

# 普罗布考对动脉粥样硬化兔血红素氧合酶 1 表达的影响

赵水平, 王 星, 洪绍彩, 吴智宏

(中南大学湘雅二医院心血管内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 内科学; 普罗布考; 血红素氧合酶 1; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察血红素氧合酶 1 蛋白在兔主动脉粥样硬化病变和肝脏中的表达以及普罗布考对血红素氧合酶 1 表达的影响。方法 16 只新西兰大白兔建立动脉粥样硬化模型后, 随机加喂普罗布考 ( $n=8$ , 普罗布考组) 或淀粉 ( $n=8$ , 淀粉组) 6 周。观察两组兔以及正常新西兰大白兔 ( $n=8$ , 正常对照组) 血脂、体重和血清丙二醛含量。采用免疫组织化学法测定主动脉和肝脏血红素氧合酶 1 蛋白的表达。结果 与淀粉组相比, 普罗布考组血红素氧合酶 1 在主动脉和肝脏内表达增多, 动脉粥样斑块减少, 血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和丙二醛明显降低。血红素氧合酶 1 在动脉内膜斑块、动脉平滑肌以及肝脏内的表达水平与血清丙二醛、主动脉斑块面积、内膜厚度、动脉内膜中膜厚度比均呈明显负相关 ( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 普罗布考在降低胆固醇的同时, 还可能通过上调血红素氧合酶 1 发挥抗氧化作用, 这可能是其抗动脉粥样硬化的重要途径。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Probucol on Heme Oxygenase-1 in Rabbits with Atherosclerosis

ZHAO Shu Ping, WANG Xing, HONG Shao Cai, and WU Zhi Hong

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Probucol; Heme Oxygenase-1; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of probucol on the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) protein in atherosclerotic lesions and livers in rabbits. **Methods** The hypercholesterolemic model was built up by 8 weeks high cholesterol diet. Then 16 New Zealand rabbits were randomly fed with starch ( $n=8$ , starch group) or probucol ( $n=8$ , probucol group) for 6 weeks. Those two groups and another 8 New Zealand rabbits ( $n=8$ , control group) were tested for serum lipid, body weight and serum malon dialdehyde (MDA). Expression of HO-1 was detected by immunohistochemistry. **Results** Probucol treatment increased HO-1 expression in atherosclerotic plaque, aorta smooth muscle cell and liver, decreased atherosclerotic areas, intima thicknesses, and ratio of intima to media, and down regulated serum total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), high density lipoprotein cholesterol (HDLC) and MDA. Expression of HO-1 protein in atherosclerotic plaque, smooth muscle cell and liver in hypercholesterolemic rabbits with and without probucol treatment was negatively correlated with serum levels of MDA, atherosclerotic areas, intima thickness, and the ratio of intima to media ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** While lowering serum cholesterol, probucol may also exert anti-oxidative actions through upregulation of HO-1 expressions, which might be an important part of its anti-atherogenic properties.

普罗布考是一类效果明确的抗动脉粥样硬化药物, 但具体作用机制尚未完全阐明, 且其抗氧化特性被认为是源于自身氧离子捕捉和断链的能力。血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是一种广泛存在的抗氧化防御酶, 具有抗动脉粥样硬化作用。本研究通过建立高胆固醇饮食兔动脉粥样硬化模型, 观察 HO-1 表达以及普罗布考对其影响, 探讨 HO-1 在普罗布考抗动脉粥样硬化机制中的地位及意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和试剂

24 只 3 月龄的健康雄性新西兰大白兔由中南大学湘雅二医院实验动物中心提供。体重  $2.5 \pm 0.5$  kg, 清洁级, 单笼饲养在恒温空调房中。普罗布考药粉由河北承德颈复康药业集团提供。胆固醇和蛋黄粉由天津化学试剂公司提供。HO-1 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色系统购自武汉博士德生物工程有限公司。其余均为市售分析纯试剂。

### 1.2 兔动脉粥样硬化模型的建立以及普罗布考的干预

24 只兔单笼饲养观察一周后, 随机选取 16 只兔予以高胆固醇饲料(具体配方参见余艳辉等<sup>[1]</sup>报道)。每只兔每日总食量约 120 g, 单笼饲养, 饮水不

[收稿日期] 2007-11-09 [修回日期] 2008-06-05

[作者简介] 赵水平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究, E-mail 为 ZhaoSP@medmail.com.cn。王星, 硕士, 住院医师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究。洪绍彩, 博士, 副主任医师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化研究。

限。第 9 周开始随机加喂普罗布考[500 mg/(kg·d)] (普罗布考组,  $n=8$ ) 或淀粉(淀粉组,  $n=8$ ), 其余 8 只予以普通饲料喂养 14 周作为对照组。

### 1.3 体重、血脂和血清丙二醛的测定

0 周、8 周和 14 周末, 称取动物体重。经兔耳中央动脉取空腹血 5 mL, 静置 30 min 后离心取血清, 置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 采用酶法测定, 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) 采用化学遮蔽法在日立 7600-020 全自动生化仪上测定。丙二醛采用硫代巴比妥酸法测定。各指标测定均采用盲法进行。

### 1.4 主动脉粥样硬化斑块面积、内膜和中膜厚度的测定

将主动脉标本进行苏丹 III 染色并测定动脉粥样硬化斑块面积(用占内膜总面积的百分比表示)。石蜡包埋标本切片按常规方法进行 HE 染色。在高倍镜下随机选取 5 个视野, 测定内膜和中膜厚度, 取平均值。以上测定均由有经验的实验员利用北航病理图像分析系统进行。

### 1.5 免疫组织化学检测及半定量分析

采用 SABC 法。组织用石蜡包埋后切成 4  $\mu\text{m}$  厚切片。烘片, 常规脱蜡至水, 灭活内源性酶后热修复抗原。按照试剂盒操作步骤先后加入 1:100 稀释的兔抗 HO-1 多克隆抗体、生物素化山羊抗兔 IgG 及

SABC 后 DAB 显色。复染后脱水封片镜检。同时作无抗体的阴性对照。以胞质出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞, 无着色为阴性细胞。染色强度分为强、中、弱和无, 分别记 3、2、1 和 0 分; 同时计数阳性细胞的百分比,  $>75\%$  为 4 分,  $51\% \sim 75\%$  为 3 分,  $25\% \sim 50\%$  为 2 分,  $<25\%$  为 1 分; 两者相乘为染色分数。高倍镜下每张切片随机取 5 个视野测定染色分数, 平均值为 HO-1 表达的半定量结果。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件分析。所有数据进行正态性检验, 用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析, 组内不同阶段比较采用配对  $t$  检验。方差齐性者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。相关分析采用 Bivariate 过程的 Pearson 等级相关法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组兔血脂和体重的变化

淀粉组和普罗布考组第 8 周时血清 TC、LDLC、HDLC 和 TG 水平较 0 周时水平明显升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 14 周时淀粉组 TC、LDLC 和 HDLC 水平稍下降, 但较 8 周时无显著差异; 14 周时普罗布考组 TC、LDLC 和 HDLC 较 8 周时明显降低 ( $P < 0.01$ ), 普罗布考对 TG 无明显影响。各组兔的体重在实验过程中差异无显著性(表 1)。

表 1. 普罗布考对血脂和体重的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

分 组	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	体重 (kg)
正常对照组					
0 周	0.86 $\pm$ 0.42	0.32 $\pm$ 0.26	0.52 $\pm$ 0.23	0.89 $\pm$ 0.38	2.53 $\pm$ 0.47
8 周	0.89 $\pm$ 0.35	0.30 $\pm$ 0.25	0.55 $\pm$ 0.25	0.94 $\pm$ 0.45	3.03 $\pm$ 0.41
14 周	0.98 $\pm$ 0.49	0.33 $\pm$ 0.36	0.56 $\pm$ 0.20	1.06 $\pm$ 0.34	2.88 $\pm$ 0.46
淀粉组					
0 周	0.81 $\pm$ 0.28	0.27 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.24	0.77 $\pm$ 0.32	2.46 $\pm$ 0.51
8 周	28.83 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>	24.32 $\pm$ 3.52 <sup>c</sup>	2.31 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>	1.75 $\pm$ 1.42 <sup>c</sup>	3.06 $\pm$ 0.35
14 周	26.68 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>	23.74 $\pm$ 3.23 <sup>c</sup>	1.97 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup>	1.92 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	3.08 $\pm$ 0.37
普罗布考组					
0 周	0.82 $\pm$ 0.37	0.24 $\pm$ 0.21	0.52 $\pm$ 0.24	0.74 $\pm$ 0.31	2.54 $\pm$ 0.34
8 周	25.68 $\pm$ 4.53 <sup>c</sup>	22.76 $\pm$ 4.62 <sup>c</sup>	2.15 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	1.76 $\pm$ 1.36 <sup>c</sup>	3.03 $\pm$ 0.34
14 周	19.15 $\pm$ 2.38 <sup>bc</sup>	17.42 $\pm$ 2.69 <sup>bc</sup>	1.04 $\pm$ 0.21 <sup>bc</sup>	2.09 $\pm$ 1.62 <sup>c</sup>	2.98 $\pm$ 0.36

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与淀粉组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与本组 0 周时比较。

### 2.2 各组兔血清丙二醛含量

8 周时, 正常对照组血清丙二醛水平较基线无明显差异, 淀粉组和普罗布考组较基线显著升高 ( $P$

$< 0.05$ ); 14 周时, 淀粉组和普罗布考组血清丙二醛水平继续升高, 普罗布考组血清丙二醛水平较淀粉组显著减少 ( $P < 0.01$ ; 表 2)。

表 2. 兔血清丙二醛含量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ , mg/L)

	正常对照组	淀粉组	普罗布考组
0周	5.29 ± 0.27	5.22 ± 1.31	5.17 ± 1.12
8周	5.32 ± 0.25 <sup>a</sup>	8.63 ± 2.31 <sup>c</sup>	8.51 ± 2.68 <sup>c</sup>
14周	6.11 ± 0.37 <sup>b</sup>	13.62 ± 6.28 <sup>d</sup>	9.34 ± 4.25 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与淀粉组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与本组 0 周时比较。

### 2.3 各组兔主动脉病理形态学变化

肉眼观察, 正常对照组兔动脉内膜光滑完整, 无动脉粥样硬化斑块; 淀粉组兔动脉内膜粗糙、布满粥样硬化斑块; 普罗布考组兔动脉内膜粥样硬化斑块较淀粉组明显减少。正常对照组、淀粉组和普罗布考组主动脉粥样斑块面积占整个内膜面积的百分比分别为 0、72.6% ± 9.5% 和 40.2% ± 10.4%, 三组间差异有显著性 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

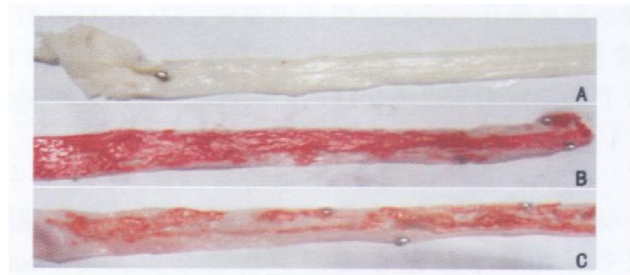


图 1. 各组兔主动脉苏丹 III 染色 A 为正常对照组, B 为淀粉组, C 为普罗布考组。

### 2.4 各组兔主动脉内膜和中膜厚度比较

正常对照组主动脉内膜连续、光滑、内皮细胞完整; 淀粉组主动脉内膜明显增厚, 内含较多泡沫细胞, 内皮细胞过度增殖; 普罗布考组主动脉内膜改变较淀粉组明显减轻(图 2)。正常对照组、淀粉组和普罗布考组主动脉内膜厚度和内膜中膜厚度比差异有显著性 ( $P < 0.05$ ; 表 3)。

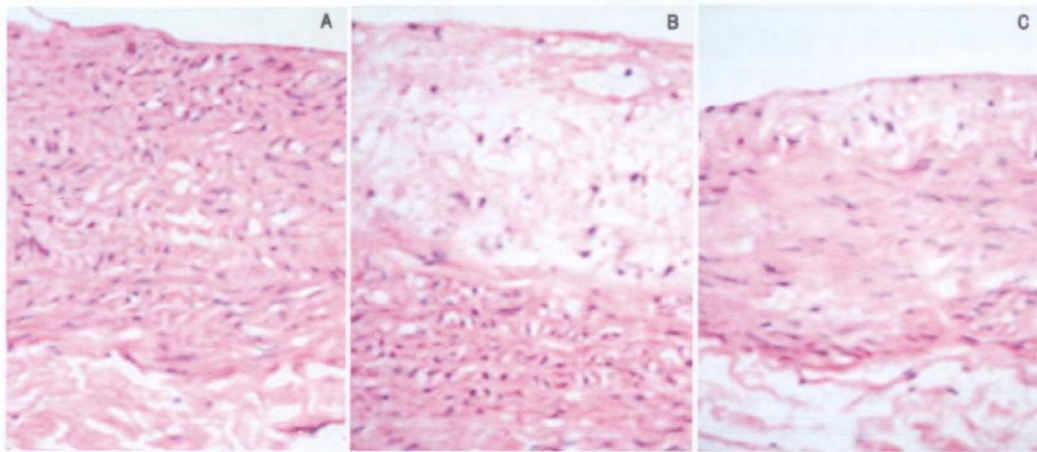


图 2. 各组兔主动脉 HE 染色 ( $\times 100$ ) A 为正常对照组, B 为淀粉组, C 为普罗布考组。

表 3. 各组兔主动脉病理形态学的改变 ( $n=8$ )

指标	正常对照组	淀粉组	普罗布考组
动脉粥样硬化面积	0	72.6% ± 9.5%	40.5% ± 10.4% <sup>a</sup>
内膜厚度( $\mu\text{m}$ )	5.72 ± 1.08	75.26 ± 14.50	28.5 ± 7.30 <sup>a</sup>
内膜中膜厚度比	4.75% ± 1.32%	52.60% ± 10.30%	15.2% ± 1.52% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与淀粉组和普罗布考组比较。

### 2.5 各组兔血红素氧合酶 1 蛋白的表达

正常对照组兔主动脉 HO-1 主要表达于内皮细胞, 平滑肌细胞极少量表达; 在肝脏则分布于网状内皮系统和部分肝细胞中。主动脉平滑肌和肝脏 HO-1 染色分数分别为 0.4 ± 0.1 和 1.1 ± 0.1。淀粉组兔主动脉 HO-1 表达显著增加, 主要分布于斑块巨

噬细胞和泡沫细胞内; 肝脏 HO-1 阳性巨噬细胞和阳性肝细胞也较正常组明显增多。主动脉斑块、平滑肌和肝脏内的 HO-1 染色分数分别为 7.6 ± 0.7、1.3 ± 0.3 和 2.9 ± 0.6, 较正常对照组差异显著 ( $P < 0.01$ )。普罗布考组兔 HO-1 在上述组织中的表达较淀粉组更多。HO-1 染色分数分别为 8.8 ± 0.9、5.1 ± 1.1 和 4.8 ± 0.6, 较淀粉组差异显著 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 图 3 和 4)。

### 2.6 相关性分析

主动脉斑块、平滑肌以及肝脏 HO-1 蛋白的表达与斑块面积、内膜厚度、内膜和中膜厚度比、血清丙二醛均呈明显负相关 ( $P < 0.05$ ; 表 4)。

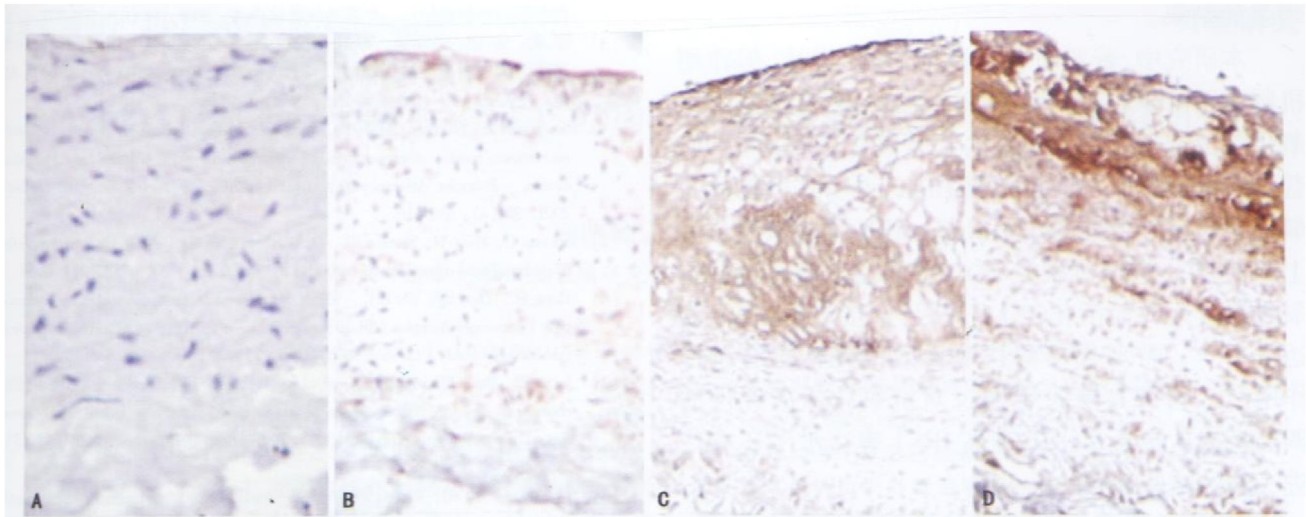


图 3. 兔动脉斑块和平滑肌内 HO-1 的表达 (×100) A 为 HO-1 阴性对照, B 为正常对照组, C 为淀粉组, D 为普罗布考组。

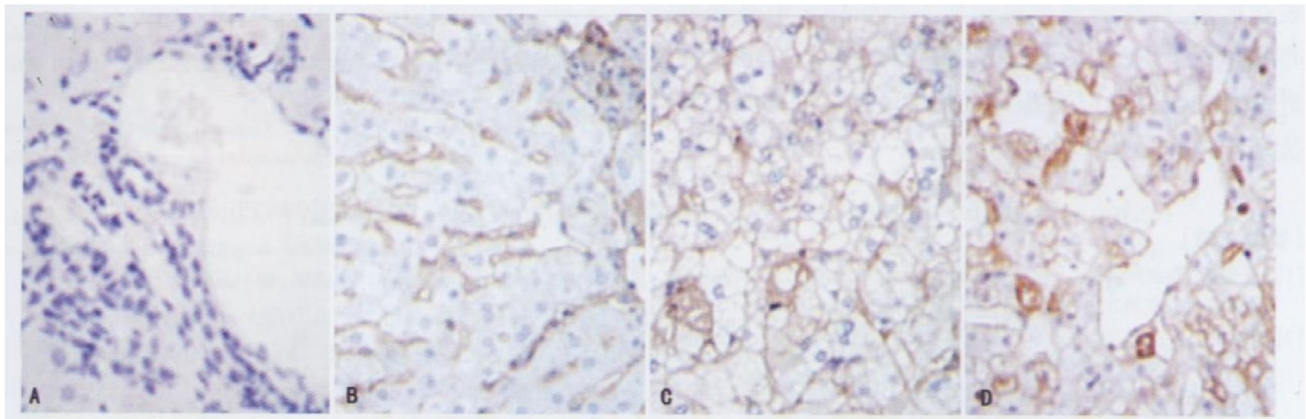


图 4. 兔肝脏组织中 HO-1 的表达(×400) A 为 HO-1 阴性对照, B 为正常对照组, C 为淀粉组, D 为普罗布考组。

表 4. 相关性分析( $n=16$ )

参 数	斑块 面积	内膜 厚度	内膜中膜 厚度比	血清 丙二醛
斑块 HO-1 水平	- 0.895	- 0.804	- 0.767	- 0.836
平滑肌 HO-1 水平	- 0.949	- 0.919	- 0.918	- 0.602
肝脏 HO-1 水平	- 0.978	- 0.959	- 0.928	- 0.767

### 3 讨论

普罗布考作为一种抗动脉粥样硬化药物, 消退斑块和降胆固醇作用得到公认<sup>[2,5]</sup>, 却由于其降低 HDLC<sup>[6]</sup>而在临床应用方面受到限制。本研究成功建立兔动脉粥样硬化模型后, 发现普罗布考组兔的动脉粥样硬化无论面积和程度均较淀粉组有所下降, 证明其的确具有抗动脉粥样硬化作用。兔主动脉斑块明显消退的同时血清 HDLC 大幅下降, 与以前的研究结果相符<sup>[7]</sup>。本研究还发现 14 周时普罗布考干预组丙二醛水平较淀粉组明显减少, 直接证明普罗布考的抗氧化特性在其抗动脉粥样硬化作用

中具有重要意义。

本研究还发现, 普罗布考的抗脂质过氧化作用可能部分通过上调 HO-1 表达水平来完成。以往研究一直认为普罗布考的抗氧化特性来源于其自身氧离子捕捉和断链的能力。然而 Deng 等<sup>[8]</sup>在兔动脉粥样硬化模型中发现普罗布考可上调抗氧化酶 HO-1。HO-1 抗氧化效果明确<sup>[9]</sup>, 且具有抗动脉粥样硬化作用<sup>[10]</sup>。普罗布考抗氧化特性是否部分通过诱导 HO-1 产生及在抗动脉粥样硬化方面的意义尚不明确。为此我们观察了兔 HO-1 表达水平与动脉粥样硬化病变和机体氧化状态的相关性, 发现病变中 HO-1 表达水平与动脉粥样硬化斑块面积、内膜厚度、内膜中膜厚度比以及机体的脂质氧化水平呈明显负相关。且普罗布考组 HO-1 在动脉、肝脏内表达水平明显升高, 支持普罗布考可通过升高 HO-1 水平进一步抑制脂质过氧化来发挥其抗动脉粥样硬化作用。HO-1 在动脉粥样硬化斑块内表达升高的同时, 其在肝脏中的表达水平也明显增加, 说明 HO-1 的抗动脉粥样硬化作用可能是整个机体保护机制

增强的结果。

本研究中, 普罗布考可诱导 HO-1 表达, 但作用机制不明。HO-1 是一种抗氧化蛋白, 多数情况下由氧化应激或 ox-LDL、过氧化氢等氧化剂诱导上调。普罗布考是还原剂又能上调 HO-1, 说明其可能具有氧化还原反应之外的作用机制。还原剂姜黄素也可上调 HO-1。它通过调控 HO-1 基因启动子区域的抗氧化效应元件而活化 HO-1 基因, 直接上调 HO-1 表达水平<sup>[11]</sup>。普罗布考对抗氧化效应元件也有调控作用<sup>[12]</sup>。普罗布考是否通过对抗氧化效应元件的调控直接从转录水平上升高 HO-1 表达水平还有待进一步的试验证明。

综上所述, 普罗布考有抗动脉粥样硬化作用。它在调节胆固醇作用之外, 还可能通过上调 HO-1 表达水平, 抑制脂质过氧化而发挥作用。但是普罗布考作用于 HO-1 的具体机制尚未明确。以上方面进一步的研究可以更深入地确定 HO-1 在普罗布考抗动脉粥样硬化作用中的地位。

#### [参考文献]

- [1] 余艳辉, 瞿湘萍, 李智, 等. 兔高脂蛋白血症模型建立以及动脉粥样硬化斑块形成的方法学[J]. 中国药理学通报, 1998, 14: 473-474.  
 [2] 赵水平, 洪绍彩, 邓平, 等. 普罗布考对主动脉粥样斑块形成及血栓

调节蛋白的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (6): 503-507.

- [3] 张梅, 张运, 张园园, 等. 舒降之、普罗布考和开搏通对颈动脉和股动脉内膜中膜厚度的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 61-64.  
 [4] Sawayama Y, Shimizu C, Maeda N, et al. Effects of probucol and pravastatin on common carotid atherosclerosis in patients with asymptomatic hypercholesterolemia. Fukuoka Atherosclerosis Trial (FAST) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39 (4): 610-616.  
 [5] Tanous D, Hime N, Stocker R. Anti-atherosclerotic and anti-diabetic properties of probucol and related compounds [J]. *Redox Rep*, 2008, 13 (2): 48-59.  
 [6] Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Effect of probucol on HDL metabolism and class B type I scavenger receptor (SR-BI) expression in the liver of hypercholesterolemic rabbits [J]. *Int J Cardiol*, 2007, 115 (1): 29-35.  
 [7] Jeon SM, Park YB, Kwon OS, et al. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: comparison with probucol [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2005, 19 (5): 336-346.  
 [8] Deng YM, Wu BJ, Witting PK, et al. Probucol protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase 1 [J]. *Circulation*, 2004, 110 (13): 1855-860.  
 [9] Chung HT, Pae HO, Cha YN. Role of heme oxygenase-1 in vascular disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14 (5): 422-428.  
 [10] Orozco LD, Kaptureczak MH, Barajas B, et al. Heme oxygenase 1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2007, 100 (12): 1703-711.  
 [11] Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element [J]. *Biochem J*, 2003, 371: 887-895.  
 [12] Takabe W, Matsukawa N, Kodama T, et al. Chemical structure-dependent gene expression of proteasome subunits via regulation of the antioxidant response element [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40 (1): 21-30.

(此文编辑 文玉珊)