

牛磺酸抑制高脂合并高同型半胱氨酸血症致兔动脉粥样硬化

袁吉祥¹, 姚成立², 马云海¹, 张璞璞¹

(1. 宁夏医科大学研究生院, 宁夏银川市 750004; 2. 银川市第一人民医院心内科, 宁夏银川市 750001)

[关键词] 牛磺酸; 高脂血症; 高同型半胱氨酸血症; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 研究牛磺酸拮抗高脂合并高同型半胱氨酸血症所致动脉粥样硬化的作用及原理。**方法** 雄性新西兰大耳白兔 33 只, 随机分成 3 组: 正常组、模型组、干预组。0、2、12 周自兔心脏采血化验相关指标, 处死兔取腹主动脉行病理学染色。**结果** 干预组同型半胱氨酸、高密度脂蛋白胆固醇与模型组比较差异没有显著性 ($P > 0.05$), 然而甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、氧化型低密度脂蛋白降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。干预组的粥样斑块面积、内皮厚度和血管细胞间黏附分子 1 阳性细胞百分比均较模型组明显减少 ($P < 0.05$)。**结论** 牛磺酸作为一种内源性的细胞防护物质, 虽然不能降低血清同型半胱氨酸水平, 但是可以通过抑制内皮增生和血管平滑肌细胞增殖迁移、降血脂以及抗氧化应激从而拮抗动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Taurine Restraining Atherosclerosis Induced by Hyperlipemia and Hyperhomocysteinemia in Rabbit

YUAN Ji-Xiang¹, YAO Cheng-Li², MA Yun-Hai¹, and ZHANG Pu-Pu¹

(1. The Graduate School, Medical University of Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. The Department of Cardiology, The First Hospital of Yinchuan City, Yinchuan, Ningxia 750001, China)

[KEY WORDS] Taurine; Hyperlipemia; Hyperhomocysteinemia; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the role and principle of taurine in inhibiting atherosclerosis induced by hyperlipemia and hyperhomocysteinemia in rabbit. **Methods** 33 healthy male New Zealand big-eared white rabbits were divided into 3 groups: normal, model and intervention group. Blood was drawn for laboratory test at 0, 2nd, 12th week respectively. The rabbits were executed and abdominal aortas were taken out for pathology dyeing at 12th week. **Results** Homocysteine (Hcy), high density lipoprotein cholesterol (HDL) of intervention group had no significant difference in comparison with model group ($P > 0.05$). However, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL), oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) lowering had significant difference ($P < 0.05$). Atheromatous plaques area, endothelium thickness and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) positive cells percentage of intervention group were obviously reduced in comparison with model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Taurine, as endogenous cell protective substance, may inhibit atherosclerosis through suppressing endothelial hyperplasia, vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and migration, reducing hyperlipemia and suppressing oxidation stress rather than lowering hyperhomocysteinemia.

高血脂是最早被公认的也是最重要的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 独立危险因素, 而高同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 血症则是近 10 年来新

显现的 As 危险因素。近年来文献报道^[1] 牛磺酸可以拮抗高脂和高 Hcy 血症所致的 As。为了进一步研究血管损伤与 As 的关系, 我们尝试采用球囊损伤

[收稿日期] 2011-10-10

[基金项目] 银川市科技攻关项目资助(2010028)

[作者简介] 袁吉祥, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化与冠心病, 电话为 15296918139, E-mail 为 34232762@qq.com。通讯作者姚成立, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化与冠心病, 电话为 13909575756, E-mail 为 wswsjycl@126.com。张璞璞, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化与冠心病, 电话为 15109503277, E-mail 为 36155376@qq.com。

兔子腹主动脉后,在高脂合并高 Hcy 血症的情况下开展此项研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

健康雄性新西兰大耳白兔 33 只,体重 2.0 ~ 2.5 kg,由兰州大学实验动物中心提供。L-蛋氨酸、胆固醇、牛磺酸由 Sigma 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 分组 将 33 只兔随机分成 3 组。正常组($n=11$):予普通家兔颗粒饲料。模型组($n=11$):予 2% 蛋氨酸 + 高脂饲料 + 球囊拉伤腹主动脉。干预组($n=11$):予 2% 蛋氨酸 + 高脂 + 1% 牛磺酸饲料 + 球囊拉伤腹主动脉。高脂配方:0.5% 胆固醇 + 8% 猪油 + 5% 蛋黄。

1.2.2 球囊拉伤腹主动脉手术步骤^[2] 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)经兔耳缘静脉缓慢注射,等兔麻醉满意后接输液器,输液由 250 mL 生理盐水和 1.0 氨苄西林配制而成,缓慢静滴。在一侧下肢腹股沟以下区域备皮,碘伏消毒,铺洞巾,利多卡因局麻,解剖暴露一侧股动脉,注意保护近端动脉分支,结扎远端,用利多卡因浸润股动脉,使之扩张,用止血夹夹闭近端,在结扎点和夹闭点之间的横断面上半剪开股动脉,将(3.5 ~ 4.0) mm × 15 m 中心带导丝的球囊推送进入腹主动脉,进入长度大约 20 cm,推注生理盐水充盈球囊达 8 ~ 10 大气压后,回拉球囊至髂总动脉。反复回拉 3 次以造成腹主动脉内皮损伤。将球囊吸成负压后,退出球囊,夹闭股动脉后结扎,自耳缘静脉注射肝素钠 200 U 抗凝。往切口内洒入庆大霉素 80 000 U 防止感染。缝合手术切口。

1.3 观察指标及处理方法

1.3.1 生化指标检测 实验 0、2、12 周自心脏采血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液移至 EP 管, -80℃ 冰箱保存,成批化验甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、Hcy,常温融化后于 1 h 内检测。

1.3.2 腹主动脉标本的留取 33 只家兔喂养 12 周后,自兔耳缘静脉注射空气处死兔,分离腹主动脉后截取 0.5 cm 新鲜组织做冰冻切片油红 O 染色,

截取病 1 cm 用 10% 中性福尔马林液固定 24 h 后脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,切片后进行苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色、碱性品红染色、免疫组织化学染色。剩下的组织用来做大体油红 O 染色。图像采用 Image-pro Plus 专业分析软件处理。

1.4 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。3 组间多重比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为显著性差异水平。

2 结果

2.1 各组血清指标的测量

与正常组比较,模型组兔血浆 TG、TC、LDLC、HDLc、ox-LDL、Hcy 值显著升高($P < 0.05$),与模型组比较,干预组 Hcy、HDLc 差异无显著性($P > 0.05$),而 TG、TC、LDLC、ox-LDL 降低,差异有显著性($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 12 周后血清各项生化指标($\bar{x} \pm s, n=11$)

Table 1. Biochemical index measurements of rabbit serum after 12 weeks($\bar{x} \pm s, n=11$)

指 标	正常组	模型组	干预组
TG(mmol/L)	0.75 ± 0.36	1.88 ± 0.37 ^a	1.46 ± 0.40 ^b
TC(mmol/L)	1.73 ± 0.51	11.46 ± 0.61 ^a	5.77 ± 0.55 ^b
HDLc(mmol/L)	0.72 ± 0.24	2.15 ± 0.28 ^a	2.24 ± 0.25
LDLC(mmol/L)	0.69 ± 0.36	7.83 ± 0.44 ^a	3.29 ± 0.43 ^b
ox - LDL(μg/ L)	12.24 ± 3.61	45.60 ± 3.96 ^a	23.91 ± 3.78 ^b
Hey(μmmol/L)	10.23 ± 4.92	82.56 ± 5.71 ^a	81.36 ± 5.25

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

2.2 病理染色结果

2.2.1 大体标本油红 O 染色 正常组兔腹主动脉内膜表面光滑,油红 O 不着色。模型组兔腹主动脉内膜可见弥漫性、融合成片的鲜红色斑块隆起凸出于表面。干预组兔主动脉内膜表面不平,可见隆起表面的条纹状红色斑块,粥样斑块面积较模型组明显减少(90.19% 比 12.65%, $P < 0.05$;图 1)。

2.2.2 HE 染色 正常组兔腹主动脉内皮平整,平滑肌排列整齐。模型组兔主动脉内皮明显增厚,内含大量增殖、迁移的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC),可见脂肪沉积形成的空泡,中膜变薄,平滑肌萎缩,内中层 VSMC 排列紊乱。

干预组兔内中层细胞增生,VSMC 排列紊乱,内皮层可见增殖迁移的 VSMC 和脂肪裂隙,内皮/内中层厚度百分比明显小于模型组(69.39% 比 45.78%, $P < 0.05$;图 2)。

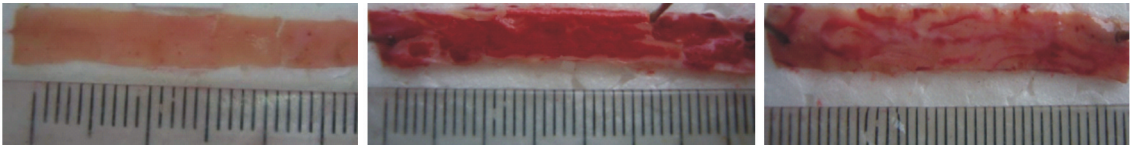


图 1. 3 组兔腹主动脉纵行切开大体标本油红 O 染色 左为正常组,中为模型组,右为干预组。
Figure 1. Abdominal aorta general specimen oil red O dyeing of the three groups of rabbits after longitudinal cut open

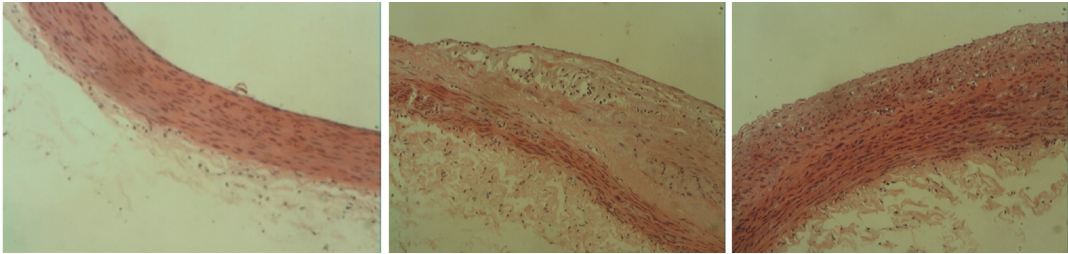


图 2. 3 组兔腹主动脉壁横切面 HE 染色(×100) 左为正常组,中为模型组,右为干预组。
Figure 2. Abdominal aortic wall transverse HE staining of the three groups of rabbits(×100)

2.2.3 冰冻切片油红 O 脂肪染色 正常组兔腹主动脉内皮平整,全层无油红着色。模型组兔腹主动脉内中层增厚,全层都有鲜红色米粥样脂滴,结构疏松。干预组兔腹主动脉内中层增厚,内皮细胞转化为泡沫细胞,细胞内可见细小密集红色脂肪颗粒(图 3)。

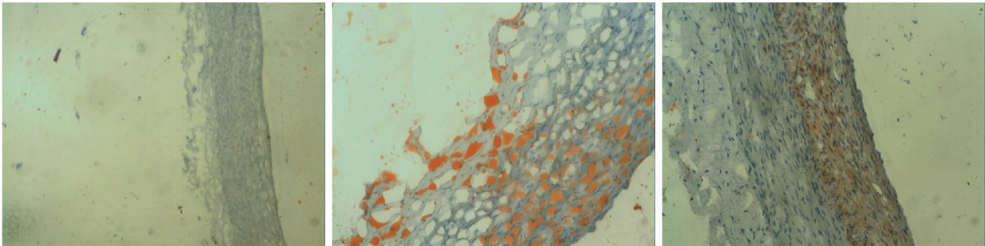


图 3. 3 组兔腹主动脉冰冻切片油红 O 脂肪染色(×100) 左为正常组,中为模型组,右为干预组。
Figure 3. Abdominal aorta frozen section oil red O fat staining of the three groups of rabbits(×100)

2.2.4 碱性品红弹力纤维染色 正常组兔腹主动脉内皮平整,弹力纤维排列整齐。模型组兔腹主动脉内中层明显增厚,内皮层弹力纤维增生形成纤维帽,排列紊乱,纤维帽以下弹力纤维和内弹力板变性坏死,断裂或溶解。干预组兔内中层厚度介于正常组和模型组之间,可见内中层弹力纤维增生,排列紊乱,内弹力板完整(图 4)。

2.2.5 血管细胞间黏附分子 1 免疫组织化学染色 正常组兔腹主动脉内皮平整,内皮细胞胞浆无 DAB 显色。模型组兔腹主动脉内皮增厚,内皮细胞胞浆 DAB 显色。干预组兔腹主动脉内膜厚度介于正常组和模型组之间,内皮细胞胞浆 DAB 显色。干预组血管细胞间黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)

阳性细胞/总细胞数百分比比较模型组明显降低(64.30% 比 15.38%, $P < 0.05$;图 5 和表 2)。

表 2. 3 组兔斑块面积、内皮厚度、VCAM-1 阳性细胞百分比($\bar{x} \pm s, n = 11$)
Table 2. Plaques area, endothelium thickness, VCAM-1 positive cells percentage of the three groups of rabbits($\bar{x} \pm s, n = 11$)

分 组	斑块面积/ 动脉壁面积	内膜/ 内中膜厚度	阳性细胞/ 总细胞数
对照组	0	0	0
模型组	90.19% ± 5.07%	69.39% ± 8.10%	64.30% ± 6.03%
干预组	12.65% ± 4.94%	45.78% ± 7.42% ^a	15.38% ± 5.85% ^a

^a 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

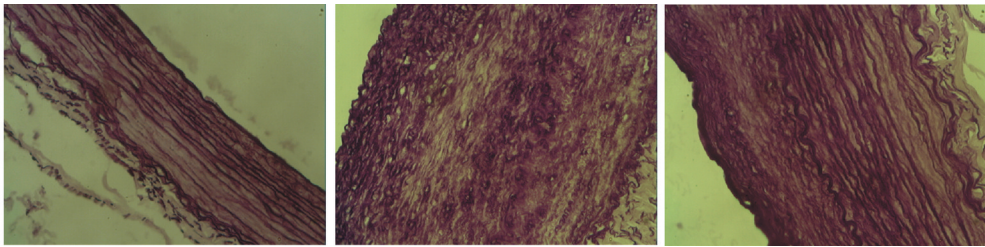


图 4. 3 组兔腹主动脉碱性品红弹力纤维染色(×200) 左为正常组,中为模型组,右为干预组。

Figure 4. Abdominal aorta alkaline magenta elastic fiber dyeing of the three groups of rabbits(×200)

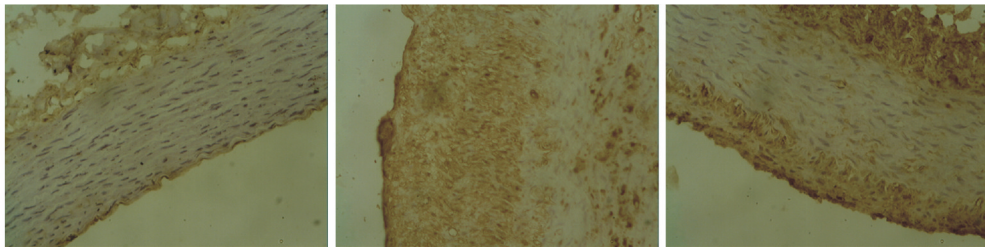


图 5. 3 组兔腹主动脉 VCAM-1 免疫组织化学染色(×200) 左为正常组,中为模型组,右为干预组。

Figure 5. Abdominal aorta VCAM-1 immunohistochemical staining of the three groups of rabbits(×200)

3 讨 论

血管球囊成形术后引起血管平滑肌细胞增殖和新生内膜增生是导致 As 和血管再发狭窄的重要原因。随着内皮细胞激活,血管平滑肌细胞从血管壁的中层开始向血管腔迁移,最终与胶原和细胞外基质沉积,形成 As 的纤维帽^[3]。为了进一步研究血管损伤与 As 的关系,我们尝试采用球囊拉伤兔子腹主动脉后,在高脂合并高 Hcy 血症的情况下开展此项研究。Ross^[4]在 1993 年的《Nature》杂志上提出了 As 内膜损伤反应学说,该学说认为各种危险因素造成的动脉内膜损伤是 As 病变发生的始动环节。球囊拉伤血管后出现内皮剥脱(denudation)、再内皮化(reendothelialization)、内皮增生(hyperplasia)、VSMC 增殖(proliferate)迁移等一系列反应从而启动了 As 的进程,其中再内皮化是由分支血管和未损伤血管内皮延伸而来^[5]。

流行病学研究已经确立高 Hcy 是动脉粥样硬化性和血栓性心血管疾病独立的危险因素。随机临床试验显示口服补充叶酸、维生素 B₆、B₁₂可以显著降低高 Hcy 血症,但是似乎并没有改善心脑血管疾病的二级预防结局^[6]。内源性抗氧化剂牛磺酸、谷胱甘肽、胱氨酸、金属硫蛋白等已成为目前拮抗高 Hcy 及相关 As 研究的热点^[7]。牛磺酸是体内 β-氨基酸的亚磺酸类似物,具有调节细胞钙稳态、稳定细胞膜、维持细胞内外渗透压平衡、抗脂质过氧

化损伤、清除氧自由基等广泛的细胞保护作用,对 As、高血压等心血管疾病具有防治意义^[8]。徐雅琴等^[9]研究发现牛磺酸与 Hcy 共同孵育可显著抑制 Hcy 诱导的内皮细胞死亡,且呈剂量依赖效应;同时发现牛磺酸有拮抗 Hcy 对内皮细胞标记胸腺嘧啶脱氧核苷(tritium-labelled thymidine, 3H-TdR)掺入的抑制,亦呈浓度依赖效应。刘乃奎等^[10]在整体和细胞水平上研究发现牛磺酸对内皮剥脱诱导的 VSMC 增殖有抑制效应,牛磺酸对 VSMC 增殖的抑制作用可能是通过调整细胞内外钙稳态来实现的。田清平等^[11]观察 Hcy 的促细胞增殖效应与蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的激活、丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的激活、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)下降、Ca²⁺内流有关。本实验牛磺酸干预组再内皮化程度明显高于模型组($P < 0.05$),而内膜/中膜厚度百分比显著降低($P < 0.05$),推测 Hcy 可能延缓了损伤动脉再内皮化,促进了内皮增生和平滑肌增殖和迁移,而牛磺酸则相反,促进了损伤动脉再内皮化,抑制了内皮增生和平滑肌增殖和迁移从而抑制了 As。其细胞内信号传递途径是否与 PKC、MAPK、cAMP 及 Ca²⁺有关还有待于进一步的研究。

人类动脉粥样硬化形成和发展一般会经历以下几个过程:脂质条纹期、纤维斑块期、粥样斑块期、复合斑块期。而单核/巨噬细胞游走、分化、吞

噬氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞以及 VSMC 增殖、迁移等是 As 形成和发展中的重要环节^[7]。ox-LDL 具有细胞毒性作用,能促进泡沫细胞的形成,可以引起内皮功能障碍,促使单核细胞及低密度脂蛋白进入血管内膜下,加速脂质条纹的形成,刺激内皮细胞表达 VCAM-1,使单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞黏附于内皮细胞,诱导内皮细胞增生和平滑肌细胞增殖、移行^[12]。本实验证实牛磺酸拮抗了 As,降低了血脂和 ox-LDL 水平,但是并没有降低 Hcy 水平,可能是因为高 Hcy 激活了血管内皮氧化应激反应,促进了 ox-LDL 的生成。而牛磺酸作为一种内源性的抗氧化剂,拮抗了 Hcy 诱导的氧化应激反应,从而减少了 ox-LDL 的生成,同时使内皮细胞减少 VCAM-1 分子的表达,最终减轻了 As。牛磺酸具有降血脂作用,Teruyoshi 等^[13]研究发现牛磺酸可以使肝细胞 G₂ 细胞减少 ApoB100 和脂质分泌。Murakami 等^[14]研究推断牛磺酸所以降低胆固醇可能是因为它可以将胆固醇转化为胆汁酸。

总之,牛磺酸作为一种内源性的细胞防护物质,虽然不能降低血清 Hcy 水平,但是可以通过抑制内皮增生和平滑肌增殖迁移、降血脂以及抗氧化应激从而拮抗 As。可以推测采用维生素 B₆、B₁₂、叶酸等传统的降低 Hcy 的药物联合牛磺酸来预防高同型半胱氨酸血症及相关的 As 病变会有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Xu J, Arneja AS, Tappia PS, et al. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease[J]. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2008, 13(2): 57-65.
- [2] 冯 斌,杨庭树,张华巍. 高脂饲料喂养与动脉内膜球囊损伤结合建立兔腹主动脉粥样硬化模型[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(15): 2 911-914.
- [3] 黄 岚,黄德嘉. 血管损伤性疾病——从分子到临床

[M]. 北京:人民卫生出版社,2008;247.

- [4] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.
- [5] Antony K. Lau, Steven B. Leichtweis, Peter Hume. Probucol promotes functional reendothelialization in balloon-injured rabbit aortas[J]. *Circulation*, 2003, 107(15): 2 031-036.
- [6] Bradley A. Maron, Joseph Loscalzo. The treatment of hyperhomocysteinemia[J]. *Annual Rev Med*, 2009, 60(11): 39-54.
- [7] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,2009;718-720.
- [8] 石彦荣,牛大地,王述姮,等. 同型半胱氨酸抑制培养的大鼠血管平滑肌细胞牛磺酸转运[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(3): 203-205.
- [9] 徐雅琴,张钧华,柯 杨,等. 牛磺酸对同型半胱氨酸致人血管内皮细胞损伤的拮抗作用[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(2): 151-152.
- [10] 刘乃奎,岑链珍,王雪青,等. 牛磺酸对内皮剥脱后血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及其机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1995, 3(2): 151.
- [11] 田清平,刘乃奎,汤 健,等. 同型半胱氨酸促平滑肌细胞增殖的内信号传递途径[J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(2): 152-153.
- [12] Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2009, 20(5): 363-369.
- [13] Teruyoshi Yanagita, Seo-Young Han, Ying Hu, et al. Taurine reduces the secretion of apolipoprotein B100 and lipids in HepG₂ cells[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2008, 10(7): 38.
- [14] Murakami S, Kondo-Ohta Y, Tomisawa K. Improvement in cholesterol metabolism in mice given chronic treatment of taurine and fed a high-fat diet[J]. *Life Science*, 1999, 64(1): 83-91.

(此文编辑 曾学清)