCAM-1 was not significantly inhibited. **Conclusion** Icariin can reduce the level of blood lipid and the mRNA expression of ICAM-1 in hyperlipidemia rats.

高脂血症是动脉粥样硬化发生的一个重要危险因素。在动脉粥样硬化的发病过程中, 高脂血症损伤内皮细胞, 影响内皮细胞的正常功能, 白细胞粘附于血管内皮细胞, 并迁移入内皮下摄取脂质转化为泡沫细胞, 粘附分子介导粘附过程^[1]。目前普遍认为粘附分子在炎症反应、血小板活化及氧化应激反应等过程中起着重要的作用, 且在动脉粥样硬化病变中各种细胞表面有细胞粘附分子表达, 而正常组织细胞不表达或仅轻微表达, 提示细胞粘附分子在动脉粥样硬化形成早期中发挥重要的作用。

淫羊藿为小檗科淫羊藿的多年生植物, 具有补肾阴、强筋骨、祛风湿等多种功效。淫羊藿含有多种

有效成分。淫羊藿苷是淫羊藿主要活性成分之一^[2], 具有促进免疫功能, 抗肿瘤, 增强心血管功能等作用。研究表明, 淫羊藿苷对损伤的内皮细胞具有保护作用^[3]。提示淫羊藿苷可能对高脂血症粘附分子表达具有抑制作用。本研究采用大鼠高脂血症模型, 探讨淫羊藿苷对粘附分子基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

淫羊藿苷由南方医科大学药学院药理学教研室提取制备, 经检测总苷含量为 $78.5\% \pm 1.0\%$ 。丙硫氧嘧啶购自广东华南药业有限公司, 批号 060902; 胆固醇和三号胆盐购自广州威佳科技有限公司; 维生素 D3 注射液购自江苏吴中实业股份有限公司, 批号 050316; Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; 三氯甲烷、异丙醇和乙醇购自国药集团; M-MLV 逆转录

[收稿日期] 2007-09-07 [修回日期] 2007-12-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30472178)

[作者简介] 王茜, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 wangq86@fimmu.com。通讯作者徐江平, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理和精神药理, E-mail 为 jpx@fimmu.com。

酶、RNA 酶抑制剂、Oligo dT(18) 和 dNTP 混合物购自 TaKaRa; 新型荧光总量 PCR 试剂盒购自 TIANGEN; 甘油三酯、总胆固醇、血清高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

SD 大鼠, 雄性, 体重 180~220 g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 合格证号为粤检字第 2006A051。

1.3 高脂模型的建立及淫羊藿苷的干预

40 只大鼠随机分为正常对照组、高脂饮食组、高脂饮食+100 mg/kg 淫羊藿苷组(低剂量淫羊藿苷组)、高脂饮食+200 mg/kg 淫羊藿苷组(高剂量淫羊藿苷组)。正常对照组给予标准饲料, 其余三组第 1 天按 600 ku/kg 腹腔注射维生素 D₃, 并每天给予高脂饲料(3% 胆固醇、0.5% 胆盐、5% 白糖、10% 猪油、0.2% 丙硫氧嘧啶和 81.3% 基础饲料), 连续 7 周。第 8 周起采用灌胃给药法, 每天 1 次, 连续 4 周^[4]。

1.4 血脂测定

给药 4 周后, 10% 水合氯醛麻醉, 颈总动脉取血 5 mL, 3000 r/min, 离心 15 min, 取血清后按试剂盒要求检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。

1.5 组织病理学观察

大鼠主动脉弓与胸主动脉交界处取材, 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 水平横切面制备石蜡切片, 厚度 4 μm, 苏木素伊红(HE)染色, 光镜观察。

1.6 荧光实时聚合酶链反应

动物处死后立即取主动脉 100 mg, 液氮中研磨成粉末, 用 Trizol 试剂提取总 RNA。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 没有明显降解, 并测定 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.8~2.1 之间, 取总 RNA 3 μg 逆转录合成 cDNA。应用 Primer 5.0 引物设计软件进行引物设计。用 Oligo dT(18) 引物逆转录获得总 cDNA。以 cDNA 为模板, 设定 PCR 反应条件。反应条件为 95℃ 变性 10 s → 58℃ 退火 20 s → 72℃ 延伸 15 s, 均为 40 个循环。ICAM-1 引物上游 5'-TCG GCC TGG GGT TGG AGA CTA A-3', 下游 5'-AGA AGC CGA GGA CTG CGT GGT G-3', 扩增产物长度 143 bp; VCAM-1 引物上游 5'-CAG GTT GGG GAT TCC GTT GTT CT-3', 下游 5'-CAA GGG CTC AGC GTC AGT GTG G-3', 扩增产物长度 142 bp; β-actin 引物上游 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC-3', 下游 5'-GTA CTC CTG

CCT GCT GAT CG-3', 扩增产物长度 211 bp。将样品的目的基因以及 β-actin 进行扩增, 其产物进行梯度稀释作标准曲线, 标准曲线样品和待测样品加入到含 SYBR Green 荧光染料反应体系中, 在 TP800 Realtime PCR 仪上进行实时定量 PCR 扩增^[5]。检测结果进行标准曲线分析, 得出 Ct 值, 计算 ICAM-1 或 VCAM-1 的 Ct 值与 β-actin 的 Ct 值的差值 ΔCt, 以 2^{-ΔCt} 作为 ICAM-1 或 VCAM-1 mRNA 的相对含量进行分析。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用 ANOVA 分析再用 LSD 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平

高脂饮食组 TC、TG 和 LDLC 水平显著高于与对照组, 给予淫羊藿苷后 TC、TG 和 LDLC 水平明显降低, 且与高脂饮食组差异显著(表 1)。

表 1. 血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

指 标	对照组 (<i>n</i> = 8)	高脂饮食组 (<i>n</i> = 8)	低剂量淫羊 藿苷组(<i>n</i> = 12)	高剂量淫羊 藿苷组(<i>n</i> = 12)
TC	3.11 ± 0.19	3.72 ± 0.51 ^a	3.02 ± 0.90 ^d	2.98 ± 0.21 ^d
TG	0.23 ± 0.09	0.49 ± 0.19 ^b	0.24 ± 0.14 ^d	0.19 ± 0.05 ^d
LDLC	0.77 ± 0.21	1.57 ± 0.28 ^b	1.04 ± 0.79 ^c	0.91 ± 0.16 ^d
HDLC	0.44 ± 0.07	0.53 ± 0.17	0.50 ± 0.22	0.60 ± 0.17

a 为 *P* < 0.05, b 为 *P* < 0.01, 与对照组比较; c 为 *P* < 0.05, d 为 *P* < 0.01, 与高脂饮食组比较。

2.2 组织病理学改变

光镜下, 对照组血管壁结构清晰、内皮细胞完整无脱落, 内膜薄, 中层平滑肌层均匀、厚度正常, 外层为疏松结缔组织; 高脂饮食组血管内皮细胞部分脱落, 内膜增厚, 血管壁向管腔内突出, 可见钙化及中膜平滑肌萎缩。而淫羊藿苷干预组没有明显的病理改变(图 1)。

2.3 细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达

高脂饮食组 ICAM-1 mRNA 的表达显著高于对照组(*P* < 0.01), 而淫羊藿苷干预组 ICAM-1 mRNA 的表达则显著降低(*P* < 0.01)。高脂饮食组 VCAM-1 mRNA 的表达显著高于对照组(*P* < 0.01), 而淫羊藿苷干预组 VCAM-1 mRNA 的表达有下降趋势, 但没有显著性差异(表 2)。

表 2. 细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	ICAM-1 mRNA	VCAM-1 mRNA
对照组	0.00140 \pm 0.00021	0.00307 \pm 0.00036
高脂饮食组	0.00404 \pm 0.00028 ^a	0.00861 \pm 0.00167 ^a
低剂量淫羊藿苷组	0.00291 \pm 0.00033 ^b	0.00820 \pm 0.00036
高剂量淫羊藿苷组	0.00250 \pm 0.00021 ^b	0.00744 \pm 0.00156

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高脂饮食组比较。

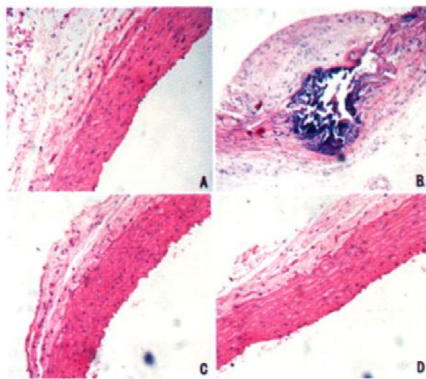


图 1. 主动脉 HE 染色 ($\times 100$) A 为对照组, B 为高脂饮食组, C 为低剂量淫羊藿苷组, D 为高剂量淫羊藿苷组。

3 讨论

高脂血症引起的血管炎性病变是动脉粥样硬化病理过程的早期改变^[6]。高脂血症不仅是动脉粥样硬化的促发因素,而且贯穿其发生、发展的过程当中^[7,8]。本研究结果发现,淫羊藿苷干预组血清 TG、TC 和 LDLC 降低,提示淫羊藿苷可能通过调脂作用阻止高脂血症导致的内皮损伤,并抑制进一步发展为动脉粥样硬化。

血脂升高作为动脉粥样硬化的危险因子,能促进粘附分子的表达和白细胞与内皮细胞的粘附。低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 被氧化修饰成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL, ox-LDL), ox-LDL 能上调血管壁 ICAM-1 的表达。ICAM-1 在动脉粥样硬化早期单核细胞粘附于血管壁及在细胞增殖与迁移、泡沫细胞形成中发挥重要作用。有研究发现,载脂蛋白 E^{-/-}/ICAM-1^{-/-} 小鼠在任何年龄阶段其粥样斑块均要小于载脂蛋白 E^{-/-}/ICAM-1^{+/+} 小鼠^[9,10]。本研究结果发现,正常对照组血管壁 ICAM-1 mRNA 的表达很低,高脂血症组血管壁 ICAM-1 mRNA 表达明显增加。ICAM-1 mRNA 表达增高,白细胞活化、与内皮细胞粘附、穿越血管、向炎症部位渗出,从而启动动脉粥样硬化发生及进展。淫羊藿苷干预组血管壁 ICAM-1 mRNA 表达明显下降,推测

淫羊藿苷可能通过降低 ICAM-1 mRNA 表达发挥作用。非氧化型 LDL 也可通过诱发内皮细胞 VCAM-1 表达水平的升高来影响血管功能^[11]。有研究认为 VCAM-1 在动脉粥样硬化病变早期主要促使单核细胞向内皮粘附,而单核细胞、T 淋巴细胞与血管内皮细胞发生粘附代表着动脉粥样硬化形成早期炎症的开始^[12]。基因敲除技术获得的突变小鼠 VCAM-1 mRNA 表达显著减少可增强其抗动脉粥样硬化能力^[13]。本研究中,高脂血症组 VCAM-1 mRNA 的表达显著高于正常组,淫羊藿苷干预组 VCAM-1 mRNA 有下降的趋势,但没有显著性意义。提示淫羊藿苷可能间接通过或不通过抑制 VCAM-1 mRNA 表达发挥抗动脉粥样硬化作用。

本研究证实淫羊藿苷通过降低高脂血症大鼠血脂并抑制 ICAM-1 mRNA 表达,从而达到抗高脂血症所致早期动脉粥样硬化形成的作用,为进一步研究抗动脉粥样硬化作用提供了一定的理论依据。

【参考文献】

- [1] 张红霞, 刘剑刚, 马鲁波, 等. 高脂血症模型白细胞粘附活化和白细胞介素 2.6 和 8 的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (2): 99-102.
- [2] Liu ZQ, Luo XY, Sun YX, et al. The antioxidative effect of icariin in human erythrocytes against free radical-induced haemolysis [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56 (12): 1557-562.
- [3] Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro [J]. Pharmacol Res, 2005, 52 (2): 174-182.
- [4] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (5): 465-469.
- [5] Strick R, Ackermann S, Langhein M, et al. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin 1 and regulated by TGF- β [J]. J Mol Med, 2007, 85 (1): 23-38.
- [6] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. Nature, 1993, 362 (4): 801-809.
- [7] Blann AD, Seigneur M, Steiner M, et al. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events [J]. Thromb Haemost, 1998, 79 (6): 1080-1085.
- [8] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arteriole atherosclerotic wall [J]. Atherosclerosis, 1996, 127 (2): 263-271.
- [9] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice [J]. Atherosclerosis, 2002, 160 (2): 305-310.
- [10] Collins RG, Velji R, Guevara NV, et al. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Exp Med, 2000, 191 (1): 189-194.
- [11] Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, et al. Native low density expression in cultured human vascular endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1998, 101 (5): 1064-1075.
- [12] 罗瑛, 谢秀梅. NF- κ B 和 sICAM-1 与冠状动脉粥样硬化的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14 (1): 78-80.
- [13] Cybulsky MI, Liyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 2001, 107 (10): 1255-1262.

(此文编辑 文玉珊)