

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0614-03

## 冠心康对动脉粥样硬化大鼠主动脉 LXR $\alpha$ 、ABCA1 基因表达的影响

章怡祎, 刘萍

(上海中医药大学附属龙华医院 ICU, 上海市 201203)

[关键词] 动脉粥样硬化; 冠心康; ABCA1; LXR $\alpha$ ; 信号转导

[摘要] 目的 探讨冠心康对动脉粥样硬化大鼠三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)信号通路作用的可能机制。方法 将 SD 大鼠给予高脂饲料加腹腔注射维生素 D3 针剂方法复制动脉粥样硬化模型, 随机分为模型组、冠心康组及辛伐他汀组, 并设立正常对照组, 造模成功后各组分别给予受试药与生理盐水灌胃 30 天。全自动生化仪检测血清血脂水平、HE 染色检测主动脉病理变化、实时荧光定量 PCR 检测主动脉肝 X 受体  $\alpha$ (LXR $\alpha$ )、ABCA1 基因表达。结果 与模型组相比, 冠心康可显著降低血清低密度脂蛋白水平 ( $P < 0.05$ ), 对胆固醇水平有降低趋势, 但差异无统计学意义; 病理形态显示冠心康可明显改善大鼠胸主动脉粥样斑块形成; 与模型组相比, 冠心康可显著上调主动脉 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达 ( $P < 0.05$ )。与辛伐他汀组比较, 冠心康组对血脂调节、以及 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达的影响类似, 但差异无统计学意义。结论 降低血清低密度脂蛋白水平、上调主动脉 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达可能是冠心康抑制早期动脉粥样硬化形成的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effects of Guanxin Kang on aortic LXR $\alpha$ , ABCA1 Gene Expression in Atherosclerosis Rats

ZHANG Yi-yi, and LIU Ping

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Guanxin Kang; ABCA1; LXR $\alpha$ ; Signaling Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To study the possible mechanism of ABCA1 signaling pathway about atherosclerosis rats by Guanxin Kang treatment. **Methods** The SD atherosclerosis model rats were built by given high fat diet and vitamin D3, and the atherosclerosis rats were randomly divided into model group, Guanxin Kang group and simvastatin group, and the normal SD rats were used as a control group. Each group were given drugs and normal saline for 30 days. Serum lipids were tested by automatic biochemical analyzer, aortic pathology were observed by HE staining. LXR $\alpha$  and ABCA1 gene expression were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with model group, serum LDL levels were reduced significantly in Guanxin Kang group ( $P < 0.05$ ), cholesterol levels were declined in Guanxin Kang group, but there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). The rats thoracic aortic atherosclerotic plaques block formation were decreased in Guanxin Kang group. Furthermore, LXR $\alpha$  and ABCA1 gene expression of the aortic were significantly increased in Guanxin Kang group ( $P < 0.05$ ). Compared with the simvastatin group, blood lipid and LXR $\alpha$  and ABCA1 gene expression were similar in Guanxin Kang group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Guanxin Kang inhibited atherosclerosis progression by decrease of serum LDL levels, up-regulation of aortic LXR $\alpha$  and ABCA1 gene expression in atherosclerosis rats.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是心、脑血管病的基本病理基础<sup>[1]</sup>, 近年来得到普遍关注。中医药在防治 As 方面具有一定作用, 笔者课题组前期大量研究表明<sup>[2-5]</sup>, 具有益气活血祛痰功效的冠心康可增强高脂血症及冠心病患者外周血淋巴细胞低密

度脂蛋白受体基因表达, 对高脂血症大鼠具有明显的调脂作用, 能明显改善受损的人血管内皮细胞分泌功能等多种生物学效应。基于前期的工作基础, 本研究从三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 信号通路入手, 探讨冠心康抗早期动脉粥样硬化的分子机制。

[收稿日期] 2010-05-12 [修回日期] 2010-08-10

[基金项目] 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (sz08116); 上海中医药大学附属龙华医院人才基金项目 (0907)。

[作者简介] 章怡祎, 博士, 主治医师, 研究方向为中医药防治心血管病的基础与临床研究, Email 为 eed@msn.com。刘萍, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为中医药对高脂血症、冠心病及神经系统疑难病症的研究, Email 为 liuping23@sina.com。

### 1 材料

#### 1.1 实验动物

雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 40 只, 体重 150

~ 180 g SPF级饲养,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[动物生产许可证号: SCXK(沪) 2007-0005],标准饲养于上海中医药大学实验动物中心,自由饮水和摄食,光照明暗周期 12 h,室温为 21 ± 1℃,湿度为 50% ± 10%。

## 1.2 试剂与仪器

TRIZOL, M-MuLV, RNAsin(Invitrogen公司), 随机引物 N9, dNTP(博采生物科技有限公司), SYBR Premix Ex Taq(Takara公司), 上、下游引物(Invitrogen公司)包括 GAPDH 引物(上游: 5'-AAT GTA TCC GTT GTG GAT CTG AC-3', 下游: 5'-AGA CAA CCT GGT CCT CAG TGT AG-3'), 氧化固醇活化肝 X 受体  $\alpha$  (liver X receptor  $\alpha$ , LXR $\alpha$ )引物(上游: 5'-TCA GCA TCT TCT CTG CAG ACC GG-3', 下游: 5'-TCA TTA GCA TCC GTG GGA ACA-3') 和 ABCA1 引物(上游: 5'-ATC TCA TAG TAT GGA AGA ATG TGA AGC T-3', 下游: 5'-CGT ACA ACT ATT GTA TAA CCA TCT CCA AA-3')。大型生化检测仪(CX-7型, 美国 Beckman公司)、增力电动搅拌匀浆机及匀浆管(JB50-D型, 上海标本模型厂)、冷冻台式离心机(5417R型, 德国 EPPENDORF公司)、PCR 仪(PTC-170/9701型, 美国 Bio-RAD公司)。

## 1.3 药品

冠心康(生黄芪 30 g, 全瓜蒌 15 g, 薤白 12 g, 半夏 12 g, 益母草 30 g 和丹参 12 g), 生药购自上海中医药大学附属龙华医院中药房, 按既定工艺制成水煎剂, 生药含量为 2.87 g/mL。辛伐他汀片(20 mg/片, 杭州默沙东制药有限公司)。

## 1.4 模型建立、分组及给药

正常组给予普通饲料, As大鼠给予高脂饲料(含 30 g/kg胆固醇、5 g/kg胆酸钠、2 g/kg丙基硫氧嘧啶、50 g/kg精制糖、100 g/kg猪油), 并于实验开始时腹腔注射维生素 D3 针剂(70万 U/kg), 连续 3天, 每隔 4周重复 1次。高脂喂养共 90天。造模成功后再随机分为模型组、冠心康组及辛伐他汀组, 每组 10只。正常组与模型组予以生理盐水灌胃, 冠心康组按 21.6 g/(kg·d)灌胃给药, 辛伐他汀组按 1.5 mg/(kg·d)灌胃给药, 治疗 30天。

## 1.5 血脂生化检测

于治疗 30天后, 腹腔麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清, 采用大型生化检测仪生化方法检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)。

## 1.6 主动脉病理学检测

胸主动脉常规固定、修块、脱水、透明、浸蜡、包

埋、切片、HE染色, 光镜下观察主动脉病理形态学变化。

## 1.7 主动脉 LXR $\alpha$ 、ABCA1基因表达检测

按以下步骤进行操作: (1) RNA 抽提采用 Trizol 一步法提取总 RNA, 按照试剂盒说明进行; 反转录条件为 37℃, 60 min; 95℃, 5 min。 (2) 实时荧光定量 PCR 法检测主动脉 LXR $\alpha$ 、ABCA1 基因表达, 扩增条件为 95℃ 15 s; 95℃, 10 s; 60℃ 20 s; 40个循环。 (3) 所得 CT 值经转换后以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  相对定量法获得每个样本各目的基因相对表达量的数值(CT 值表示扩增循环数,  $\Delta CT$  = 目的基因 CT - 内参 CT,  $\Delta\Delta CT$  = 观察样本  $\Delta CT$  - 对照样本  $\Delta CT$ )。

## 1.8 统计分析

采用 SPSS 14.0 统计软件进行分析, 计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为组间差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 冠心康对动脉粥样硬化模型大鼠血脂的影响

模型组大鼠血清 TC、LDL 水平明显升高, 与正常组比较, 差异有显著性; 血清 TG 及 HDL 水平与正常组比较, 差异无显著性。与模型组相比, 辛伐他汀可明显降低血清 TC 及 LDL 水平, 而对血清 TG 及 HDL 水平无显著影响。与模型组相比, 冠心康可显著降低血清 LDL 水平( $P < 0.05$ ), 对 TC 水平有降低趋势, 但差异无显著性(表 1)。

表 1 各组血脂指标 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

分 组	TG	TC	HDL	LDL
正常组	1.24 ± 0.21	1.43 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.07	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>
模型组	1.04 ± 0.87	8.72 ± 4.84 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.16	1.67 ± 1.21 <sup>a</sup>
辛伐他汀组	0.70 ± 0.13 <sup>a</sup>	5.04 ± 1.16 <sup>ab</sup>	0.49 ± 0.08	0.79 ± 0.19 <sup>ab</sup>
冠心康组	0.65 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.02 ± 1.51 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.16	0.98 ± 0.32 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常组比较; b 为  $P < 0.05$  与模型组比较。

## 2.2 冠心康对动脉粥样硬化模型大鼠胸主动脉形态的影响

HE 染色显示模型组大鼠胸主动脉可见 As 斑块, 并存在较多泡沫细胞, 胆固醇酯及胆固醇结晶明显增多, 外膜有大量炎性细胞侵袭。而辛伐他汀胸主动脉可见 As 斑块, 但较模型组明显减少, 胆固醇酯及胆固醇结晶亦较模型组减少。冠心康组大鼠胸主动脉 HE 染色显示出与辛伐他汀组相似(图 1)。

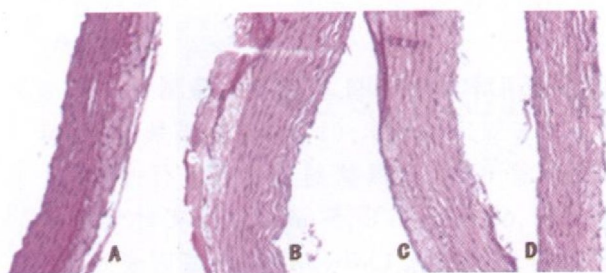


图 1 各组大鼠主动脉 HE 染色 (200×) A 为正常组, B 为模型组, C 为辛伐他汀组, D 为冠心康组。

### 2.3 冠心康对动脉粥样硬化模型大鼠主动脉 LXR $\alpha$ 、ABCA1 基因表达的影响

模型组 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达与正常组相比, 显著降低 ( $P < 0.05$ )。通过辛伐他汀药物干预, 主动脉 ABCA1 基因表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), 并且 LXR $\alpha$  基因表达有升高趋势, 但与模型组相比, 差异无显著性。与模型组相比, 冠心康可显著上调主动脉 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达 (表 2)。

表 2 各组基因相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	LXR $\alpha$	ABCA1
正常组	2.38 $\pm$ 2.04	1.48 $\pm$ 0.84
模型组	0.49 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.33 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>
辛伐他汀组	1.16 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>
冠心康组	1.09 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup>	0.47 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$  与正常组比较; b 为  $P < 0.05$  与模型组比较。

### 3 讨论

As 在中医理论类似“痰浊”。中医认为高脂血症和动脉硬化是全身性疾病, 属于本虚标实之证, 其中, 瘀血痰凝作为动脉硬化的基本病理特点已得到多数学者的肯定。本研究基于气虚血瘀痰浊角度, 以《金匱要略》中瓜蒌薤白半夏汤为基础加减化裁而成 (黄芪、瓜蒌、薤白等), 具有祛痰降浊、健脾益气、活血化瘀之功效的中药复方制剂冠心康为研究对象。本方对高脂血症大鼠具有明显的调脂作用, 可增强高脂血症及冠心病患者外周血淋巴细胞低密度脂蛋白受体基因表达, 能明显改善受损的人血管内皮细胞分泌功能等多种生物学效应<sup>[2-5]</sup>。本研究通过干预 As 模型大鼠, 体现中医既病防变的“治未病”思想; 从激活 TC 外流机制关系, 以 LXR-ABCA1 信号通路为切入点探讨冠心康疗效的可能机制。

本研究模型组大鼠血清 TC、LDL 水平明显升高, 组织病理学结果模型组大鼠胸主动脉可见 As 斑块, 并存在较多泡沫细胞, 胆固醇酯及胆固醇结晶明

显增多, 外膜有大量炎性细胞侵袭。提示本法成功复制了 As 大鼠模型, 与国内外报道一致<sup>[6]</sup>。通过药物干预, 本研究进一步表明, 辛伐他汀可明显降低血清 TC 及 LDL 水平, 而对血清 TG 及 HDL 水平无显著影响, 提示辛伐他汀可显著降低 TC 及 LDL 水平, 与文献报道一致。且与模型组比较, 辛伐他汀可显著减少 As 大鼠胸主动脉粥样斑块及胆固醇酯及胆固醇结晶。冠心康可显著降低血清 LDL 水平, 且对 TC 水平有降低趋势; 病理形态研究表明, 冠心康可明显改善大鼠胸主动脉粥样斑块形成。提示冠心康可显著抑制 As 形成, 并减少血清 LDL 水平。

主动转运细胞内 TC 至细胞外的基因为 ABCA1, 可促进细胞内 TC 和磷脂流出, 是重要的 TC 流出调节蛋白, 在 TC 外流及逆转运中起关键作用。最新资料显示 ABCA1 不仅介导细胞内 TC 外流, 而且还与 As 及泡沫细胞形成有明显关联。LXRs 在转录水平调控多个与脂质代谢以及炎症有关的重要蛋白质表达, 在维持细胞及机体 TC 稳态中起重要作用。研究发现, LXR $\alpha$  可诱导 ABCA1 转录, 尚能通过抑制炎性细胞因子的表达而间接增强 ABCA1 的转录<sup>[7,8]</sup>。模型组 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达比正常组显著降低, 提示 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因在 As 状态下被显著抑制。辛伐他汀可升高主动脉 ABCA1 基因表达, 其可能通过降低巨噬细胞 ABCA1 基因表达水平, 从而减少巨噬细胞 TC 外流, 抗 As 稳定粥样斑块。本研究提示, 冠心康可显著上调主动脉 LXR $\alpha$  及 ABCA1 基因表达, 提示冠心康可通过 LXR-ABCA1 途径通过减少 TC 吸收、促进 TC 外流及逆转运和促进胆汁酸合成与排泄等维持 TC 内稳态, 从而减少巨噬细胞泡沫化及抑制 As 形成。

#### 【参考文献】

- [1] Hachinski V. Stroke the next 30 years [J]. *Stroke* 2002; **33**: 1-4
- [2] 刘萍, 张静生. 冠心康对高脂血症大鼠肝脏低密度脂蛋白受体活性的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003; **11** (2): 159-160
- [3] 刘萍, 张静生. 冠心康对高脂血症大鼠血脂影响的研究 [J]. *中成药*, 2003; **25** (9): 757-758
- [4] 刘萍, 张静生, 张兴中. 冠心康对冠心病外周血淋巴细胞低密度脂蛋白受体基因表达的影响 [J]. *中医药学刊*, 2003; **21** (7): 1035-1036
- [5] 章怡祎, 刘萍, 高虹, 等. 冠心康对脂质损伤的人血管内皮细胞保护机制的研究 [J]. *中医药学刊*, 2005; **23** (8): 1418-1419
- [6] 焦亚斌, 芮耀诚, 杨鹏远, 等. 动脉粥样硬化大鼠主动脉 IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-10 及 IL-10R 的表达及银杏叶提取物的作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2005; **26** (2): 158-160
- [7] Soumian S, Albrecht C, Davies AH, et al. ABCA1 and atherosclerosis [J]. *Vasc Med*, 2005; **10** (2): 109-119
- [8] Yvan-Charvet L, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30** (2): 139-143

(此文编辑 李玲玲)